



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم : الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية والجزيئية  
Département : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé :

---

**Evaluation, Extraction et caractérisation des deux protéases :  
la pepsine du poulet et la ficine de figuier et leurs utilisations  
dans la coagulation du lait**

---

Présenté par : BENTAILA Wissal  
HAMEL Sara

Le :11/06/2024

Jury d'évaluation :

**Présidente :** Mme BAHI A (Maître de Conférences A à l'UFM Constantine).

**Encadrante :** Mme BENSMIRA S (Maître Assistante A à l'UFM Constantine).

**Examinatrice :** Mme BOUKHALFA H (Maître de Conférences A à l'UFM Constantine).

**Année universitaire  
2023 - 2024**

## Remerciements

*Nous exprimons d'abord notre gratitude à Allah, notre Créateur, qui nous a soutenus et nous a accordé la force, la patience et le courage nécessaires pour accomplir cette tâche.*

*Nous souhaitons exprimer notre sincère reconnaissance envers notre encadrante de mémoire, Mme **BENSMIRA SOUMIA**, pour avoir accepté de superviser notre travail. Sa guidance précieuse, ses conseils éclairés et sa patience ont été des piliers essentiels tout au long de ce parcours académique.*

*Nous tenons également à exprimer notre profonde gratitude envers Madame **BAHI A** pour avoir accepté de présider ce document. Vous êtes un exemple à suivre.*

*Nous voudrions exprimer toute notre gratitude à Madame **BOUKHALFA H** de nous avoir honorés par sa participation au jury et du temps qu'elle a bien voulu consacrer à l'analyse critique de ce travail.*

*Nous souhaitons également exprimer notre gratitude à tous les membres du laboratoire de Biochimie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'UFM Constantine pour leur collaboration, en particulier à Mr **BOUDARSA NABIL** pour son aide précieuse et ses conseils avisés.*

*Enfin, nous tenons à remercier à chacun de nos parents, ainsi que nos frères et sœurs, qui nous soutiennent dans tous nos projets et nos études.*



# *Dédicaces*

*A **moi-même**, à ma patience et mon endurance, à mes aspirations et mon refus de capituler, à mes mérites et mes capacités, mon parcours ne s'arrête pas ici, c'est juste le début, la première étape vers le meilleur, insha'ALLAH.*

*À **ma mère**, raison de mon existence, mon refuge dans les moments de faiblesse et de force, tu as été le soutien à chaque pas. Les mots et les phrases ne suffisent pas à exprimer l'ampleur de mon amour et de ma gratitude pour tous tes sacrifices, ton soutien et tes souhaits de bonheur pour nous. Qu'ALLAH te donne la santé et une longue vie.*

*À l'homme de ma vie, la personne sur laquelle j'ai pu compter dans les moments de détresse, celui qui éclaire mon chemin et élimine tous les obstacles, à **mon père**, mon refuge et soutien, tu as été le sacrificateur, plaçant toujours nos désirs avant les tiens, qu'ALLAH te garde pour nous Papa et te donne la santé et une longue vie.*

*À ma grande sœur **Wiame** que je trouve toujours à mes côtés, celle qui me tend la main quand j'ai besoin d'aide, qu'ALLAH te comble de bonheur dans ta vie.*

*À mes frères **Ayoub** et **Adam**, qu'ALLAH vous préserve comme un soutien et un pilier pour moi, qu'ALLAH vous guide et vous réussisse dans votre parcours.*

*À celui avec qui j'ai appris la maternité, mon neveu **Yazan**, le premier petit-fils de la famille, une partie de mon cœur et de mon âme. Qu'ALLAH te protège et fasse de toi l'une des personnes les plus réussies dans le monde.*

*À mes **grands-parents**, qu'Allah accorde la santé et une longue vie et à la mémoire de mon grand-père, le combattant Mohammad ALLAH-yarhmou.*

*À ma grande famille, membre par membre, à **mes tantes et oncles** paternels et maternels, ainsi qu'à mes cousines et cousins.*

*À ma chère binôme et partenaire dans ce travail, **Sara**, merci pour les beaux moments que nous avons partagés ensemble. J'espère que notre travail sera couronné de succès. Je voudrais également dédier et remercier spécialement sa famille.*

*À tous ceux qui ont souhaité pour moi le bien et la réussite.*

*Et enfin à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, de près ou de loin.*

**WISSAL**





# *Dédicaces*

*Tout d'abord, je tiens à remercier **ALLAH**, le Tout-Puissant et le Miséricordieux, de m'avoir illuminé et d'avoir ouvert les portes du savoir, ainsi que de m'avoir donné la volonté et le courage d'élaborer ce travail.*

*À ma chère **maman**, la lumière de ma vie et mon inspiration infinie. Tes sacrifices, ta bienveillance et ton amour inconditionnel ont été les fondations sur lesquelles j'ai construit mon chemin. Tu as toujours été là pour me soutenir, me guider et m'encourager avec tes précieux conseils. Aucun mot ne saurait exprimer ma grande reconnaissance, ma gratitude et mon profond amour, qu'**ALLAH** t'accorde la santé et la longue vie.*

*À mon cher **père**, compagnon de chaque étape de ma vie, dont la sagesse éclaire chacun de mes pas. En témoignage de ma gratitude pour ton soutien indéfectible, je t'offre ces réalisations, souhaitant ta santé et ton bonheur continus.*

*À mes chers frères **Moussa** et **Mouhamed** merci d'être les meilleurs frères du monde.*

*À mes très chères sœurs **Bouthiena**, **Imane** et **Marwa** je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*À mes chères et adorables les filles de ma sœur **Lina Afnane** et **Ghofrane**.*

*À mes tantes **Warda** et **Chrifa**.*

*À mes chers cousines **Chourouk** et **Nour Elhouda**.*

*À tous mes amies.*

*Une spéciale dédicace à ma chère binôme **Bentaila Wissal** ainsi qu'à toute sa famille.*

*À tous ce qui m'a aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.*

**SARA**



# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

## *Partie bibliographique*

**1 Lait..... 5**

**1.1 Composition..... 5**

1.1.1 Eau ..... 6

1.1.2 Protéines ..... 6

1.1.3 Glucides ..... 8

1.1.4 Matière grasse..... 8

1.1.5 Vitamines..... 8

1.1.6 Matières minérales ..... 9

**1.2 Facteurs influençant la composition du lait ..... 9**

**2 Coagulation du lait..... 11**

**2.1 Type de coagulation..... 11**

2.1.1 Coagulation acide ..... 11

2.1.2 Coagulation enzymatique ..... 12

2.1.3 Coagulation mixte..... 13

**2.2 Mécanisme d'action de la coagulation ..... 13**

2.2.1 Phase primaire ..... 13

2.2.2 Phase secondaire..... 14

2.2.3 Phase tertiaire ..... 14

**2.3 Facteurs influençant la coagulation ..... 15**

2.3.1 Effet de la température ..... 15

2.3.2 Effet du pH..... 15

2.3.3 Effet de la teneur en ions calcium (CaCl<sub>2</sub>) ..... 16

2.3.4 Effet de la concentration en enzyme..... 16

<b>3</b>	<b>Enzymes coagulants le lait .....</b>	<b>18</b>
3.1	Protéases d'origine animale .....	18
3.1.1	Présure.....	18
3.1.2	Chymosine .....	18
3.1.3	Pepsine .....	19
3.2	Protéases d'origine microbienne .....	24
3.2.1	D'origine fongique.....	24
3.2.2	D'origine bactérienne.....	24
3.3	Protéases d'origine végétale.....	24
3.3.1	Ficine.....	25
3.3.2	Complexe enzymatique .....	30

### *Matériel et méthode*

<b>1</b>	<b>Matières premières utilisées.....</b>	<b>34</b>
1.1	Lait .....	34
1.1.1	Analyse physicochimique et biochimique du lait .....	34
1.2	Extraits enzymatiques .....	36
1.2.1	Pepsine .....	36
1.2.2	Ficine.....	40
1.2.3	Rendement de l'extraction des enzymes.....	41
<b>2</b>	<b>Etude des propriétés des extraits enzymatique.....</b>	<b>42</b>
2.1	Détermination de l'activité coagulante .....	42
2.2	Détermination du temps de coagulation.....	43
2.3	Détermination de la force de coagulation.....	43
2.4	Dosage des protéines totales.....	43
2.5	Détermination de l'activité protéolytique .....	44
2.6	Détermination de l'activité spécifique .....	45
<b>3</b>	<b>Détermination des conditions optimales de coagulation .....</b>	<b>45</b>
3.1	Influence du pH.....	45
3.2	Influence de CaCl <sub>2</sub> .....	46
3.3	Influence de la température.....	46

## *Résultats et discussion*

<b>1</b>	<b>Caractérisation physico-chimique du lait (matière première) .....</b>	<b>48</b>
1.1	pH .....	48
1.2	Acidité Dornic .....	48
1.3	Epreuve de l'ébullition .....	48
<b>2</b>	<b>Récupération des échantillons .....</b>	<b>48</b>
2.1	Pepsine .....	48
2.2	Ficine .....	49
<b>3</b>	<b>Extraction des enzymes .....</b>	<b>50</b>
3.1	Rendement de l'extraction .....	50
3.1.1	Pepsine .....	50
3.1.2	Ficine.....	50
<b>4</b>	<b>Caractérisation des extraits enzymatique .....</b>	<b>51</b>
4.1	Détermination de l'activité coagulante .....	51
4.2	Détermination de la force coagulante .....	52
4.3	Dosage des protéines de l'extrait enzymatique .....	52
4.4	Dosage de l'activité spécifique .....	53
4.5	Mesure de l'activité protéolytique.....	53
4.6	Détermination des conditions optimales de coagulation.....	55
4.6.1	Influence du pH .....	55
4.6.2	Influence de température.....	59
4.6.3	Influence de la concentration en CaCl <sub>2</sub> .....	63
	<b>Conclusion.....</b>	<b>67</b>
	<b>Résumés.....</b>	<b>70</b>
	<b>Références bibliographique.....</b>	<b>74</b>
	<b>Annexes.....</b>	<b>.....</b>

## Liste des abréviations

**AC** : Activité coagulante.

**AFNOR** : Association française de normalisation.

**Asp** : Aspartate.

**B.S.A** : Sérum albumine bovine.

**°C** : Degrée Celsius.

**CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de calcium.

**C.E** : Commission des enzymes.

**CMP** : Cséinomacropéptide.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>** : Tartrate de sodiumpotassium.

**CuSO<sub>4</sub>** : Sulfate de cuivre.

**Cys** : Cystéine.

**Da, kDa** : Dalton, kilo Dalton.

**Dornic (°D)** : Décigramme d'acide lactique par litre.

**F**: Force coagulante.

**g** : gramme.

**HCl** : Chlorure d'hydrogène.

**His** : Histidine.

**IUBMB** : Internationale de biochimie et biologie moléculaire.

**κ** : Kappa, **κ-CN** : kappa caséine.

**L** : Litre.



**Met** : Méthionine.

**NaOH** : Hydroxyde de sodium.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium.

**NaCl** : Chlorure de sodium.

**NaHCO<sub>3</sub>** : Sodium hydrogen carbonate.

**OGM** : Organismes génétiquement modifiés.

**PH** : Potentiel d'hydrogène.

**Phe** : Phénylalanine.

**R (%)** : Rendement exprimé en pourcentage

**RGO** : Reflux gastro-oesophagien.

**S** : Seconde.

**Ser** : Sérine.

**TCA** : Acide trichloracétique.

**Trp** : Tryptophane.

**Tyr** : Tyrosine.

**UAC** : Unité D'activité Coagulante.

**UP** : Unité de présure.

**Val** : Valine.



## Liste des figures

Nº	Titre	Page
<b>Figure 01</b>	Représentation d'une submicelle (A) et d'une micelle (B).....	08
<b>Figure 02</b>	Les gels laitiers et le phénomène de coagulation par..... acidification	13
<b>Figure 03</b>	Mécanisme de la coagulation du lait par la présure.....	14
<b>Figure 04</b>	Phases de coagulation de lait et formation de réseau.....	16
<b>Figure 05</b>	Appareil digestif du poulet.....	22
<b>Figure 06</b>	Complexe stomacal du poulet.....	23
<b>Figure 07</b>	le figuier <i>Ficus carica</i> .....	27
<b>Figure 08</b>	Bourgeon terminal de figuier.....	28
<b>Figure 09</b>	Image représentative du Latex du figuier.....	29
<b>Figure 10</b>	les feuilles de figuier.....	29
<b>Figure 11</b>	les fruits du figuier.....	30
<b>Figure 12</b>	la fleur de figuier.....	31
<b>Figure 13</b>	Rameaux fructifères de figuier.....	31
<b>Figure 14</b>	La mesure de pH de lait par le pH mètre.....	36
<b>Figure 15</b>	Test d'acidité titrable de lait reconstitué.....	37
<b>Figure 16</b>	Préparation des proventricules.....	38
<b>Figure 17</b>	Hachage et macération sous agitation.....	38
<b>Figure 18</b>	Filtration du macérât et l'activation du pepsinogène .....	39
<b>Figure 19</b>	Centrifugation de pepsinogène.....	39
<b>Figure 20</b>	Récupération et l'ajustement du pH.....	40
<b>Figure 21</b>	Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet.....	40
<b>Figure 22</b>	Récupération du latex.....	41

<b>Figure 23</b>	Les couches de latex après la centrifugation.....	42
<b>Figure 24</b>	L'extrait brut de la pepsine.....	50
<b>Figure 25</b>	L'extrait brut de la ficine.....	51
<b>Figure 26</b>	Effet du pH sur l'activité coagulante de la pepsine.....	56
<b>Figure 27</b>	Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait..... de la ficine	57
<b>Figure 28</b>	Effet du pH sur le temps de floculation de la pepsine et la ficine...	58
<b>Figure 29</b>	Effet du pH sur l'activité coagulante des deux extraits..... enzymatiques	59
<b>Figure 30</b>	Activité coagulante de la pepsine de poulet en fonction de la..... température	60
<b>Figure 31</b>	Influence de la température sur l'activité coagulante de la ficine...	61
<b>Figure 32</b>	Temps de floculation de la pepsine de poulet et la ficine en..... fonction de la température	62
<b>Figure 33</b>	Influence de la température du lait sur l'activité coagulante..... de la ficine et la pepsine	63
<b>Figure 34</b>	Influence de la concentration en $\text{CaCl}_2$ sur l'activité coagulante... de la pepsine	64
<b>Figure 35</b>	Effet de la variation de la concentration en $\text{CaCl}_2$ sur l'activité.... coagulante du lait l'extrait de la ficine	65
<b>Figure 36</b>	Influence de la variation de la concentration en $\text{CaCl}_2$ du lait..... sur le temps de floculation des deux enzymes étudiées	66
<b>Figure 37</b>	Influence de la variation de la concentration en $\text{CaCl}_2$ du lait..... sur l'activité coagulante des deux extraits enzymatiques	67
<b>Figure 38</b>	Courbe d'étalonnage de la Tyrosine.....	
<b>Figure 39</b>	Courbe d'étalonnage de la BSA.....	



## Liste des tableaux

<b>Nº</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 01</b>	Composition générale du lait en g par 100 ml.....	06
<b>Tableau 02</b>	Caractéristiques physico-chimiques du substrat de..... Berridge.	49
<b>Tableau 03</b>	Principales caractéristiques des enzymes extraites.....	55

### Introduction

Le lait est un produit essentiel aux premiers stades de la vie des mammifères, il est reconnu pour sa qualité nutritionnelle exceptionnelle, résultant de sa composition riche et diversifiée. Toutefois, sa fragilité le rend susceptible de se détériorer facilement, ce qui restreint sa durée de conservation et son utilisation. Ainsi, la préservation du lait est devenue une préoccupation cruciale, conduisant à l'émergence des premières techniques de transformation laitière, telles que la fabrication de fromage (**Jeantet et al., 2007**).

La première étape cruciale dans la fabrication du fromage est la coagulation, considérée comme déterminante pour la réussite de toute préparation.

La présure a été l'agent coagulant le plus largement utilisé en fromagerie. Composée principalement de chymosine (80%) et de pepsine (10-20%).

L'augmentation de la production et de la consommation de fromage, combinée à l'incapacité de suivre la cadence en termes de production de présure, a conduit à une pénurie mondiale de cet agent coagulant, entraînant ainsi des fluctuations significatives de son prix. Ces problèmes sont particulièrement exacerbés dans les pays musulmans pour des raisons religieuses liées aux rituels d'abattage et à l'interdiction de certains facteurs de coagulation comme la pepsine porcine (**Siar et al., 2012**). Cette situation a stimulé la recherche de substituts à la présure.

Effectivement, diverses protéases issues de sources végétales, animales, bactériennes et fongiques ont été suggérées, mais seul un nombre restreint a été au-delà du stade expérimental.

Parmi les enzymes végétales de substitution, on trouve la cardosine extraite du cardon (*Cynara cardunculus*), la ficine du latex du figuier (*Ficus caricas*), la papaine des feuilles du papayer (*Carica papaya*), la broméline des tiges d'ananas (*Ananas comasus*) et la calotropine du *Calotropis procera* (**Aworh et Nakai, 1986 ; Aworh et Muller, 1987 ; Vioque et al., 2000 ; Sousa et Malcata, 2002**).

Le latex du figuier *Ficus carica* est largement utilisé dans différentes régions d'Algérie, en particulier en Kabylie, comme agent coagulant dans la préparation d'un fromage connu sous le nom Agugli.

D'autre part, plusieurs enzymes coagulantes d'origine bactérienne et fongique sont utilisées comme substituts à la présure, principalement au Japon et aux États-Unis (**Ramet, 1997 ; Mandy et al., 2011**).

Outre les substituts végétaux et microbiens, il existe des substituts d'origine animale. Cette catégorie comprend les pepsines de différentes espèces animales, principalement bovines, ovines, caprines, porcines, aviaires et marines (**Jarmul et al., 1982 ; Martin et al., 1982 ; Anifantakis et Kandarakis, 1983 ; Alais, 1984 ; Haard, 1992 ; Cuvelier, 1993 ; Ramet, 1997**).

La pepsine de poulet émerge comme un substitut de présure approprié, en raison de la croissance significative du secteur avicole en Algérie (253 000 tonnes en 2004 contre 194 000 tonnes en 1990), et de la disponibilité de plus en plus fiable d'une matière première jusqu'ici sous-exploitée.

Étant l'unique enzyme sécrété par les glandes gastriques du proventricule (**Larbier et Leclercq, 1992**), la pepsine présente de nombreuses caractéristiques qui la rendent particulièrement attrayante, notamment dans la fabrication de fromages (**Bohak, 1969**). Cette enzyme a été utilisée depuis longtemps pour la production de fromages traditionnels algériens, tels que le fromage Takammérit, consommé dans les régions du sud de l'Algérie et préparé en utilisant la pepsine de poulet (**Siar, 2014**).

Plusieurs facteurs peuvent influencer la coagulation du lait lors du processus de fabrication du fromage, tels que le pH du lait, la température, la concentration en  $\text{Ca}^+$  et la quantité de coagulants utilisée (**Lombardi et al., 2019 ; García et al., 2020**).

Dans notre étude, une analyse comparative de l'extraction et de la caractérisation des enzymes pepsine de poulet, obtenues à partir des proventricules de poulets, et ficine, extraite du latex du figuier, suivie de leur utilisation pour évaluer l'activité de coagulation du lait et l'impact de certains facteurs sur celle-ci sont entreprises.

Le présent travail comporte une partie bibliographique qui offre un aperçu général sur le lait, la coagulation du lait et les protéases, en mettant particulièrement l'accent sur la ficine et la pepsine.

Quant à la partie pratique, elle comprend la collecte des matières premières (latex de figuier et proventricules de poulets), l'extraction et la caractérisation de l'extrait brut de ficine et de pepsine, ainsi que la recherche des conditions optimales de leur activité coagulante. Les différents résultats obtenus sont présentés et discutés en détail.



***Partie***  
***Bibliographique***

# **CHAPITRE 01 :**

# **Le lait**

## 1 Lait

Le lait est le produit obtenu par la traite complète et régulière d'une femelle laitière en bonne santé, bien nourrie et non stressée. Les laits provenant d'animaux malades, mal nourris ou contenant du colostrum ne conviennent pas à la consommation humaine. Le lait doit être collecté dans des conditions d'hygiène strictes, sans présenter de couleur ou d'odeur anormales, et sans la présence de micro-organismes pathogènes (**Lecoq, 1965**).

Le lait est un liquide blanc opaque, parfois avec une teinte légèrement bleutée ou jaunâtre, caractérisé par une odeur subtile et un goût doux. Son pH est légèrement acide, se situant entre 6,6 et 6,8, ce qui le rapproche de la neutralité. Il est produit par les glandes mammaires des femelles mammifères après la naissance pour nourrir les nouveau-nés (**Marcel, 2007**).

### 1.1 Composition

Le lait, en tant que produit d'origine biologique, est extrêmement sujet à l'altération, à la fois par des micro-organismes et des enzymes. Il se compose de plusieurs phases : une phase aqueuse qui contient principalement du lactose et des minéraux, une phase lipidique dispersée composée de globules gras, et une phase protéique sous forme de micelles de caséines. La composition de ce liquide précieux varie en fonction de divers facteurs liés aux animaux, notamment la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison et l'âge (**Vignola, 2002**). Ces éléments majeurs sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Composition générale du lait en g par 100 ml (**Vignola, 2002**).

Composants majeurs	Valeur moyenne
Eau	87.5
Matières grasses	3.7
Protéines	3.2
Glucides	4.6
Minéraux	0.9

### 1.1.1 Eau

L'eau est le composant le plus crucial du lait. Elle sert de milieu dans lequel tous les autres composants du lait, tels que les solides totaux, se trouvent dissous ou en suspension (**Kailasapathy, 2015**).

Elle existe sous deux formes dans le lait : l'eau libre, qui représente 96% et agit comme solvant pour les composants hydrophiles tels que les glucides, les minéraux, les protéines solubles et certaines vitamines. Cette forme d'eau est polaire en raison de son dipôle de doublets d'électrons libres. Ensuite, il y a l'eau liée, qui constitue 4% du lait. Elle est impliquée dans la structure des micelles de caséines, ainsi que liée au lactose et aux sels. La quantité d'eau liée aux protéines est fixée à la surface des micelles, formant une enveloppe d'hydratation qui les protège et les stabilise (**Ilboudo *et al.*, 2012 ; Kailasapathy, 2015**).

### 1.1.2 Protéines

Les protéines sont indispensables au bon fonctionnement des cellules vivantes et elles représentent une composante significative à la fois du lait et des produits laitiers (**Beaudryet *et al.*, 2006**). La teneur en protéines du lait varie généralement de 32 à 35 gs par litre. Les protéines du lait sont classées en deux catégories en fonction de leur solubilité dans l'eau et de leur stabilité (**Ilboudo *et al.*, 2012**).

#### 1.1.2.1 Protéines insolubles

Il s'agit des caséines qui représentent environ 77 % des protéines totales contenues dans le lait.

Les composés azotés du lait sont principalement constitués de caséines, qui sont des phosphoprotéines présentes sous forme de micelles de caséinate de calcium dans la phase colloïdale. Elles sont liées à la chaîne latérale de la sérine, formant ainsi des groupes phosphoséryl (**Cayot et Lorient, 1998**).

La caséine totale, qui est le groupe protéique précipitant à un pH de 4,6 à 20 °C.

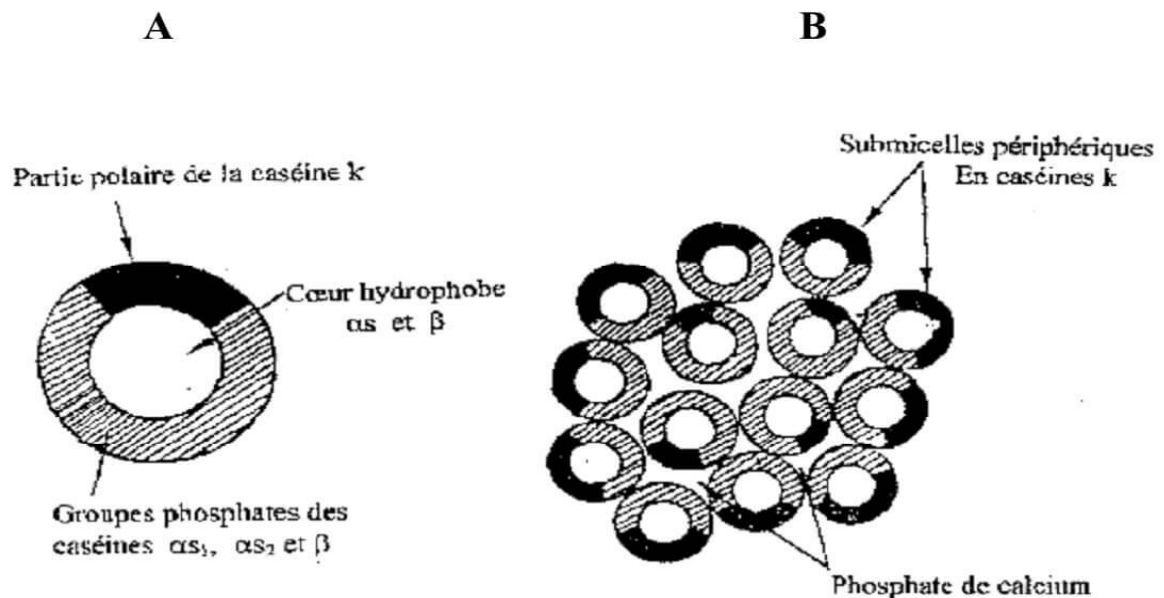
Les caséines sont des polypeptides phosphorés principalement associés à des minéraux, notamment le calcium, mais aussi le phosphate, le magnésium et le citrate, formant ainsi des micelles de phosphocaséinate de calcium.

En mélange, elles forment des complexes qui n'assemblent qu'un petit nombre de molécules en l'absence de calcium. En présence de calcium, l'association est très forte, et les unités formées agrègent plusieurs milliers de molécules, formant ainsi les micelles de caséine native dispersées dans la phase aqueuse du lait. Une des propriétés les plus significatives des micelles de caséine est leur capacité à se déstabiliser par hydrolyse enzymatique, ce qui permet la coagulation du lait, constituant ainsi le processus fondamental de la fromagerie (Mietton *et al.*, 1994).

Selon Schmidt (1980), la micelle se composerait d'un groupe de sous-unités appelées submicelles, qui sont exclusivement protéiques et dont la composition varie. Ces submicelles seraient liées entre elles par des éléments minéraux tels que le phosphate de calcium et de magnésium (Figure 01).

Les submicelles sont supposées avoir un noyau hydrophobe, composé de parties apolaires des caséines, et une enveloppe hydrophile de nature polaire, constituée de segments de chaînes fortement chargées comprenant les résidus phosphoséryls des caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , et  $\beta$ , ainsi que la partie COOH terminale de la caséine  $\kappa$  (Mietton *et al.*, 1994).

Ces submicelles sont structurées de sorte que les pôles hydrophobes se trouvent à l'intérieur, entourant le calcium et le phosphate minéral. La caséine  $\kappa$ , présente à l'intérieur de la micelle, joue un rôle protecteur grâce à sa faible teneur en phosphore et à son abondance en glucides. Elle est hydrophile et contribue à la stabilité de la micelle (Gourseaud, 1993).



**Figure 01 :** Représentation d'une submicelle (A) et d'une micelle (B), selon Schmidt (1982).

### 1.1.2.2 Protéines solubles

Dites protéines du lactosérum, les protéines solubles du lait, se retrouvent sous forme de solution colloïdale. Les principales protéines sont les immunoglobulines (environ 13 %) : la sérum albumine bovine (SAB) (environ 7 %) et la lactoferrine (environ 4 %). De plus, diverses enzymes sont présentes dans le sérum (**Amiot *et al.*, 2002**).

À leur pH isoélectrique, les protéines du lactosérum demeurent solubles contrairement à la plupart des autres protéines ; ainsi, elles se déplacent avec le lactosérum lors de la coagulation du lait (**Vierling, 1999**), mais elles précipitent sous l'effet de la chaleur (**Amiot *et al.*, 2002**).

### 1.1.3 Glucides

Le principal sucre présent dans le lait est le lactose, représentant environ 40 % de la matière sèche du lait. En tant que disaccharide, il joue un rôle crucial dans la fabrication de divers produits laitiers car il est sujet à la fermentation (**Mahaut *et al.*, 2000**).

D'autres types de glucides, tels que le glucose et le galactose, peuvent également être présents en petites quantités, résultant de la décomposition du lactose (**Vignola, 2002**).

### 1.1.4 Matière grasse

La matière grasse du lait est l'une des plus complexes parmi toutes les graisses naturelles. Elle se présente sous forme de globules gras dans le lait, et sa quantité ainsi que sa composition en acides gras dépendent de plusieurs facteurs, notamment l'espèce animale et le stade de lactation. Ces acides gras peuvent provenir de l'alimentation de l'animal ou de l'activité microbienne dans le rumen. Le lait de vache contient en moyenne près de 39 g de lipides par litre, avec environ 70 % de la fraction lipidique composée d'acides gras saturés et 30 % d'acides gras insaturés (**Romain *et al.*, 2008 ; Pereira, 2014**).

### 1.1.5 Vitamines

Le lait est principalement constitué des vitamines A, B et B2, ainsi que d'une faible quantité de vitamine C (**Vignola, 2002**).

Les vitamines sont généralement classées en deux grandes catégories : les vitamines hydrosolubles et les vitamines liposolubles.

### 1.1.5.1 Les vitamines hydrosolubles

Le lait est généralement riche en vitamines B et C, indépendamment de la saison et du régime alimentaire

### 1.1.5.2 Les vitamines liposolubles

Les taux de vitamines liposolubles A, D, E et K dépendent de divers facteurs, notamment le régime alimentaire. Par exemple, le lait contient une concentration plus élevée de vitamine A lorsque les animaux sont nourris avec un régime riche en herbes fraîches (**Roy, 1951**).

### 1.1.6 Matières minérales

La concentration des minéraux dans le lait, après incinération, varie généralement de 0,60 % à 0,90 % (**Vignola, 2002**).

Le lait est une source abondante de minéraux tels que le phosphore, le magnésium, le potassium, le zinc, le sodium, le chlore et bien sûr, le calcium (**Adoui et al., 2022 ; Alais, 1984**).

Les principaux éléments chimiques (calcium, potassium, magnésium et sodium) réagissent avec des composés acides tels que les protéines, les citrates, les phosphates et les chlorures, formant ainsi des sels. Leur rôle crucial est de contribuer à l'organisation micellaire des caséines (**Romain et al., 2008**).

## 1.2 Facteurs influençant la composition du lait

Les variations de la composition du lait sont causées par divers facteurs. Certains sont liés à l'animal, tels que ses caractéristiques génétiques, son stade de lactation, son état de santé...etc.

D'autres facteurs sont externes, comme les pratiques d'élevage, la saison, le climat, l'alimentation, l'hygiène ainsi que les méthodes de traite.

# **CHAPITRE 02 :**

# **La coagulation du**

# **lait**



## 2 Coagulation du lait

La coagulation du lait, selon **Brule et Lenoir (1984)**, résulte d'une série de modifications physico-chimiques des micelles de caséine sous l'action d'enzymes protéolytiques et/ou d'acide lactique. Ces modifications conduisent à la formation d'un réseau protéique spécifique appelé coagulum ou gel.

Le processus de coagulation est déclenché par l'addition d'un coagulant au lait de fabrication, à des niveaux spécifiques, et dans des conditions de température et de pH soigneusement contrôlées (**Boudjenah, 2012**).

Cela correspond à une perturbation de l'état micellaire originel des caséines, lesquelles agglomèrent ensuite pour former un caillot lactique ou de présure, retenant des proportions variables de matières grasses, de minéraux, d'eau et de composants solubles en fonction des circonstances. On peut provoquer la coagulation par acidification, par l'action d'une enzyme ou encore par l'action combinée des deux (**Vignola, 2002 ; Fox et al., 2004 ; Belitz et al., 2009**).

**Gelais et Tirard (2009)** identifient trois paramètres qui permettent de caractériser la coagulation du lait :

- Le temps de prise, également connu sous le nom de temps de floculation.
- Le taux, qui représente la vitesse du processus de raffermissement
- La fermeté maximale du gel.

### 2.1 Type de coagulation

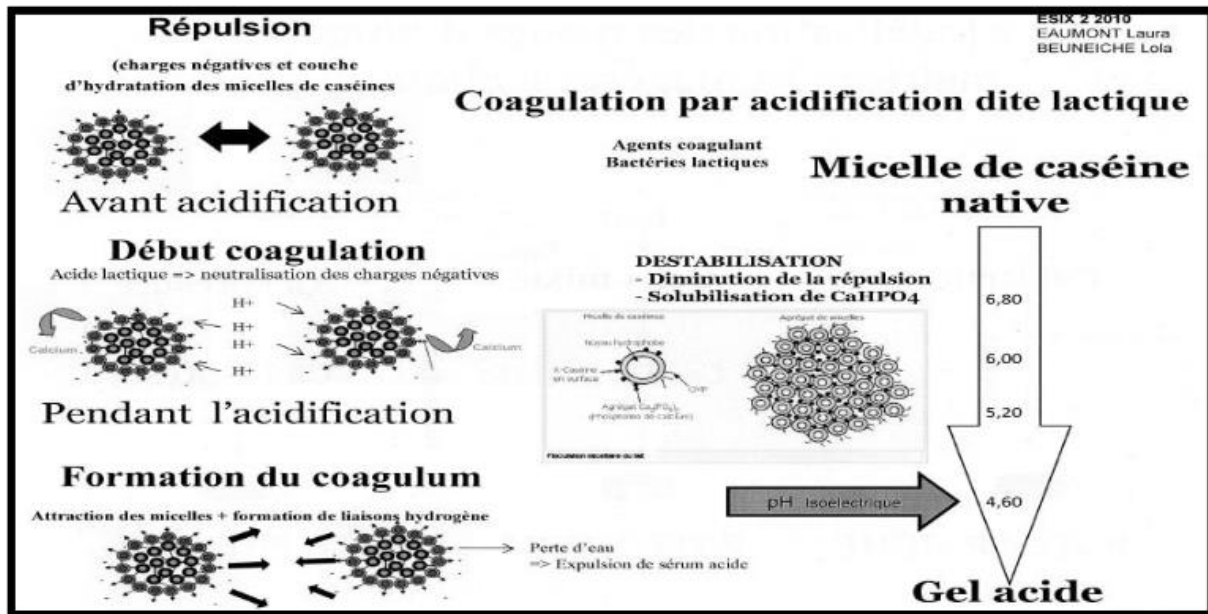
#### 2.1.1 Coagulation acide

La coagulation acide est un processus qui implique la précipitation des caséines à leur point isoélectrique (**P<sub>Hi</sub>= 4,6**). Cela peut être réalisé de deux manières :

- Par acidification biologique, où des bactéries productrices d'acide lactique sont utilisées (bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains) (**Mahaut et al., 2005**).

- Par acidification chimique, qui peut être effectuée en injectant du  $\text{CO}_2$  ou en ajoutant de la gluconodeltalactone (Mahaut *et al.*, 2000).

Le gel formé montre une perméabilité adéquate, mais il est très friable en raison d'une structure de réseau insuffisante, ce qui se traduit par une élasticité et une plasticité presque inexistantes (Figure 02).

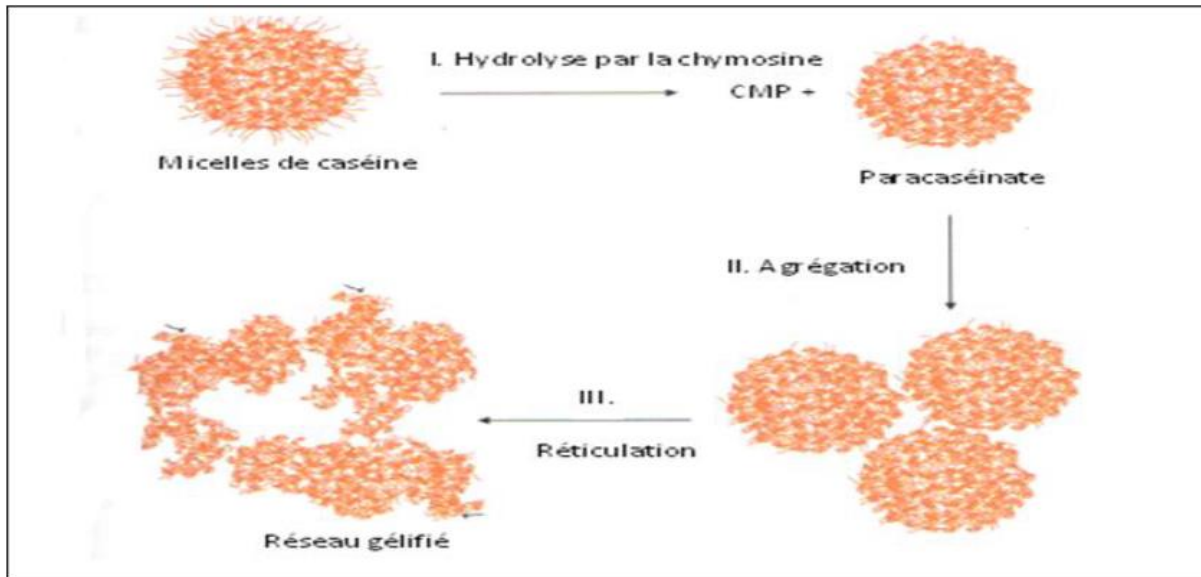


**Figure 02:** Les gels laitiers et le phénomène de coagulation par acidification (Ronez, 2012).

### 2.1.2 Coagulation enzymatique

Différentes enzymes protéolytiques ont la capacité de provoquer la coagulation du lait. Cependant, la présure (mélange de chymosine et pepsine) demeure la plus couramment employée.

À une température d'environ  $35^\circ\text{C}$ , la présure hydrolyse spécifiquement la caséine  $\kappa$ . Ce processus de protéolyse entraîne la déstabilisation des micelles de caséine, libérant deux molécules distinctes : la para-caséine  $\kappa$  et un macropeptide, également appelé caséinoglycopeptide soluble. Ce dernier contient entre 20 à 30 % de glucides et une séquence de 64 acides aminés (Vierling, 2003). (Figure 03).



**Figure 03** : Mécanisme de la coagulation du lait par la présure (Jeantet, 2007)

### 2.1.3 Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de l'acidification du lait et de la présure. Cette méthode combine deux principes : l'acidité du lait et l'ajout d'une enzyme coagulante.

Le coagulum obtenu, présente des caractères intermédiaires entre ceux des gels lactiques et de la présure. Il est caractérisé par une souplesse et une contractibilité moins grande, de fermeté et friabilité plus accentuées que celles des gels de présure (Veisseyre, 1975).

## 2.2 Mécanisme d'action de la coagulation

On distingue 3 phases de coagulation :

- Phase primaire ou hydrolyse enzymatique.
- Phase secondaire ou agrégation des micelles.
- Phase tertiaire ou réticulation du gel (Mahaut *et al.*, 2003).

### 2.2.1 Phase primaire

La phase enzymatique implique une protéolyse partielle de la caséine  $\kappa$ , se concentrant sur la liaison entre Phe105 et Met106. Cette action divise la chaîne peptidique de la caséine  $\kappa$  en deux segments distincts :

- Le segment 1-105, appelé paracaséine  $\kappa$ , conserve des caractéristiques hydrophobes et basiques, et reste incorporé dans la micelle.
- Le segment 106-169, également connu sous le nom de caséinomacropeptide (CMP), est très hydrophile et acide, et se retrouve dans le lactosérum (Fox *et al.*, 2000 ; McSweeney, 2004).

Lorsque le caséinomacropeptide (CMP) se détache de la caséine  $\kappa$ , cela entraîne une diminution des charges négatives de la micelle ainsi qu'une réduction de son degré d'hydratation due à la perte de sa partie hydrophile. Cette suppression de deux facteurs essentiels pour la stabilité des caséines en solution favorise l'établissement de liaisons entre les micelles modifiées, ce qui permet leur agrégation et, finalement, la formation d'un gel. Cela marque le début de la phase de coagulation.

### 2.2.2 Phase secondaire

A pH 6,6, lorsque 80 à 90% de la caséine  $\kappa$  est hydrolysée (correspondant à 60% du temps nécessaire pour observer virtuellement la coagulation), l'agrégation se met en place par des liaisons électrostatiques et hydrophobes entre les micelles modifiées (Mahaut *et al.*, 2000).

### 2.2.3 Phase tertiaire

L'agrégation commence lorsque 85 à 90 % de la caséine  $\kappa$  est hydrolysée, et elle atteint sa vitesse maximale lorsque toute la caséine  $\kappa$  est hydrolysée. Des liaisons électrostatiques et hydrophobes contribuent à la formation du gel. Le calcium ionique et le phosphate de calcium colloïdal jouent également un rôle crucial dans ce phénomène.

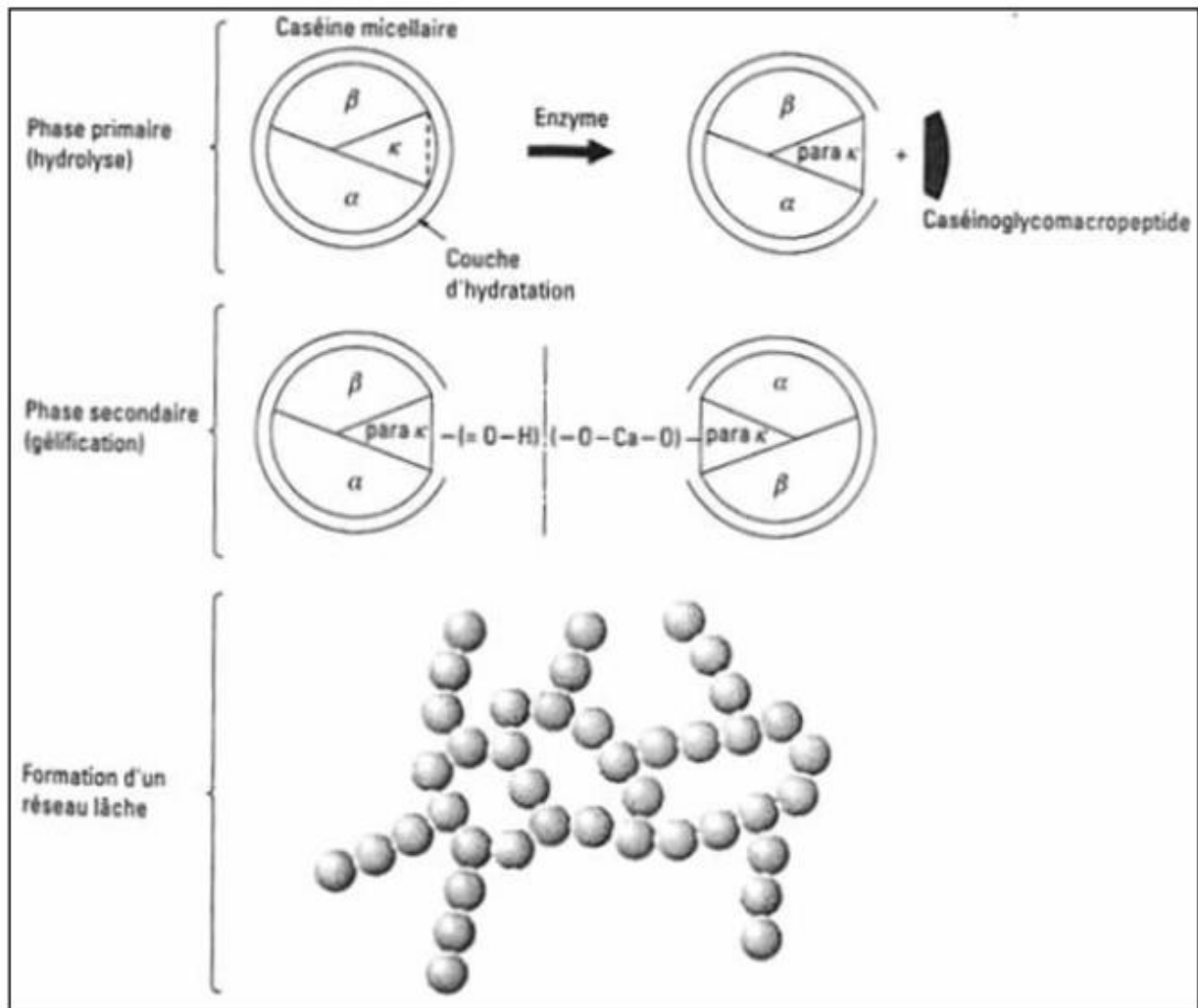


Figure 04 : Phases de coagulation de lait et formation de réseau.

## 2.3 Facteurs influençant la coagulation

### 2.3.1 Effet de la température

Le phénomène de coagulation est fortement dépendant de la température (Dybowska *et* Fujio, 1996).

En dessous de 10°C, le lait ne coagule pas. Entre 20 et 40-42°C, la formation du coagulum s'accélère progressivement, mais à des températures plus élevées, le processus ralentit. Au-delà de 65°C, il n'y a plus de coagulation car l'enzyme est désactivée (Dybowska *et* Fujio, 1996 ; Brulé *et al.*, 2006 ; cité dans Isselnane., 2014).

### 2.3.2 Effet du pH

L'influence de pH joue un rôle très important sur le temps de coagulation (Najera *et al.*, 2003). En passant de pH 6.7 à 5.6 la vitesse de coagulation se multiplie par 30, résulte l'élévation de la vitesse d'hydrolyse nécessaire pour

l'agrégation. À pH supérieur à 7, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme étant rapidement inactivée (Lenoir *et al.*, 2006).

### 2.3.3 Effet de la teneur en ions calcium (CaCl<sub>2</sub>)

L'adjonction de chlorure de calcium au lait, réduit le temps de coagulation et renforce la fermeté du coagulum (Montilla *et al.*, 1995 ; Balcones *et al.*, 1996 ; Solorza et Bell, 1998).

Cependant, à des concentrations élevées de CaCl<sub>2</sub> ( $\geq 0,3M$ ), le temps de coagulation peut être prolongé (Mc Mahon *et al.*, 1984). De plus, l'ajout de CaCl<sub>2</sub> entraîne une diminution du pH du lait, ce qui se traduit par une augmentation du taux d'agrégation des protéines (Gastaldi *et al.*, 1994 ; Isselnane, 2014)

### 2.3.4 Effet de la concentration en enzyme

La concentration en enzyme est inversement proportionnelle au temps de coagulation (Horne *et Muir*, 1994). La fermeté du gel augmente avec la concentration en présure (St-Gelais *et Tirard-Collet*, 2002).

# **CHAPITRE 03 :**

## **Les agents coagulants le lait**

### 3 Enzymes coagulants le lait

Les protéases sont des enzymes qui possèdent la capacité d'hydrolyser les protéines en coupant une ou plusieurs liaisons peptidiques. Elles sont désignées sous le terme de peptidases par l'Union Internationale de Biochimie et Biologie Moléculaire (IUBMB), bien qu'elles soient également connues sous d'autres noms tels que protéinases ou enzymes protéolytiques (**Benkahoul, 2016**).

La commission des enzymes (C.E.) de l'IUBMB classe les enzymes en Sept catégories (oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, translocases, isomérases et ligases). Les protéases sont classées dans la sous-classe 4 des hydrolases, avec le code E.C : 3.4.X.X (**Benkahoul, 2016**).

#### 3.1 Protéases d'origine animale (protéases gastriques)

Les protéases d'origine animale sont employées dans l'industrie alimentaire, telles que la présure, ou dans le secteur médical, comme la trypsine et la chymotrypsine. Ces dernières sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs (**Rao et al., 1998**).

##### 3.1.1 Présure

Un agent de coagulation pour le lait d'origine animale, est extrait de la caillette de veaux non sevrés. Elle est principalement composée de 80% de chymosine et de 20% de pepsine. Son utilisation est courante dans le processus de coagulation du lait lors de la fabrication des fromages (**Collin, 2015**).

##### 3.1.2 Chymosine

Est la principale protéase responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale du lait. À l'état latent, elle est sécrétée sous forme de prochymosine dans la caillette. Lorsqu'elle est exposée à l'acidité du milieu, elle devient active. La chymosine est une holoprotéine faisant partie du groupe des protéases acides. Elle maintient sa stabilité dans une plage de pH allant de 5,3 à 6,3, devient inactive aux pH environnants 7,5 et se dénature à un pH de 8. Son inactivation thermique se produit à 50°C, et elle est totalement inactive à 61°C (**Bouyoucef, Taouzin et al., 2016**).



### 3.1.3 Pepsine

La pepsine est une enzyme qui présente des similitudes avec la présure (**Alais et Novak, 1968**). Elle constitue un enzyme coagulant, principalement utilisée dans l'industrie alimentaire. Les espèces porcine, ovine, bovine, avicole et aquatique sont ses principales sources (**Benyahia-Krid et al., 2016**). Elle hydrolyse la plupart des protéines naturelles telles que la caséine, la globuline, et certaines enzymes telles que la trypsine, la papaïne et les amylases.

La pepsine est une protéase acide qui se trouve dans le suc gastrique de tous les mammifères et des oiseaux, sa principale particularité réside dans sa capacité à être hautement active dans un environnement acide. Elle conserve son activité même à un pH de 1, où de nombreuses autres enzymes et protéines subissent une dénaturation rapide (**Zidoune et Adoui, 2017**).

Il existe plusieurs types de pepsine, mais le type principal est la pepsine A. La pepsine A est produite par les cellules principales de la muqueuse gastrique, et elle est activée dans un environnement acide, tel que celui de l'estomac. Une fois activée, elle aide à décomposer les protéines alimentaires en peptides plus petits, facilitant ainsi leur digestion.

La pepsine revêt un intérêt particulier car elle a été la première enzyme découverte. Son nom a été attribué par Theodor Schwann (1810 - 1882) en 1836, dérivant du terme "pepsine" utilisé dans les écrits hippocratiques pour désigner la digestion. Au XIX<sup>e</sup> siècle, il a été démontré par les scientifiques que la pepsine décompose les protéines en « peptones » (**Fruton, 2002**).

#### 3.1.3.1 Origine

La pepsine est l'une des principales enzymes protéolytiques du système digestif. Elle est présente dans le suc gastrique à une concentration d'environ 400 mg/L. La pepsine est initialement produite sous forme inactive, appelée pepsinogène, dans la paroi de l'estomac. Elle est ensuite activée en pepsine par l'acide chlorhydrique (HCl) présent dans l'estomac (**Altun et Cetinus, 2007**). Le pepsinogène est une molécule à deux lobes avec des terminaux N et C, qui est stable à un pH alcalin. Cependant, lorsque le pH baisse en dessous de 5, le terminal N est éliminé, ce qui libère la pepsine active.

Les poids moléculaires de la pepsine active ainsi libérée varient généralement entre 34 et 37 kDas (**Morellon-Sterling *et al.*, 2022 ; Bougateg *et al.*, 2008**).

Il a été rapporté que le comportement de cette enzyme dans les milieux acides est soutenu par un groupe phosphore lié de manière covalente à Ser68. Il en résulte que la pepsine a une charge nette négative même à pH acide (**Sielecki *et al.*, 1990**), c'est pour cette raison que cette enzyme est très efficace dans les environnements acides (pH 1-3) (**BRENDA, 2022 ; Luo *et al.*, 2018**).

#### - Pepsine porcine

La pepsine porcine est dérivée de la muqueuse gastrique du porc et est constituée de 321 résidus d'acides aminés. Cependant, son utilisation comme agent coagulant du lait est limitée par plusieurs inconvénients. Tout d'abord, son activité est fortement dépendante du pH. Aux valeurs de pH généralement utilisées en fromagerie (pH 6,5 et température de 30°C), la pepsine porcine est partiellement inactivée. Une heure après, elle perd environ 50 % de son activité ainsi que sa forte activité protéolytique (**Cuvellier, 1993**).

#### - Pepsine bovine

La pepsine bovine, également connue sous le nom de pepsine A, est une enzyme protéolytique présente dans l'estomac des animaux adultes. Elle a une masse moléculaire de 33370 Da et est composée de 313 acides aminés (**Graindy, 1978 ; Fox, 1969 ; Mathieu, 1981**). La pepsine bovine présente une activité protéolytique similaire à celle de la chymosine. Son activité dépend du pH du milieu ; elle est généralement active dans des milieux acides, avec un pH compris entre 1,5 et 2, où son activité est maximale (**Goursaud, 1992**). En revanche, dans des milieux basiques, avec un pH supérieur à 6,3, son activité diminue rapidement et le lait ne coagule pas (**Eck *et* Gillis, 1997**).

#### - Pepsine de poulet

Les poulets ont un système digestif très simple, comprenant un estomac simple avec un sac dans l'œsophage servant de lieu de stockage pour la nourriture.

Les poulets ont pas de dents, Ils utilisent des enzymes pour décomposer les aliments en petites particules assimilables. Ceux qui ne peuvent pas être décomposés par ces enzymes ne conviennent pas aux poulets (**Aouissi *et* Brinet 2016**).

Le proventricule, ou estomac glandulaire, est essentiel pour les poulets. Il produit de l'acide chlorhydrique et de la pepsine, aidant à décomposer les glucides, l'amidon et les protéines en acides aminés (Aouissi et Brinet 2016).

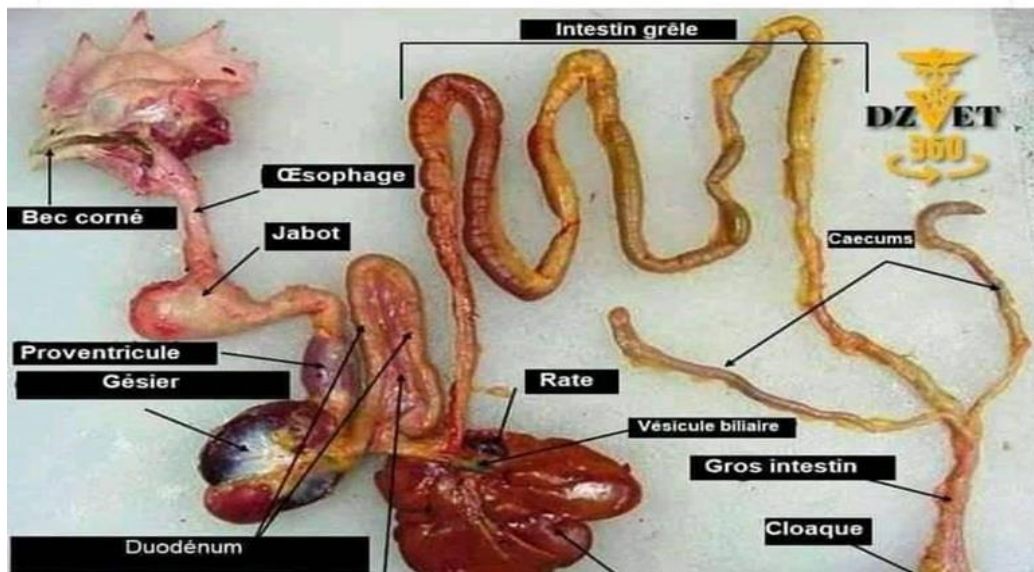
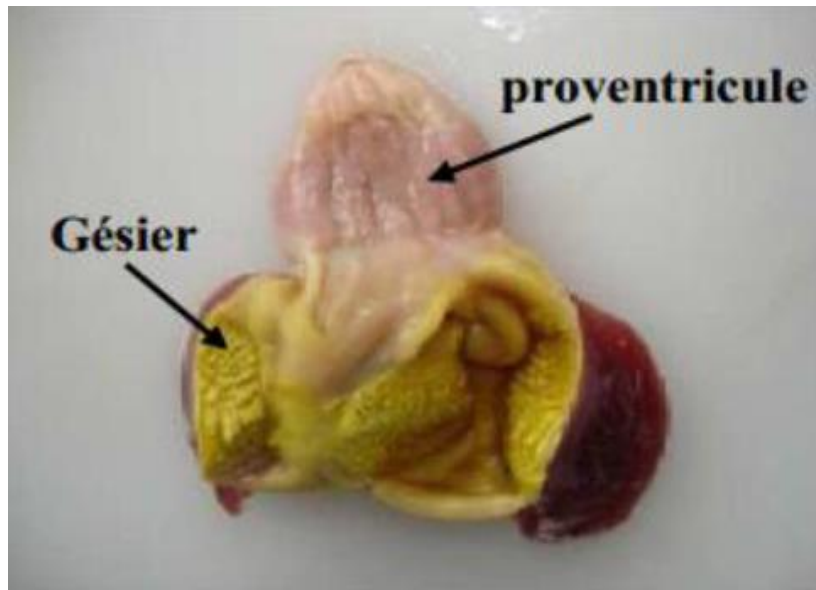


Figure 05 : Appareil digestif du poulet.

La pepsine de poulet est une enzyme extraite des proventricules du poulet, considérés comme un sous-produit de l'abattage, la figure 06 illustre l'anatomie du complexe stomacal des Gallinacés. Ces organes, d'une longueur moyenne de 3 cm, se trouvent au-dessus du gésier et sont recouverts d'une couche d'épithélium composée de cellules cylindriques visibles à l'œil nu. Ces cellules sont responsables de la sécrétion de pepsinogène et d'acide chlorhydrique (Alamareot, 1982). La figure 05 illustre l'appareil digestif du poulet, comprenant le complexe stomacal du poulet. Bohak en 1969 a estimé que le pepsinogène de poulet a un poids moléculaire de 43 kDas, comprenant 387 résidus d'acides aminés. En revanche, la pepsine purifiée présente un poids moléculaire de 35 kDas, avec 308 résidus d'acides aminés. Green et Llewelin (1973), ont confirmé ce résultat.

Selon Gordin et Rosenthal (1978), la pepsine de poulet présente une activité protéolytique plus élevée mais une stabilité thermique moindre par rapport à la chymosine.



**Figure 06** : Complexe stomacal du poulet (**Bohak, 1969**)

La pepsine de poulet est sensible aux variations de pH. Son activité optimale se situe entre pH 1,5 et 4,5. À un pH de 1,5, elle est active à 90 %, mais elle perd progressivement son activité en augmentant le pH, atteignant seulement 35 % de son activité maximale à pH 4,5. Elle reste stable jusqu'à un pH de 8, mais elle est totalement inactivée au-delà de pH 8,5. Le pH optimal de son activité sur l'hémoglobine est de 2,8, comme mentionné par **Bohak (1969)**.

### 3.1.3.2 Structure générale

La pepsine est une protéine poly tryptophane contenant cinq résidus tryptophane (Trp39, Trp141, Trp181, Trp190 et Trp300). Elle se compose de deux domaines d'homologie structurale : le domaine N-terminal (résidu 1\_172) et le domaine C-terminal (résidu 173\_326). Dans l'espace entre les domaines, il existe un site de liaison actif à la pepsine auquel de nombreuses petites molécules peuvent se lier. Il est caractérisé par deux résidus catalytiques d'aspartate (Asp32 et Asp215), dont l'une doit être protonée et l'autre déprotonée pour que la protéine soit active (**Antonov et al., 1978**).

### 3.1.3.3 Domaine d'utilisations de la pepsine

La pepsine est en effet l'une des enzymes industrielles les plus importantes, représentant environ 60 % des enzymes présentes sur le marché (**DheyauldeenSalahldin et al., 2021**). Ses applications sont vastes et touchent

diverses industries, notamment le tannage du cuir, les détergents, l'agrochimie, l'alimentation et les industries médicales (**Bougatef et al., 2008**).

En plus de ses applications industrielles, la pepsine est également largement utilisée dans la production de substances ayant des propriétés biologiques bénéfiques. Par exemple, elle est utilisée dans la production de substances ayant une capacité antioxydante élevée (**Wang et al., 2022**), des propriétés antihypertensives (**Baba et al., 2021**), des activités antibactériennes (**Choyam et al., 2021**), ainsi que d'autres activités biologiques et propriétés fonctionnelles (**Mazloomi et al., 2021**).

Dans l'industrie alimentaire, la pepsine trouve également de nombreuses applications. Elle est largement utilisée dans la production de bière, la clarification des jus et la fermentation des yaourts (**Hartmeier et al., 1979**). De plus, elle est utilisée pour la coagulation du lait dans la fabrication de fromage et d'autres aliments contenant des protéines du lait (**Meridor et Gedanken, 2014 ; Diallo et al., 2018**).

En médecine, la pepsine extraite de l'estomac des animaux est utilisée pour traiter les patients atteints de maladies gastriques. Son isolement et sa production permettent son application dans différents procédés médicaux, tels que le traitement de la dyspepsie (**Forssmann et al., 2017 ; Petersen, 2018**).

Les recherches indiquent que la pepsine trouve de nombreuses applications dans la production d'hydrolysats de protéines et la libération de peptides (**Vervaeke et al., 1989 ; Palma-Albino et al., 2021**). De plus, le traitement par la pepsine entraîne souvent une diminution de l'allergénicité de certaines protéines, ce qui joue un rôle crucial dans la réduction du risque d'allergie causée par les séquences de protéines sensibilisantes atteignant la lumière intestinale (**Zhang et al., 2020 ; Azdad et al., 2018**). Cette enzyme contribue ainsi à réduire l'hypersensibilité à certaines protéines, ce qui est étroitement lié à l'une de ses fonctions dans le système digestif humain (**Zhang et al., 2020 ; Azdad et al., 2018**).

Par ailleurs, la pepsine est un déterminant majeur du reflux gastro-œsophagien (RGO). Elle a été utilisée pour développer des tests diagnostiques simples et rapides pour cette condition (**Johnston et al., 2018**). En outre, elle joue un rôle physiopathologique dans l'hypertension et la surexpression de la cathepsine D en

tant qu'indicateur pronostique de l'agressivité de la tumeur mammaire chez les patientes avec un diagnostic ganglionnaire négatif (Da Silva Gomes *et al.*, 2002).

### 3.2 Protéases d'origine microbienne

La recherche sur les enzymes de remplacement de la présure a porté également sur la production d'enzymes coagulants le lait d'origine microbienne de deux types : fongique et bactérien.

#### 3.2.1 D'origine fongique

Les enzymes d'origine fongiques sont largement utilisées dans l'industrie fromagère. Les recherches menées par de nombreux chercheurs, tels que **Belhamiche (2005)** et **Nouani (2009)**, ont produit des résultats comparables à ceux obtenus avec la présure. Parmi Les principales moisissures connus depuis longtemps et utilisés à grande échelle dans l'industrie figurent le *Mucor pusillus*, le *Mucor miehei* et l'*Endothia parasitica*. Les coagulases du genre *Mucor* ont été largement employées dans la fabrication de divers fromages.

#### 3.2.2 D'origine bactérienne

Certains auteurs, comme **Chelal (1998)** et **Matoub (2000)**, ont étudié les enzymes d'origine bactérienne. Les extraits obtenus présentent des caractéristiques cinétiques relativement similaires à celles de la présure traditionnelle. Le genre *Bacillus* est particulièrement utilisé, notamment *Bacillus cereus* et *Bacillus polymexa*.

Toutefois, les enzymes d'origine microbienne présentent quelques inconvénients, notamment leur potentiel de toxicité, leur coût, ainsi que les préoccupations liées aux organismes génétiquement modifiés (OGM) dans certains pays comme l'Allemagne et les Pays-Bas.

### 3.3 Protéases d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale ont été identifiées et étudiées chez plusieurs familles végétales, parmi eux les *Asteraceae*, les *Caricaceae*, les *Moraceae*, les *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae* et *Euphorbiaceae* (**Domsalla et Melzig, 2008**). Il y a plusieurs plantes sont utilisées pour isoler les enzymes protéolytiques (**Hogan et al., 2009**). Les enzymes protéolytiques d'origine végétale les plus pertinentes dans le domaine de la technologie laitière sont, par

ordre d'importance, la papaine extraite du fruit de la plante tropicale *Carica papaya*, la bromélaïne extraite de l'ananas (*Ananas comosus*) et la ficine extraite de la figue (*Ficus glabrata*) (Cuvellier, 1993).

Ces protéases capables d'obtenir des hydrolysats de bonne qualité mais leur production est effectuée par plusieurs facteurs externes comme : les conditions de culture, le cycle de croissance, les contraintes climatiques, ce qui peut susciter des problèmes de coût et d'approvisionnement (Durand, 1982).

### 3.3.1 Ficine

#### 3.3.1.1 Origine et répartition

Le figuier commun (*Ficus carica* L) appartient à la famille des Moracées et produit des fruits savoureux appelés figues, appréciés pour leur comestibilité. Il est nommé *Ficus carica*, a un qualificatif générique qui signifie verrue pour *Ficus* (le lait de figuier pour soigner la verrue) et *carica* signifie originaire de la Carie, qui fait allusion à région en Turquie (Oukabli, 2003).

Les botanistes estiment que le genre *Ficus* comporte environ 1500 espèces classées en 52 genres (Siar, 2014). Les figuiers peuvent être classés en deux catégories : les figuiers sauvages ou mâles (appelés « Dokkars » en Algérie), les fruits de ce type sont généralement non comestibles en raison de leur goût et de leur texture pailleuse (Rebour, 1968). Le deuxième type comprend les figuiers domestiques ou femelles, qui sont cultivés en permanence. Ils produisent une seule récolte si la variété est unifère, et deux récoltes par an s'ils sont bifères : « figues fleurs » et « figues d'automne » (Mauri, 1960).

L'origine de figuier est obscure, Selon Vidaud (1987), le figuier serait originaire du bassin méditerranéen et du moyen orient, plus exactement d'Afghanistan, où il est cultivé depuis des millénaires. Et d'après Vilmorin (2003), il serait originaire d'Asie occidentale, d'Afrique du Nord ou des Canaries.

En Algérie, la culture de figuier est très ancienne, et localisée dans les montagnes de Kabylie (Bouakkaz, 2013) et comme l'Algérie étant un pays méditerranéen, donc la culture des figuiers est présente partout, sauf à des altitudes supérieures à 1200 mètres (Bensalah et Korib, 2013).

### 3.3.1.2 Classification botanique

Selon **Gaussen *et al.*, (1982)** ; **Joseph *et Raj* (2011)**, les figuiers ont une classification botanique exclusif, est le suivant :

- **Embranchement** : Phanérogames
- **Sous embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Sous classe** : Hamamélidées
- **Série** : Apétales unisexuées
- **Ordre** : Urticales
- **Famille** : Moraceae
- **Genre** : *Ficus*
- **Espèce** : *Ficus carica L*



**Figure 07** : le figuier *Ficus carica*.

### 3.3.1.3 Description de l'arbre

Parmi les caractéristiques botaniques du figuier est une plante monoïque (morphologiquement) mais il se comporte comme une plante dioïque (fonctionnellement) (**Kjelberge *et al.*, 1988**) ; *Ficus Carica* est un arbre à croissance rapide, à feuillage caduc, originaire des régions subtropicales, et qui se propage rapidement (**Stover *et al.*, 2007**). Certains arbres peuvent atteindre une hauteur remarquable de 9 à 12 mètres, mais en général, leur taille à maturité oscille entre 3 et 10 mètres (**Janick, 2006**).

Le figuier peut avoir un tronc allant jusqu'à 1 m de circonférence et une frondaison couvrant 100 m<sup>2</sup> (**Bretaudeau *et Faure*, 1990**). Son écorce est lisse et peu fissurée, de couleur gris pâle (**Michel, 2002**).



Le feuillage caduc comprend de grandes feuilles, larges de 25 cm, épaisses, coriaces, à 3 à 5 lobes profonds, à bord lisse, veloutées en dessus. *Ficus carica* est une espèce monoïque caractérisée par la présence de nombreuses fleurs insérées dans un réceptacle charnu. Ses fruits, de couleur vert jaunâtre (figues blanches) ou mauve foncé (figues violettes), poussent en juin-septembre en bout de rameaux (Michel, 2002). L'âge moyen des arbres est généralement de 50- 60 ans (Janick, 2006).

### 3.3.1.4 Caractéristiques botaniques

#### - Bourgeon terminal

*Ficus carica* L, est constitué d'un bourgeon terminal de deux stipules correspondant à la dernière feuille mise en place. Et on a trouvé 9 à 11 contours des feuilles et leurs stipules dans ce bourgeon (Vidaud, 1997).



Figure 08 : Bourgeon terminal de figuier

#### - Latex

Le Latex de figuier est un liquide visqueux de couleur blanche (Kim *et al.*, 2008). Il contient divers métabolites secondaires comme les composés phénoliques et des protéines à savoir les protéases à cystéine (Agrawal et Konno, 2004), il est distribué dans toutes les parties de la plante (Kim *et al.*, 2003). Ce matériel est comporté de caoutchouc, albumine, résine, sucre, acide malique, enzymes protéolytiques, la catalase et la peroxydase (Baby et Raj, 2011). Le latex contient une protéase appelée « Ficin », cet enzyme est capable de coaguler le lait et de digérer la caséine (Gausson *et*

*al.*, 1982). De manière traditionnelle, il est employé pour traiter la goutte, les ulcères et les verrues (Lansky *et al.*, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2010).



**Figure 09** : Image représentative du Latex du figuier

#### - Feuilles

Les feuilles du figuier sont très polymorphes, caduques, grandes, palmatilobées, avec trois à sept lobes sinués-dentés (Gerber, 2010). Elles sont larges (25 cm), épaisses et dotées d'un solide pétiole. La face supérieure de feuille de figuier est rugueuse et de couleur vert foncé, alors que la face inférieure présente des nervures très saillantes de couleur vert clair (Vidaud, 1997).



**Figure 10** : les feuilles de figuier

### - Fruits

Le fruit de figuier est largement consommé par l'homme car il constitue une excellente source d'énergie, minéraux, vitamines, acides aminés et fibres diététiques (**Oliveira *et al.*, 2010**).

Cependant, la figue est ce qu'on appelle un faux fruit ; ce que nous percevons comme un fruit est en fait un réceptacle concave sur lequel sont fixées de nombreuses fleurs unisexuées. La figue se présente comme un petit sac charnu avec une ouverture, appelée ostiole, fermée hermétiquement par des bractées entrelacées. Les véritables fruits sont les innombrables petits grains qui parsèment la chair de la figue, appelées « akènes » (**Haesslein *et Oreiller*, 2008**).



**Figure 11** : les fruits du figuier.

### - Inflorescence et la fleur

L'inflorescence du figuier est très particulière. Les fleurs de la figue sont hors de vue et groupés à l'intérieur des fruits verts (**Vidaud, 1997**). Un figuier est considéré mâle ou femelle selon le sexe des fleurs renfermées dans ses inflorescences (**Armstrong, 2006**).



**Figure 12** : la fleur de figuier.

### - Rameaux fructifères

Le rameau se compose d'une série de nœuds, où chaque nœud sert de point d'attache pour une feuille et des bourgeons axillaires. Leur arrangement alterné, sont opposés le long du rameau, ce qui est une caractéristique distinctive de la famille des Moracées (Vidaud, 1997).



**Figure 13** : Rameaux fructifères de figuier.

### 3.3.2 Complexe enzymatique

Parmi les caractéristiques de latex de genre *Ficus* est contient une activité protéolytique. En 1930, Robbins a créé le nom « Ficine » pour la poudre blanche purifiée dotée d'une activité antihelminthique obtenu à partir de latex de genre *Ficus* (Singleton *et al.*, 2013). En 1992, l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire a nommé la composante protéolytique principale du latex du figuier « ficaine ».

Et comme toutes les parties de l'arbre de genre *Ficus* contient le latex, il assure une protection et une autoréparation contre les agressions physiques (**Lansky et al., 2008**). Par incision du tronc on recueille le latex qui coagule rapidement, il constitue la ficine brut après la filtration et la lyophilisation. La ficine peut être utilisée par l'industrie agroalimentaire, dans l'industrie de textile, en pharmacologie, en cosmétologie et en immunohématologie pour la recherche d'anticorps irréguliers (**Bruneton, 2009**).

La ficine ou fician est une cystéyl-protéase obtenue à partir du latex de figuier : *Ficus genius*, *Ficus glabatra*, ou *Ficus carica* (**Robbins, 1930**). Le pH optimal de la ficine est de 5,0 à 8,0 et la température optimale est de 45 à 55° C (**Polaina et Mac Cabe, 2007**). Il y a trois fragments de ficine : Un fragment catalytique autour de l'His, un fragment autour du site catalytique Cys et le fragment N-terminal. La séquence d'acides aminés déterminée pour les résidus du site actif ressemble de près à la séquence correspondante dans la papaïne (**Devaraj, 2008**).

### 3.3.2.1 Caractéristiques

*Ficus carica* est considérée comme une source de protéases très utilisées pour coaguler le lait (**Azarkan et al., 2006**). Son latex contient des enzymes protéolytiques comme la ficine.

La ficine ou ficain appartient à la famille des protéases à cystéine. Les informations disponibles montrent que la ficine a beaucoup de propriétés communes avec la papaïne (**Gaussen et al., 1982**).

La ficine compte une seule chaîne polypeptidique composée de 210 résidus d'acides aminés pour un poids moléculaire compris entre 20 et 35 KDa (**Devaraj et al., 2011**), son site actif est constitué de deux acides aminés qui sont la cystéine (Cys-25) et l'histidine (His-159) (**Katsaros et al., 2008 ; Feijoo-siota et al., 2011**).

L'activation de la ficine, nécessite les thiols et les réducteurs (cystéine, thiosulfate, glutathion), elle est inhibée par la cystéine de poulet comme la papaïne. Après le fractionnement et la purification par chromatographie échangeuse d'ions, 5 isoformes de ficine (A, B, C, D1 et D2) sont obtenus. Selon leur ordre d'éluion il y a 4 isoformes (A, B, C et D) qui ont des poids moléculaires compris entre 14 et 18 KDa déterminés par l'autolyse de la ficine (**Azarkane et al., 2006**).

La ficine présente une grande stabilité thermique. Sa température d'activité est comprise entre 67 et 77 °C (Nassar *et al.*, 1987). Feijoosiota *et al.*, (2011) et Bekhi *et al.*, (2014) l'ont évalué à 65°C. Elle est de 60°C selon Fadyloglu (2001). Grzonka *et al.*, (2007) ont reporté des températures de 45 à 55°C. La ficine atteint son activité maximale dans une gamme de pH allant de 5 à 8,5, comme indiqué par Siar (2014).

### 3.3.2.2 Mécanisme et spécificité d'action de la ficine

Les protéases à cystéine, sont aussi connues comme des protéases à thiol, le mécanisme catalytique de ces enzymes implique un groupe de cystéine dans le site actif (Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011). Parmi les caractéristiques de la ficine, c'est une hydrolase des liaisons contenant des acides aminés non chargés, aromatiques et /ou hydrophobes (Di Piero *et al.*, 2014).

La ficine agit sur les résidus d'acides aminés Tyr, Phe et Val des protéines, comme décrit par Payne (2009). Ainsi, le temps nécessaire pour la coagulation est diminué mais elle conduit à la formation de peptides amers, cela entraîne une diminution de la concentration du lait caillé et à la dissociation du caillot. Ce qui conduit à un affaiblissement dans le rendement du lait caillé (Akar *et Fadyloglu*, 1999 ; Payne, 2009).

### 3.3.2.3 Utilisation

Les enzymes végétaux sont utilisés depuis l'antiquité. Le latex du figuier a été très employé dans la fabrication du fromage, comme un antihelminthique, en pharmacologie, dans l'attendrissement de la viande, la ficine est également utilisée dans le secteur de la brasserie lorsque la température est basse pour obtenir de bonnes propriétés colloïdales (Gaussen *et al.*, 1982). En Algérie, particulièrement en Kabylie, le latex de figuier est utilisé pour la fabrication de fromage connu sous le nom Agugli ou Iguissi selon la région (Siar, 2014).

# Matériel et Méthode

Le présent travail a été réalisé au niveau des laboratoires pédagogiques de l'université des Frères Mentouri Constantine.

Le but principal de notre étude est d'évaluer l'efficacité de l'extrait de pepsine provenant des estomacs de poulets et de la ficine issue du latex de figuier (*Ficus carica*), typiques de la région de Constantine, sur la coagulation du lait, ainsi que d'apprécier une éventuelle différence entre la protéase d'origine animale et celle d'origine végétale. En effet, après l'extraction de ces deux enzymes, le dosage de leurs activités coagulantes ainsi que leur caractérisation en étudiant l'influence de certains paramètres chimiques et biochimiques sur l'activité coagulante (tel que : l'influence de pH, de la température et la concentration en  $\text{CaCl}_2$ ) ont été nos principaux objectifs à atteindre.

## 1 Matières premières utilisées

### 1.1 Lait

Dans notre étude, nous utilisons du lait écrémé en poudre (Thika - Splash lait) à température ambiante. Ce lait est reconstitué selon la méthode de Berridge (1945), où 12 gs de poudre de lait écrémé sont dissous dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) à 0,01 M. Le résultat de cette reconstitution est appelé **substrat de Berridge**. Pour prévenir la croissance microbienne, nous ajoutons 0,04% (p/v) d'azide de sodium au substrat préparé. Avant utilisation, le lait est conservé à une température de 4°C pendant une nuit pour assurer l'équilibre physico-chimique, la stabilité et la réhydratation des micelles d'une part, et éviter le développement microbien d'autre part (Benyahia, 2013).

#### 1.1.1 Analyse physicochimique et biochimique du lait

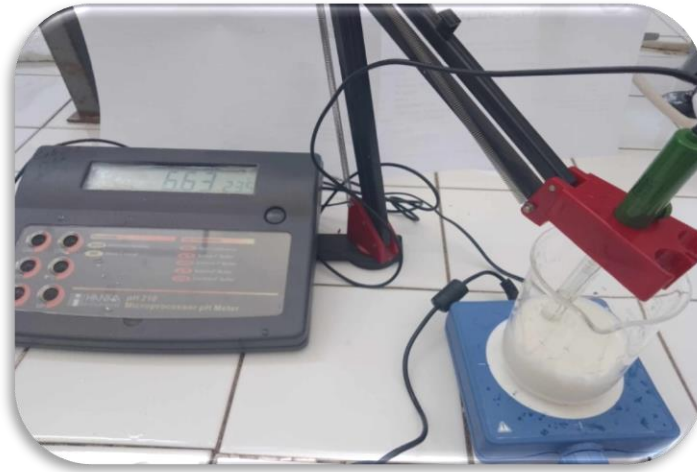
##### 1.1.1.1 Détermination du pH

Le pH est un indicateur de l'acidité du lait à un instant précis, offrant des informations sur sa fraîcheur. Il mesure l'activité des ions  $\text{H}^+$  dans la solution, permettant ainsi d'évaluer de manière quantitative son niveau d'acidité ou de basicité.

Avant chaque mesure, le pH est évalué à l'aide d'un pH-mètre. L'électrode du pH-mètre est d'abord nettoyée avec de l'eau du robinet, puis rincée à l'eau distillée et séchée avec du papier.



Ensuite, l'électrode est immergée dans le lait pour effectuer la mesure, et la valeur du pH apparaît immédiatement sur l'écran. Comme indiqué sur la figure 14. La mesure est réalisée avant chaque utilisation du lait (Afnor, 1993).



**Figure 14 :** la mesure de pH de lait par le pH mètre.

### 1.1.1.2 Epreuve de l'ébullition

Ce test permet d'apprécier la fiabilité du substrat de Berridge avant son utilisation.

Nous mettons 200 ml du lait à examiner dans une casserole et chauffons-le sur une source de chaleur jusqu'à ce qu'il atteigne le point d'ébullition.

Si le lait s'écoule le long des parois de la casserole sans former de grumeaux, cela indique que le lait est normal. Cependant, si des grumeaux se forment le long des parois, cela signifie que le lait est coagulé.

### 1.1.1.3 Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable mesure la quantité d'acide lactique présente dans un litre de lait. Elle implique la neutralisation des composés acides du lait par de la soude 0,1N, en utilisant un indicateur coloré qui est la phénolphtaléine.

L'unité conventionnelle de mesure de l'acidité est le degré Dornic (°D), où 1°D équivaut à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait (Afnor, 1993).

L'acidité titrable est déterminée comme suit :

- Nous ajoutons 10 ml du substrat de Berridge dans un bécher et mélangeons-y 3 gouttes de phénolphtaléine.

- Ensuite, nous procédons à la titration en ajoutant de la soude (NaOH, 0,1N) jusqu'à ce qu'une coloration rose pâle apparaisse et persiste pendant 10 secondes (Figure 15).
- Enfin, nous mesurons le volume de NaOH utilisé pour la neutralisation.

La concentration d'acidité se mesure en grammes d'acide lactique par litre de lait, utilisant la formule suivante :

$$\text{Acidité} = 10 \left( \frac{V}{V1} \right) 9$$

**V** : volume de soude utilisée.

**V1** : volume de la prise d'essai.



**Figure 15** : Test d'acidité titrable du substrat de Berridge.

## 1.2 Extraits enzymatiques

### 1.2.1 Pepsine

#### 1.2.1.1 Préparation des proventricules

Les proventricules sont prélevés, d'une boucherie située dans la Wilaya de Mila. Après l'abattage, le plumage et l'éviscération, les proventricules sont détachés du tube digestif en réalisant une incision au niveau de la partie supérieure liée au jabot et au niveau du col inférieur attaché au gésier. Toute matière grasse recouvrant les proventricules est soigneusement retirée. Ensuite, les proventricules sont ouverts par une incision longitudinale et soigneusement rincés

à l'eau courante afin d'éliminer toute particule d'aliment adhérente comme illustré dans la figure 16. Une fois égouttés, ils sont ensuite transportés au laboratoire dans une glacière.

Les proventricules sont répartis, en lots de 100 gs (13 à 14 proventricules) et conservés au congélateur jusqu'à utilisation. Le poids unitaire des proventricules varie entre 5,3 gs à 12,7 gs avec une moyenne de 7,7 gs (Adoui, 2007).



Figure 16 : Préparation des proventricules

### 1.2.1.2 Extraction de la pepsine

L'extraction de la pepsine est réalisée en suivant le protocole d'extraction proposé par Bohak, (1970) cité par Benyahia-Krid *et al.*, (2010). Les principales étapes sont présentées en Figure 21.

Après décongélation, une quantité de 100 gs de proventricules hachés est ajoutée à une solution saline de macération de 300 ml (Figure 17). Cette solution contient 3 gs de NaCl et 0.7 g de NaHCO<sub>3</sub> par litre (Benyahia-Krid *et al.*, 2010 ; Nouani *et al.*, 2011).



Figure 17 : Hachage et macération sous agitation.

Après 3 heures de macération à 20-25 °C sous agitation, le macérât est filtré à travers une gaze à double couche. Puis le pepsinogène est activé en acidifiant la solution avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 3N jusqu'à ce que le pH atteigne 2 (Glick *et al.*, 1989) (Figure 18).



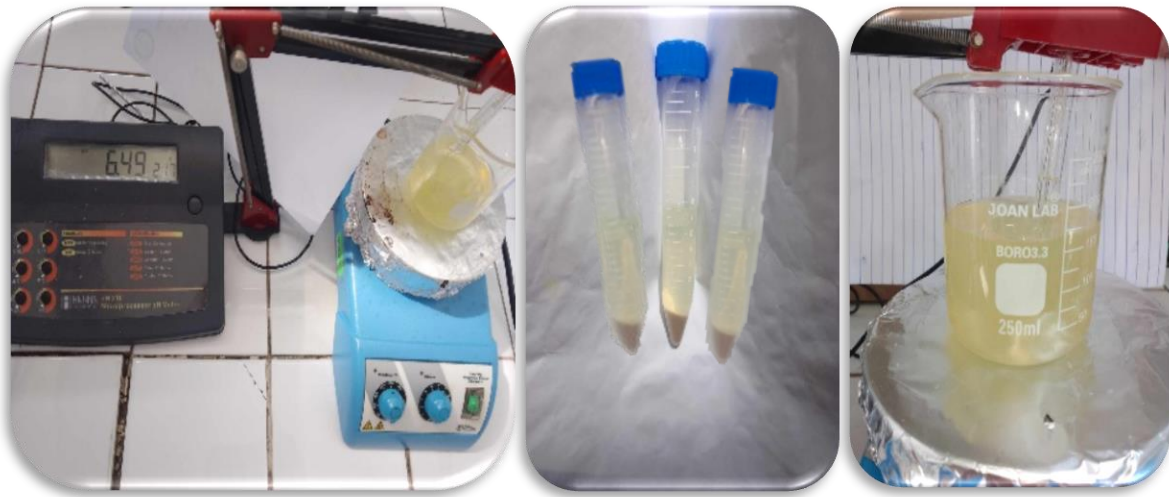
**Figure 18 :** Filtration du macérât et l'activation du pepsinogène.

Après l'activation de l'enzyme, le filtrat est enfin centrifugé à une force centrifuge de 7500g pendant 15 min à 4°C dans une centrifugeuse (Figure 19).



**Figure 19 :** Centrifugation de pepsinogène.

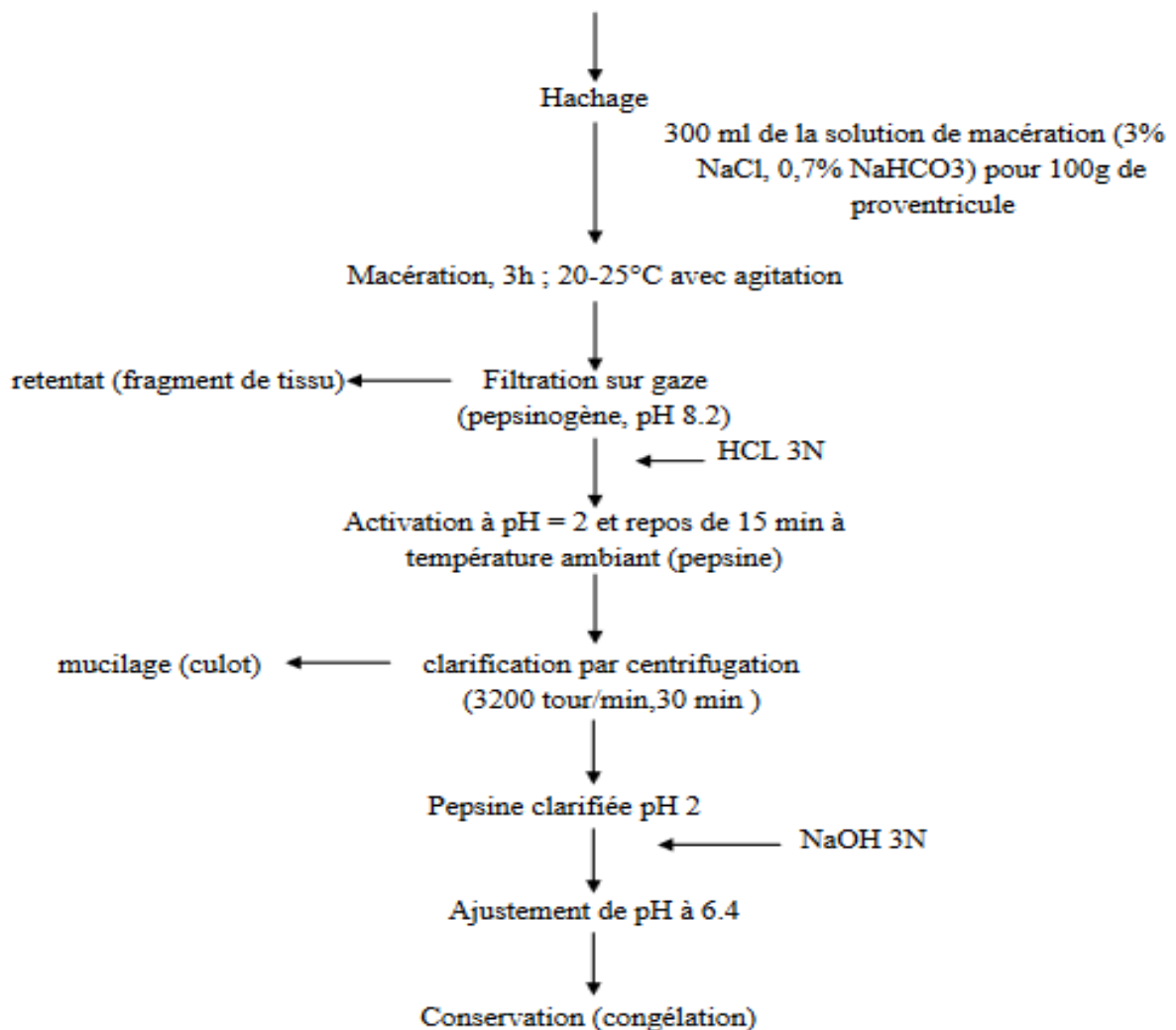
Le surnageant obtenu, qui constitue l'extrait enzymatique clarifié, est récupéré, puis ajusté à un pH de 6,4 en utilisant une solution de NaOH 3N (Figure 20).



**Figure 20** : Récupération et l'ajustement du pH.

Enfin, l'extrait est conservé au congélateur jusqu'à son utilisation. Le culot, qui contient le mucilage et les débris des tissus, est éliminé.

Décongélation des proventricules(20min, 25°C au bain marie)



**Figure 21** : Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet (Bohak, 1970).

## 1.2.2 Ficine

### 1.2.2.1 Récupération de latex

Dans le cadre de la caractérisation de l'extrait brut coagulant du figuier, nous utilisons le latex, un liquide blanc visqueux, pour l'extraction enzymatique de la ficine. Le latex est collecté entre la fin du mois de mars jusqu'au mois d'avril dans la région de Didouche Mourad, Wilaya de Constantine.

Le latex frais est collecté dans le même environnement, préservant ainsi les caractéristiques du sol inchangées. Pour ce faire, nous utilisons des tubes à essai ainsi que des seringues jetables de 5 ml (Figure 23). Après sa collecte, le latex est transporté frais au laboratoire dans une glacière, puis réparti immédiatement dans des tubes pour la suite des analyses.

Pour collecter le latex, nous faisons des incisions sur les grandes tiges ainsi que sur les jeunes rameaux cassés. Deux à trois gouttes de latex s'écoulent alors et sont directement récupérées dans des tubes à essai. Ces tubes sont conservés au réfrigérateur, à une température comprise entre 4 et 8 °C, en attendant l'extraction du système enzymatique. Le volume total de latex récupéré pour cette étude est d'environ 80 ml.



**Figure 22** : Récupération du latex

### 1.2.2.2 Extraction de la ficine

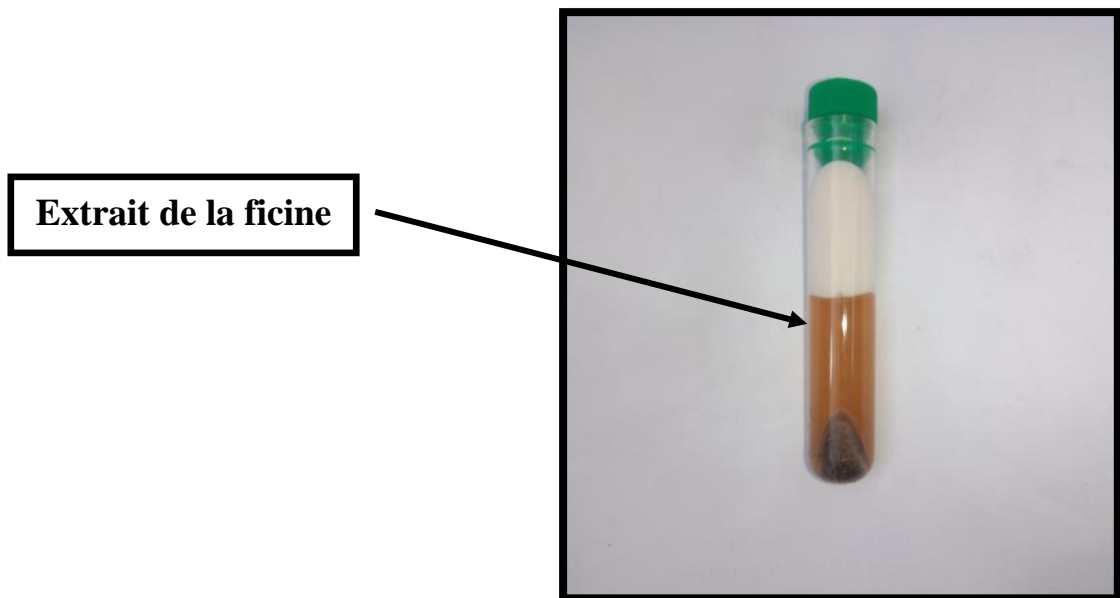
Le latex subit une centrifugation à 5000 tours par minute pendant 20 minutes à une température de 4°C, et trois couches sont récupérées.

Une couche supérieure, présentant une texture molle et une couleur blanche opaque, constituée des gommés, qui représentent environ 10 à 15 % du volume total.

Une couche inférieure, représentant des débris présents sur l'écorce de l'arbre se mêlent à la sève pendant l'écoulement, représentant moins de 1% du volume total.

Une couche intermédiaire, Un liquide de teinte marron, constituant la majeure partie, est la solution renfermant l'enzyme (Figure 24) (**Gagaoua, Boucherba *et al.*, 2014**).

Ensuite, on conserve l'extrait enzymatique brut de la ficine dans des eppendorfs de 2ml, au congélateur à (- 80°C) jusqu'à l'utilisation.



**Figure 23 :** Les couches de latex après la centrifugation.

### 1.2.3 Rendement de l'extraction des enzymes

Le rendement d'extraction relatif de l'extrait brut de pepsine de poulet et de la ficine se calcule en comparant le volume total de la solution après l'extraction des enzymes et le volume total de la solution d'origine avant l'extraction (Volume d'échantillon initial). Cette mesure est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$R\% = \frac{V}{V_0} \times 100$$

Où :

R (%) : rendement exprimé en pourcentage ;

V : Le volume de l'extrait résultant ;

V<sub>0</sub> : Le volume de la solution de macération (pepsine) ou le volume total du latex avant la centrifugation (pour la ficine).

## 2 Etude des propriétés des extraits enzymatique

### 2.1 Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante est évaluée en utilisant la méthode de **Berridge (1945)**. Dans un tube à essai, 10 ml du substrat de Berridge (pH 6,6) sont placés et maintenus dans un bain Marie à 30°C. Lors de l'ajout de 1 ml de l'extrait enzymatique, le chronomètre est déclenché, et le tube est légèrement agité. Le chronomètre est arrêté dès que les premiers flocons apparaissent sur la paroi du tube, et le temps de floculation est enregistré. Ce temps de floculation est utilisé pour calculer l'activité coagulante. L'extrait enzymatique retenu est celui qui produit un temps de floculation compris entre 300 et 360 secondes.

Par définition, l'activité coagulante est exprimée par un rapport de quantité entre un volume spécifique d'enzyme et un volume de lait à coaguler, dans des conditions définies de manière arbitraire. La méthode de Berridge permet de calculer l'Unité Présure (UP), qui représente la quantité d'enzyme active nécessaire pour coaguler 10 cm<sup>3</sup> de substrat standard en 100 secondes à 30°C.

$$UP = \frac{100 \times V}{10 \times T \times V'}$$

Où :

UP = unité de présure ;

100 : temps de coagulation du substrat standard (100 secondes) ;

10 : volume du substrat standard (10 ml) ;

V = volume de substrat standard utilisé ;

V' = volume de l'extrait brut ;

T = temps de coagulation de l'échantillon.



## 2.2 Détermination du temps de coagulation

Le temps de prise correspond au moment où les premières gouttelettes de lactosérum apparaissent à la surface du gel, indiquant que le coagulum devient rigide et cesse de s'écouler le long des parois du tube (**Luquet et Boudier, 1981**).

Un volume de 10 ml de lait est versé dans un tube à essai maintenu à 35°C dans un bain-marie, puis on y ajoute 1 ml de la solution enzymatique. Le tube est ensuite laissé à température jusqu'à ce que le gel se solidifie et que les premières gouttelettes de sérum apparaissent à sa surface. Le temps écoulé représente alors le temps de prise.

## 2.3 Détermination de la force de coagulation

La force coagulante s'exprime par le nombre de volumes de lait coagulé par un volume de coagulant, comme décrit par **Collin et al., (1982)**. Cette évaluation se fait sur un substrat standard en ajoutant 1 ml d'extrait coagulant brut à 500 ml de lait dans un récipient, puis en enregistrant le temps de coagulation à une température de 35 °C pendant une durée maximale de 40 minutes.

$$F = 2400 \times V/V' \times T$$

Où :

2400 = 40 min × 60 secs ;

V = volume du lait en ml ;

V' = volume de l'extrait enzymatique en ml

T = temps de floculation en secondes.

## 2.4 Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est effectué en utilisant la méthode de **Lowry et al., (1951)** (Annexe 3), qui repose sur la coloration bleue produite par les protéines suite à une réaction avec le réactif de Folin et les acides aminés.

L'intensité de la coloration est directement liée à la concentration en protéines dans les extraits, déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie avec du sérum d'albumine bovine (BSA à 200 µg/ml) (Annexe 3).

## 2.5 Détermination de l'activité protéolytique

La mesure de l'activité protéolytique a été réalisée en utilisant le protocole décrit par **Green et Stackpoole (1975)**. Ce protocole repose sur l'évaluation des peptides simples et des acides aminés libres produits suite à l'hydrolyse d'une protéine substrat par une protéase ou un mélange de protéases.

Effectivement, pour évaluer l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique, nous avons utilisé la caséine comme substrat. Lorsque la caséine est hydrolysée par une protéase, cela entraîne la libération de tyrosine ainsi que d'autres acides aminés.

L'activité protéolytique est détectée en utilisant une méthode colorimétrique basée sur le dosage des groupements tyrosine avec le réactif de Folin-Ciocalteu, selon la procédure décrite par **Lowry et al., (1951)**. Cette méthode utilise la caséine comme substrat et est réalisée dans des conditions appropriées, telles que décrites par **Mechakra et al., (1999)**.

Le mélange réactionnel implique la combinaison de 1 g de caséine dans 50 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7).

Un volume de 1 ml de ce mélange est ensuite mélangé avec 1 ml d'extrait enzymatique, puis soigneusement agité et incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 20 minutes.

La réaction est ensuite stoppée par l'addition de 5 ml de TCA à 5 % et laissée à température ambiante pendant 15 minutes.

Après centrifugation, 0,5 ml du liquide surnageant est mélangé avec 2,5 ml de la solution C, préparée en combinant 100 ml de la solution A avec 2 ml de la solution B.

- La solution A est obtenue en mélangeant 1 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 5 g de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) dans 250 ml d'eau distillée.

- La solution B est obtenue en mélangeant 0,1 g de tartrate de sodiumpotassium ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ ) et 0,032 g de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) dans 10 ml d'eau distillé.

Après une période d'incubation de 10 minutes à une température de 35 °C, on ajoute un volume de 250 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/2. Après agitation et une nouvelle incubation à 35°C pendant 20 minutes, une coloration

bleue se développe, et l'absorbance est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 660 nm.

La concentration en tyrosine des tubes est évaluée en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec de la tyrosine dans les mêmes conditions expérimentales.

L'activité protéolytique, exprimée en  $\mu\text{g/ml.min}$ , indique la libération d'1  $\mu\text{g}$  de tyrosine résultant de l'hydrolyse enzymatique par minute et dans 1 ml d'extrait enzymatique.

## 2.6 Détermination de l'activité spécifique

L'activité spécifique est exprimée par le rapport entre l'activité coagulante de l'extrait enzymatique et le taux de protéines de cet extrait enzymatiques et exprimée en U.P/mg (Nouani *et al.*, 2009). Elle est exprimée par la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{L'activité coagulante}}{\text{La teneur en protéines}}$$

## 3 Détermination des conditions optimales de coagulation

La caractérisation de l'extrait enzymatique implique la détermination des conditions optimales pour son activité coagulante. Cette activité peut être influencée par divers facteurs, notamment le pH, la concentration en  $\text{CaCl}_2$ , la température et la concentration en enzyme.

### 3.1 Influence du pH

L'influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été déterminée en faisant varier le pH du lait de 5,5 à 8 avec des solutions de HCl (0,1N) ou de NaOH (0,1 N) dans des tubes contenant chacun 10 mL de substrat de Berridge préparé de manière identique et maintenus à la même température (30 °C dans un bain-marie). Ensuite, nous avons ajouté 1 mL de chaque dilution enzymatique, et le temps de floculation a été mesuré conformément à la méthode de Gordin et Rosenthal (1978).

La sélection de cette plage de pH est motivée par le fait que lorsque le pH est inférieur à 5, la coagulation peut prendre une forme acide. De plus, une

augmentation du pH au-delà de 7 peut entraîner l'inactivation de l'enzyme utilisée (Huppertz *et al.*, 2006).

### **3.2 Influence de CaCl<sub>2</sub>**

L'influence de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante a été déterminée en faisant varier la concentration du lait en ions CaCl<sub>2</sub> de 0,01 M à 0,05 M. le temps de floculation est mesuré pour chaque concentration, ce qui correspond au laps de temps entre l'addition de l'extrait enzymatique au substrat de Berridge, à la concentration en CaCl<sub>2</sub> spécifiée, et l'apparition des premiers flocons de caséine visibles à l'œil nu sur la paroi interne d'un tube incliné soumis à un mouvement rotationnel lent.

### **3.3 Influence de la température**

La température optimale de coagulation du lait a été déterminée en portant le lait à différentes températures (30 ; 40 ;50 ; 60 ; 65 ; 70 ;80 C°), et en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparé dans des conditions identiques, comprenant une concentration en CaCl<sub>2</sub> de 0.01M et un pH de 6.4.

# Résultats et Discussion

## 1 Caractérisation physico-chimique du lait (matière première)

Le lait est reconstitué par dissolution de 12 gs de poudre de lait écrémé dans 100ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M.

### 1.1 pH

Le pH oscille entre 6,5 et 6,8 avec une moyenne de 6,65 pour l'ensemble des substrats de Berridge préparé. Ce résultat correspond à celui montré par **Kersten (1937)**.

### 1.2 Acidité Dornic

Un lait cru au ramassage doit avoir une acidité  $\leq 16$  °D (**Ribadeau-dumas, 1991 ; Silva et Malcata, 2005**).

L'acidité Dornic obtenue varie de 15 °D à 16 °D avec une moyenne de 15,5 °D.

### 1.3 Epreuve de l'ébullition

Les résultats du lait frais sont systématiquement négatifs, sauf en cas de non-conformité aux normes de conditionnement, où les résultats deviennent positifs.

Les caractéristiques physicochimiques et biochimiques du lait reconstitué selon la méthode de Berridge sont résumées dans le tableau 2.

**Tableau 02** : Caractéristiques physico-chimiques du substrat de Berridge.

Caractéristiques	Substrat de Berridge
Acidité	15,5
pH	6,65

## 2 Récupération des échantillons

### 2.1 Pepsine

Les résultats de la récupération, de la préparation et de l'extraction de la pepsine à partir des proventricules de poulets sont encourageants et démontrent l'efficacité de la méthodologie utilisée.

Les proventricules de poulets sont collectés selon le protocole décrit, avec un poids unitaire moyen de 7,7 grammes et une variation de poids allant de 5,3 gs à 12,7 gs. Les proventricules sont prélevés dans une boucherie située dans la Wilaya de Mila, puis préparés en retirant toute matière grasse et en les rinçant soigneusement à l'eau courante pour éliminer les particules d'aliment adhérentes.

Après extraction, le surnageant obtenu constituant l'extrait enzymatique est récupéré, tandis que le culot contenant le mucilage et les débris des tissus est éliminé. Le processus d'extraction est efficace, avec une moyenne de 183,12 millilitres (ml) d'extrait enzymatique clarifié récupéré à partir de 100 grammes (gs) de proventricules et pour 300 ml de solution d'extraction. L'extrait brut de la pepsine ainsi obtenu présente une homogénéité remarquable, avec une couleur jaune clair (comme illustre la Figure 23)



Figure 24 : L'extrait brut de la pepsine.

## 2.2 Ficine

Dans le cadre de cette étude, nous entreprenons la caractérisation de l'extrait brut coagulant du figuier *Ficus carica L*, en utilisant le latex comme source d'extraction enzymatique de la ficine. Le latex, un liquide blanc visqueux, est collecté dans la région de Didouche Mourad, dans la Wilaya de Constantine.

La collecte du latex est réalisée en pratiquant des incisions sur les grandes tiges ainsi que sur les jeunes rameaux cassés, permettant de deux à trois gouttes de latex s'écouler et d'être collectées dans des tubes. Ces tubes sont conservés dans un environnement réfrigéré, entre 4 et 8 °C, en attendant l'extraction enzymatique

ultérieure. Le volume total de latex récupéré pour cette étude s'élève à environ 80 ml.

L'extraction de la ficine est réalisée via une centrifugation (à 5000 tr/min pendant 20 minutes), ce qui permet de récupérer trois couches distinctes. La couche intermédiaire constitue l'extrait enzymatique de la ficine. Par conséquent, sur les 80 ml de latex récupérés, nous réussissons à extraire 50 ml de ficine brute.



**Figure 25 :** L'extrait brut de la ficine.

### 3 Extraction des enzymes

#### 3.1 Rendement de l'extraction

##### 3.1.1 Pepsine

Le processus d'extraction utilisé démontre qu'à partir de 100 gs de proventricules et pour 300 ml de solution d'extraction, on récupère en moyenne un volume de 183,12 ml d'extrait enzymatique clarifié.

Notre rendement d'extraction de la pepsine à partir des proventricules de poulet, mesuré à 61,04%, est légèrement inférieur au rendement de 78,5% rapporté dans l'étude de **Smith et Jones (2023)**.

##### 3.1.2 Ficine

Le rendement de récupération du système enzymatique, à l'état brut, à partir du latex de figuier est 62,5% (50 ml de la ficine brute pour 80 ml de latex), un chiffre qui se rapproche de celui rapporté par **Siar (2014)**, estimé à 71,42%.



## 4 Caractérisation des extraits enzymatique

L'extrait clarifié de pepsine de poulet qui, préparé selon la méthode décrite par **Bohak (1970)** est caractérisé par un pH égal à 6,4 et une couleur jaune, ce résultat est comparable à celui rapporté par **Adoui (2007)** et **Siar (2014)**.

L'extrait enzymatique de la ficine, récupéré de la couche intermédiaire du latex après la centrifugation, se caractérise par un pH de 5,13, une couleur Brune claire, une texture visqueuse et une odeur fruitée prononcée. Les résultats de (**Nouani, Dako et al., 2009**) confirment ces caractéristiques.

### 4.1 Détermination de l'activité coagulante

Nous pouvons remarquer que l'extrait clarifié de la pepsine de poulet, donne un temps de floculation à 30°C d'environ 50 sec sur substrat de Berridge.

L'unité d'activité coagulante (U.A.C) qui représente la quantité d'enzyme contenue dans 1ml de la solution enzymatique, qui peut coaguler 10ml de lait en 100 secondes à 30°C, est de 2 UP pour l'extrait clarifié de la pepsine de poulet, cette activité est proche à l'activité obtenues par **Boughellout (2007)** estimée à 2,42 UP et inférieure aux celles obtenues par **Nouani et al., (2011)** évaluée à 13,33 UP, **Benyahia-krid (2013)** qui est de 23 UP et par **Adoui (2007)** qui est de 15,08 UP.

Concernant la ficine, elle donne un temps de floculation d'environ 20 secondes sur un substrat de Berridge produisant une activité coagulante de 270 UP. Cette valeur est comparable à celle obtenue par **Williams et al., (1968)**, qui rapportent une activité de 320 UP, mais supérieure à celle trouvée par **Siar (2014)**, qui est de 121,09 UP. En revanche, elle est nettement inférieure à celle signalée par **Nouani et al., (2009)**, qui l'estiment à 1500 UP.

De ce fait, l'extrait végétal (ficine) a une activité coagulante plus élevée comparé à l'extrait d'origine animale (pepsine de poulet).

Les valeurs de l'activité coagulante de la ficine et de la pepsine diffèrent, peut être en raison de leurs structures et de leurs mécanismes d'action distincts. La ficine est une enzyme protéolytique trouvée dans les figues, tandis que la pepsine est une enzyme digestive produite par l'estomac. Leurs substrats et conditions optimales de fonctionnement diffèrent, ce qui conduit à des valeurs d'activité différentes.

## 4.2 Détermination de la force coagulante

La force coagulante de l'extrait enzymatique de pepsine de poulet que nous avons obtenu est de 1/2385,68 UAC, cette force est proche de celle rapporté par (**Adoui, 2007**) qui rapporte 1/2579 UAC, contrairement aux résultats obtenus par (**Siar, 2014**) qui estimait une valeur largement supérieure 1/6041,64 UAC. De même, elle diffère de celle rapportée par **Amimour (2019)**, qui est de 1/1638 UAC.

Ces variations dans les résultats peuvent être attribuées à divers facteurs tels que l'âge du poulet, le type d'alimentation, les différentes solutions de macération utilisées, ainsi que les conditions d'extraction, comme l'a souligné **Amimour (2019)**.

D'autre part, les résultats d'extrait enzymatique de la ficine, montrent que la force coagulante qui exprime le nombre de volumes de lait coagulable par un volume de coagulant, est de 1/40000 UAC (c'est à dire 1ml de l'extrait enzymatique coagule 40 litres de lait). Cette force est égale à la norme indiquée par **Nouani, Dako et al., (2009)** qui est de 1/40000 UAC et est inférieure à celle rapportée par **Siar (2014)** qui l'ont évalué à 1/42059,76 UAC.

Les résultats obtenus ont montré que la force coagulante de l'extrait d'origine végétale (ficine) est environ 16 fois plus élevée que celle d'origine animale (pepsine).

La force de coagulation dépend de plusieurs facteurs, notamment la concentration de l'enzyme, la nature et la concentration du substrat, ainsi que les conditions environnementales telles que le pH et la température. Donc, même si deux enzymes peuvent avoir des activités coagulantes différentes, leur force de coagulation peut également varier en fonction de ces facteurs.

## 4.3 Dosage des protéines de l'extrait enzymatique

Selon la méthode de Lowry, en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec la BSA dans les mêmes conditions expérimentales, la teneur en protéines de l'extrait clarifié de pepsine de poulet obtenu est de 32,92 mg/ml. Ce résultat est supérieur à celui obtenu par **Adoui (2007)** qui est de 8,77 mg/ml et supérieur aussi à la valeur rapportée par **Siar (2014)** qui est 20,10 mg/ml et largement inférieur à celui obtenu par **Nouani et al., (2011)** ayant une valeur de 147,3 mg/ml.

Alors que la concentration des protéines dans l'extrait de ficine est de 100,66 mg/ml, cette valeur est proche de celle rapportée par **Siar (2014)**, qui a enregistré 89,31 mg/ml, mais demeure inférieure à celle obtenue par **Devaraj (2008)**, évaluée à 150 mg/ml. De plus, elle dépasse largement la concentration rapportée par **Nouani (2009)**, estimée à 22 mg/ml.

Les résultats obtenus montrent que la concentration des protéines d'origine végétale est plus élevée que celle d'origine animale.

#### 4.4 Dosage de l'activité spécifique

L'activité spécifique (exprimée en UP/mg) est le rapport entre l'activité coagulante et le taux de protéines de cet extrait enzymatique.

Notre extrait enzymatique de pepsine de poulet affiche une activité spécifique de 0,068 UP/mg, se situant à proximité de la valeur rapportée par **Amimour (2019)** de 0,10 UP/mg. Néanmoins, cette mesure reste inférieure à celle obtenue par **Siar (2014)**, qui était de 0,92 UP/mg, ainsi qu'à celle décrite par **Nouani et al., (2011)**, évaluée à 1,85 UP/mg.

D'un autre côté, les résultats révèlent que l'extrait brut de la ficine affiche une activité spécifique de 1,78 UP/mg, une mesure proche de celle trouvée par **Amimour (2019)**, estimée à 2,2 UP/mg. Toutefois, elle demeure inférieure aux valeurs rapportées par **Siar (2014)** et **Adoui (2007)**, qui s'élèvent respectivement à 3,1 UP/mg et 2,5 UP/mg.

Sur la base des résultats obtenus, il est constaté que l'activité spécifique d'origine végétale est supérieure à celle d'origine animale.

Les différences dans l'activité spécifique entre la ficine et la pepsine peuvent être dues à plusieurs facteurs, notamment leur origine, leur structure protéique ainsi que leur environnement optimal de fonctionnement (comme le pH et la température).

#### 4.5 Mesure de l'activité protéolytique

D'après les résultats obtenus (tableaux 03), l'activité protéolytique exprimée par le taux de tyrosine libéré de l'extrait brut de la pepsine est de 134,4 µg/ml.min.

Par ailleurs, l'activité protéolytique de l'extrait brut de la ficine est de 154,7 µg/ml.min. Ce résultat est inférieur à celui rapporté par **Siar (2014)** et **Fadyloğlu (2001)**.

Plusieurs auteurs ont étudié l'activité protéolytique de la ficine (Öner *et Akar*, 1993) ; (Nouani *et al.*, 2009) ; (Faccia *et al.*, 2012) ; (Shah *et al.*, 2014) ; (Siar, 2014) et (Fadyloğlu, 2001) particulièrement ces deux derniers qui rapportent des teneurs en activité protéolytique de l'extrait de ficine de 469,7 µg/ml.min, et de 320 µg/ml.min respectivement.

L'activité protéolytique de l'extrait brut de la ficine est inférieure cela s'explique probablement par sa composition qui contient des protéines enzymatiques autres que la ficine et également des protéines non enzymatiques car l'extrait n'a pas subi de purification.

Ces résultats permettent de déduire que l'activité protéolytique de la ficine (d'origine végétale) est supérieure à celle de la pepsine (d'origine animale).

La différence dans l'activité protéolytique entre la ficine et la pepsine peut être due à leurs structures protéiques distinctes, qui peuvent influencer leur capacité à reconnaître et à cliver les liaisons peptidiques dans les protéines. De plus, les conditions optimales de pH et de température pour leur fonctionnement peuvent varier, ce qui peut également affecter leur efficacité.

**Tableau 03** : Principales caractéristiques des enzymes extraites.

Caractéristiques	Pepsine	Ficine
<b>Taux de protéine (mg/ml)</b>	32,92	100,66
<b>Temps de floculation (secondes)</b>	50	20
<b>Activité coagulante (UP)</b>	2 UP	270 UP
<b>Force coagulante (UAC)</b>	1/2385,68	1/40000
<b>Activité spécifique UP/mg</b>	0.068	1.78
<b>Activité protéolytique µg/ml.min</b>	134,4	154,7
<b>Couleur</b>	Jaunâtre	Brune claire
<b>Texture</b>	Liquide	Visqueux

## 4.6 Détermination des conditions optimales de coagulation

Divers facteurs influent sur la coagulation, notamment la concentration en enzymes, le pH du lait, la température, la teneur en calcium, la composition en caséines, la taille des micelles et les traitements préalables du lait (**Jeant *et al.*, 2008**).

Dans le but de déterminer les conditions physicochimiques optimales pour l'action de l'extrait de pepsine et de ficine, nous avons étudié l'effet de certains paramètres sur leur activité coagulante et en les comparant entre eux.

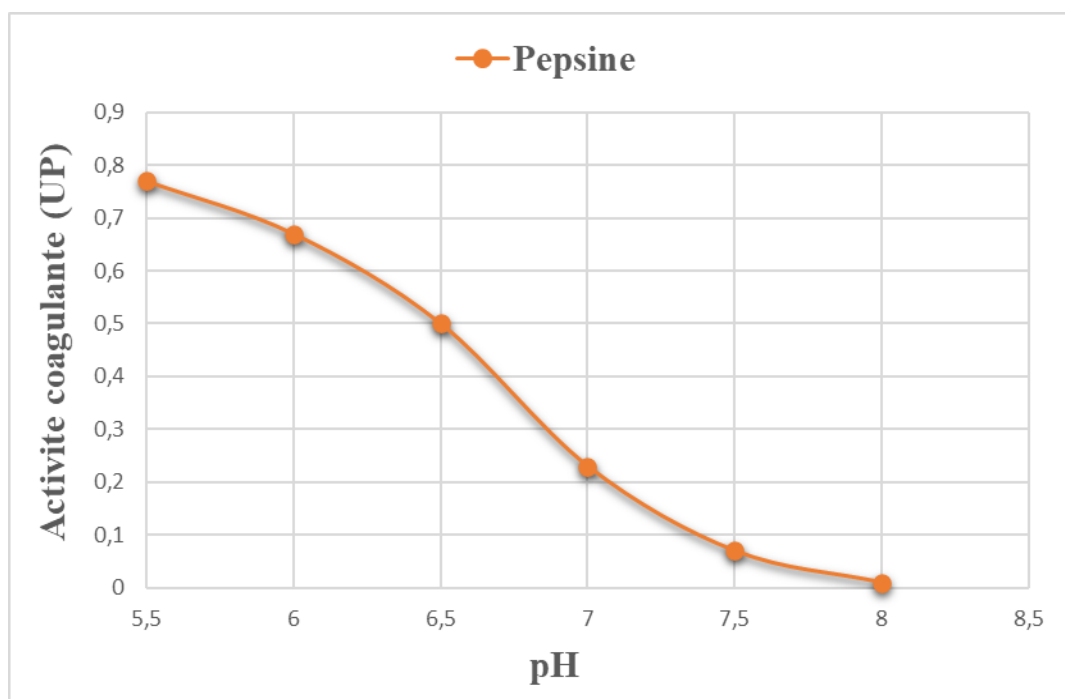
### 4.6.1 Influence du pH

L'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait de pepsine et de ficine est étudié en ajustant le pH du lait (Substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 5,5 à 8. La température d'incubation est fixée à 30 °C, et la concentration en CaCl<sub>2</sub> est de 0,01M.

Le pH optimal de coagulation du lait est déterminé par observation du temps de floculation le plus court.

#### 4.6.1.1 Influence du pH sur l'activité coagulante de la pepsine

Les variations de l'activité coagulante de la pepsine en fonction du pH du lait, sont présentées dans la figure 26.



**Figure 26** : Effet du pH sur l'activité coagulante de la pepsine.

Les résultats présentés par ce courbe montrent une diminution de l'activité coagulante de la pepsine au fur et à mesure que le pH du lait augmente.

Nous notons la plus forte activité coagulante pour la pepsine enregistrée à 0.77 UP pour une valeur de pH comprises de 5,5. Cette activité coagulante est nettement ralentie au-delà de la valeur de pH de 7,5.

En effet, dans nos conditions de travail, l'optimum de pH est noté de 5,5 pour la pepsine, **Adoui (2007)**, rapporte que la pepsine de poulet est d'autant plus active que le pH est bas.

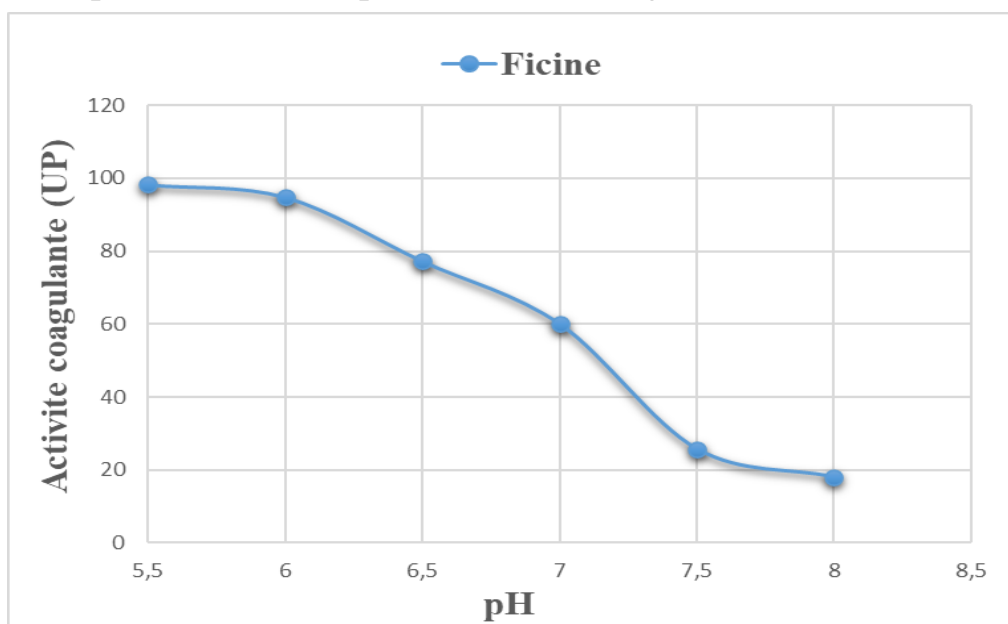
D'autres auteurs indiquent un effet comparable de l'abaissement du pH du lait sur l'activité de la pepsine de poulet (**Gordin et Rosenthal, (1978)** ; **El-Abbassy et Wahba, (1988)**).

Ce qui suggère que la pepsine est plus efficace dans des environnements légèrement acides.

La diminution marquée de l'activité coagulante au-delà d'un pH de 7,5 suggère que la pepsine perd rapidement son efficacité dans des environnements plus alcalins. Cela peut être attribué à des changements conformationnels ou à des altérations de son site actif à des valeurs de pH élevées, entraînant une réduction significative de son activité catalytique.

#### 4.6.1.2 Influence du pH sur l'activité coagulante de la ficine

Les résultats obtenus, de l'évolution de l'activité coagulante, de la ficine en fonction du pH du lait, sont représentés dans la figure suivante :



**Figure 27** : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de la ficine.

Les résultats obtenus montrent une diminution de l'activité coagulante de la ficine au fur et à mesure que le pH du lait augmente.

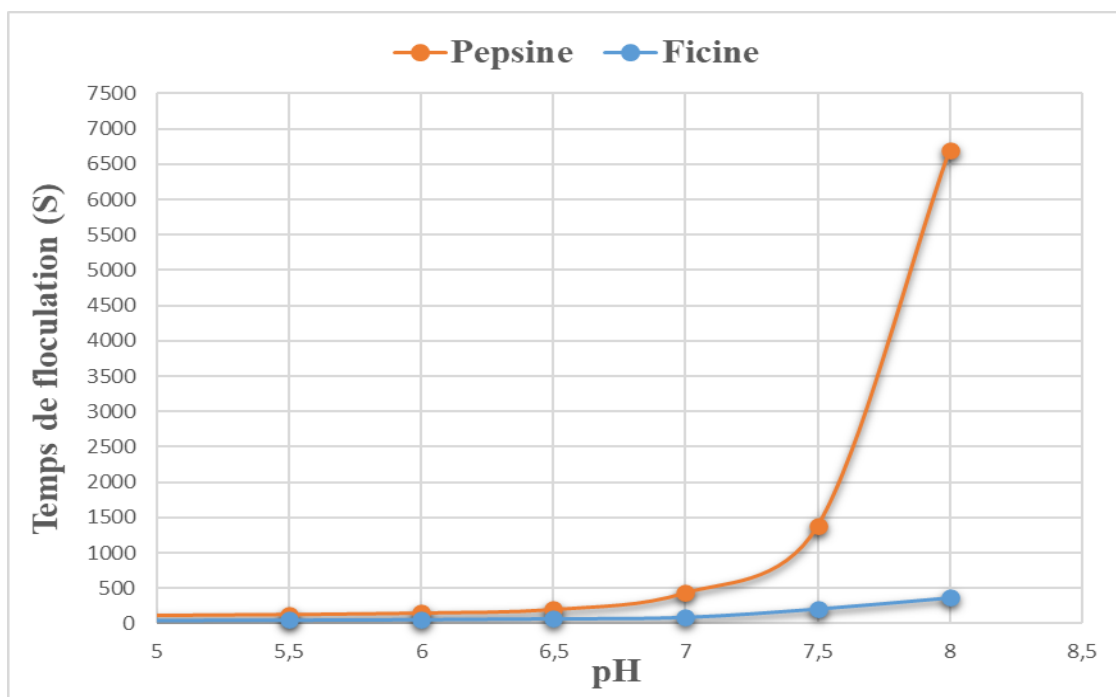
En effet, l'optimum d'activité est à pH 5,5 avec une activité coagulante 98.18 UP, et se stabilise environ de pH 7,5 avec une activité de 25,71 UP.

Ces résultats sont similaires de ceux rapportés par plusieurs auteurs tels que **Fadyloğlu (2001)**, **Nouani et al., (2009)** et **(Siar, 2014)**. Ces derniers, ont estimé que le pH optimal d'activité coagulante de la ficine est de l'ordre de 5.

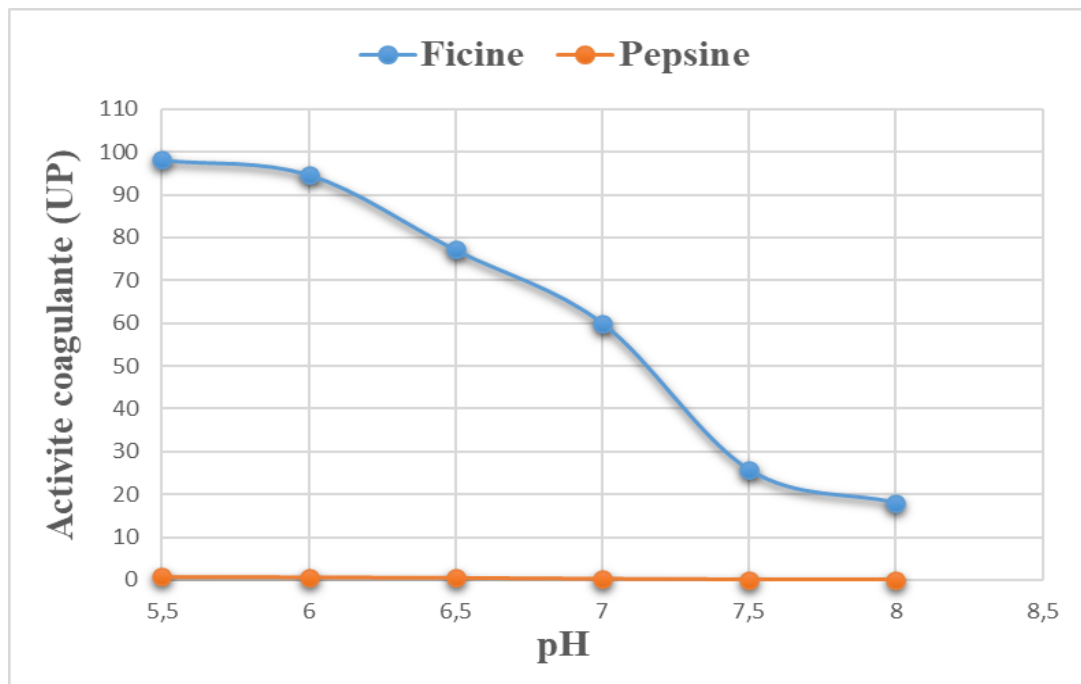
L'optimum d'activité à un pH de 5,5 suggère que la ficine est plus efficace dans des conditions légèrement acides. Lorsque le pH diminue, l'affinité de l'enzyme pour les micelles augmente et entraîne une augmentation de la vitesse de réaction. (**Fadyloğlu, 2001**). La stabilisation de l'activité autour de 25.71 UP à un pH d'environ 7,5 indique que même à des pH plus élevés, la ficine conserve une certaine capacité coagulante, bien que réduite par rapport à son optimum.

#### 4.6.1.3 Comparaison de l'effet du pH sur l'activité coagulante des deux enzymes

Les courbes ci-dessous illustrent les variations du temps de coagulation et de l'activité coagulante en fonction du pH pour les deux préparations enzymatiques (la ficine et la pepsine).



**Figure 28** : Effet du pH sur le temps de floculation de la pepsine et la ficine.



**Figure 29 :** Effet du pH sur l'activité coagulante des deux extraits enzymatiques.

Le temps de floculation et l'activité coagulante sont inversement proportionnels. Cela signifie que plus l'activité coagulante est élevée, plus le temps de floculation est court, et vice versa. En d'autres termes, une activité coagulante plus forte provoque une coagulation plus rapide.

Les résultats révèlent une corrélation entre la ficine et la pepsine, montrant une diminution de leur capacité coagulante à mesure que le pH du lait augmente.

Cependant, l'optimum d'activité pour la ficine est à pH 5,5, avec une activité coagulante de 98,18 UP, tandis que pour la pepsine, l'optimum est également à pH 5,5 mais avec une activité de 0,77 UP. Au-delà de ces valeurs de pH optimales, l'activité coagulante diminue pour les deux enzymes. La pepsine montre également une baisse plus significative de son activité au-delà de pH 7,5. Ces résultats soulignent les différences dans les conditions optimales de fonctionnement des deux enzymes.

Ces résultats concordent avec les observations habituelles concernant les enzymes protéolytiques, qui peuvent voir leur structure et leur activité catalytique altérées par des changements significatifs de pH.

D'après ces résultats, nous remarquons que le pH joue un rôle essentiel dans la coagulation du lait.

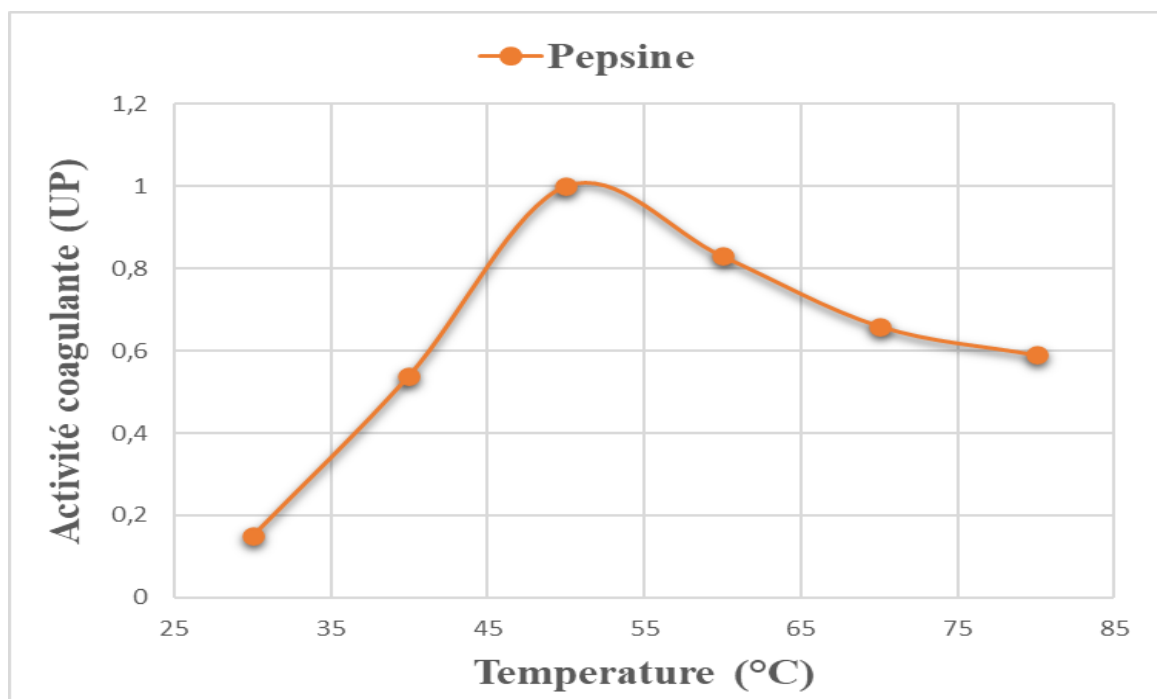


### 4.6.2 Influence de température

L'effet de la température du lait sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés est déterminé par la mesure de l'activité coagulante à différentes températures d'incubation allant de 30 à 80°C avec un intervalle de 10°C et pH =6.6.

#### 4.6.2.1 Influence de la température sur l'activité coagulante de la pepsine

La figures 30 montrent l'évolution de l'activité coagulante de la pepsine par en fonction de la température.



**Figure 30 :** Activité coagulante de la pepsine de poulet en fonction de la température

Au-dessus de 30 °C, l'activité coagulante de la pepsine augmente progressivement Jusqu'à 50 °C pour laquelle l'activité est maximale, elle diminue ensuite (Figure 30). La température optimale pour la coagulation du lait par la pepsine à pH 6,6 est d'environ 45 à 50 °C. Ce résultat obtenu pour la pepsine est proche de ceux donnés par (Adoui, 2007), évalué à 55 °C.

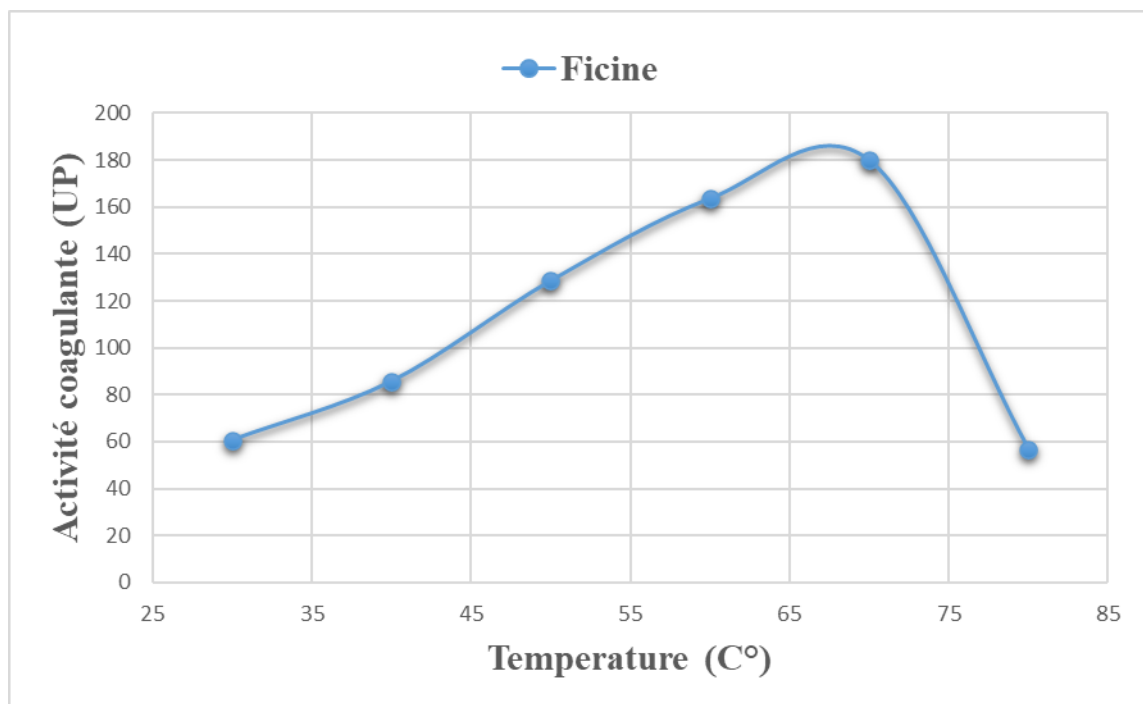
D'après Cogan *et al.*, (1982), la coagulation du lait par la pepsine de poulet atteint son optimum à environ 55°C. Ce phénomène pourrait résulter de

l'augmentation de l'activité enzymatique consécutive au dépliement de la structure tridimensionnelle du substrat, facilitant ainsi l'accès de l'enzyme et accélérant la phase primaire ou enzymatique de la coagulation. Au-delà de cette température, on observe une diminution de l'activité enzymatique.

En effet, certains auteurs ont montré que l'élévation de la température entraînerait une fusion rapide des micelles (Storry et ford, 1982 ; Marshall, 1982 ; Calvo, 2002).

#### 4.6.2.2 Influence de la température sur l'activité coagulante de la ficine

Les résultats obtenus, de l'évolution de l'activité coagulante, de la ficine en fonction de la température, sont représentés dans la figure suivante :



**Figure 31 :** Influence de la température sur l'activité coagulante de la ficine

D'après les résultats obtenus, l'activité coagulante de la ficine augmente progressivement avec l'augmentation de la température du lait. Parmi les températures étudiées, l'optimum d'activité coagulante pour l'extrait de ficine est observé à une température du lait de 65°C, avec une activité d'environ 180 UP.

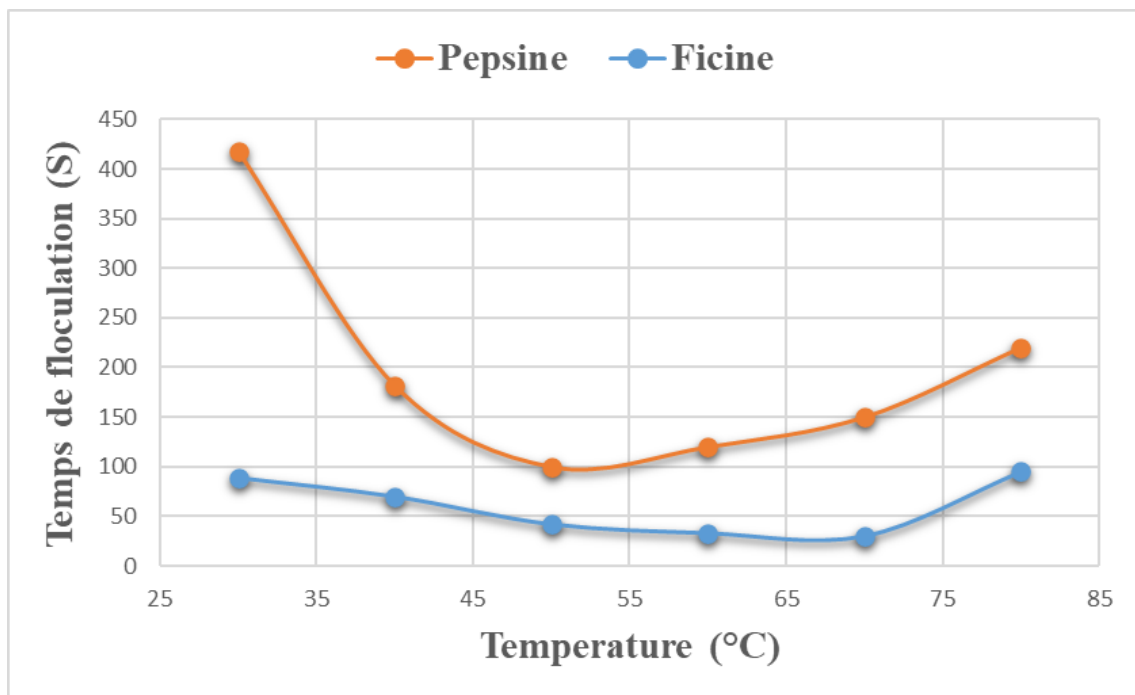
Ce résultat est proche de ceux rapportés par (Fadyloğlu, 2001) et (Gagaoua *et al.*, 2014), qui l'ont estimé à 60°C et inférieure à celle estimée par (Nouani *et al.*, 2009) évalué à 80°C.

Ces résultats sont très similaires à celui rapporté par plusieurs auteurs (**Devaraj et al., 2008**) et (**Sugiura et Sasaki, 1974**) qui rapporté une activité enzymatique maximal de la ficine à l'intervalle de températures comprises entre 50 et 65°C.

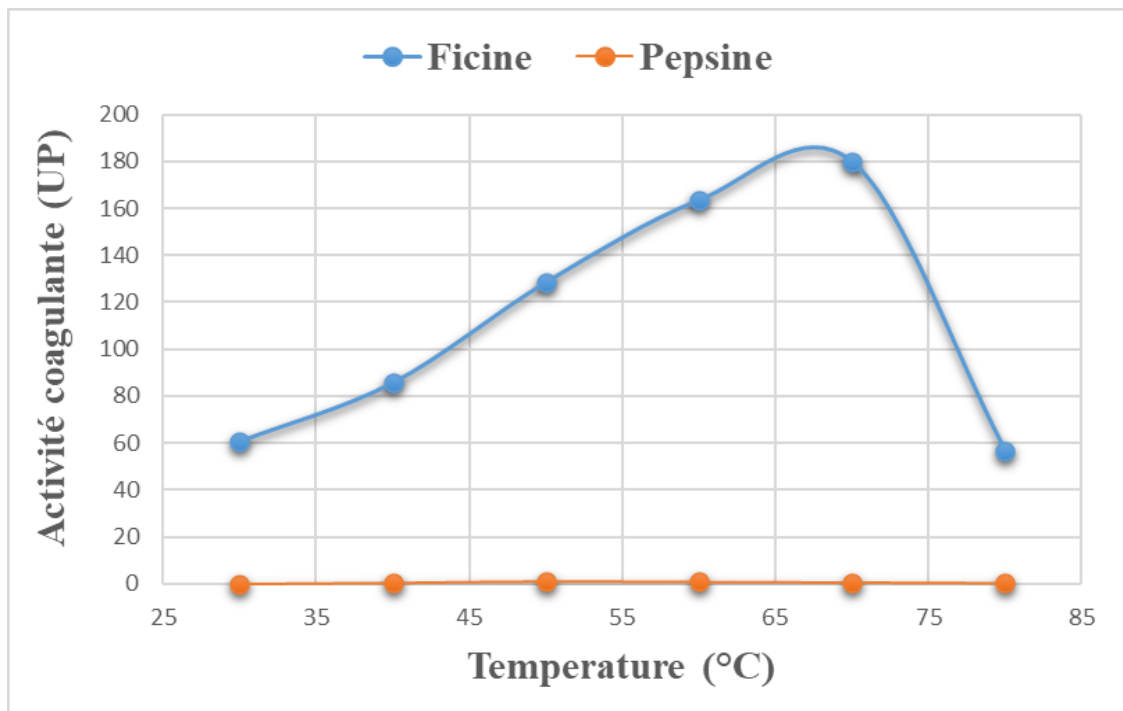
Cette variation peut être attribuée à des différences de composition et de propriétés physicochimiques spécifiques du substrat, telles que la composition en protéines, lipides, sels...etc.

#### 4.6.2.3 Comparaison de l'effet de la température sur l'activité coagulante des deux enzymes

Les courbes ci-dessous représente les variations du temps de coagulation et de l'activité coagulante des extraits étudiés par comparaison entre eux en fonction de la température du lait :



**Figure 32 :** Temps de floculation de la pepsine de poulet et la ficine en fonction de la température.



**Figure 33** : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de la ficine et la pepsine.

Selon les courbes précédemment illustrées, nous pouvons conclure que les similitudes entre la ficine et la pepsine résident dans leur capacité à coaguler le lait et leur réponse à la température. Dans les deux cas, l'activité coagulante augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à un point optimal.

Tandis que les différences entre la ficine et la pepsine incluent les températures optimales de coagulation : la ficine atteint son optimum à 65°C avec une activité d'environ 180 UP, cependant la pepsine atteint le sien à environ 50°C avec une activité d'environ 1 UP. De plus, l'activité coagulante de la ficine est nettement supérieure à celle de la pepsine, avec des valeurs d'activité beaucoup plus élevées.

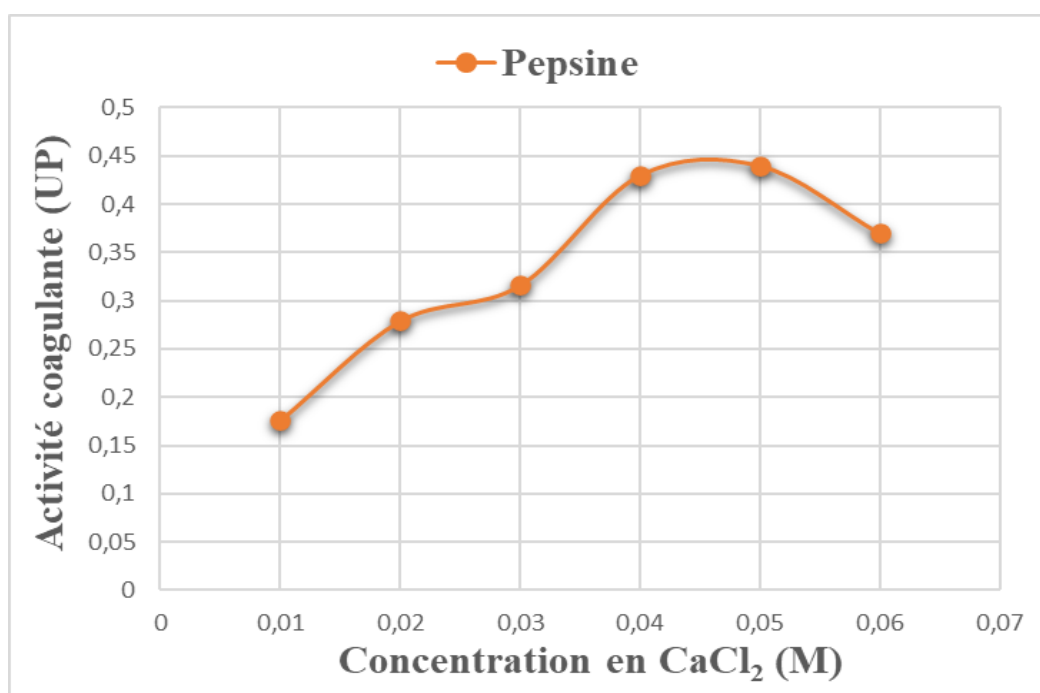
La différence entre les températures optimales d'activité coagulante pour la ficine et la pepsine reflète leurs origines biologiques respectives. La ficine, une enzyme végétale, est mieux adaptée aux températures plus élevées, comme celles trouvées dans les environnements où les plantes se développent. En revanche, la pepsine, étant une enzyme d'origine animale, est optimale à des températures plus modérées, reflétant les conditions thermiques typiques des organismes animaux.

### 4.6.3 Influence de la concentration en $\text{CaCl}_2$

La concentration optimale en  $\text{CaCl}_2$  du lait est déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait additionné de quantités de  $\text{CaCl}_2$  variant de 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,05 et 0,06 M.

#### 4.6.3.1 Influence de la concentration en $\text{CaCl}_2$ sur l'activité coagulante de la pepsine

Les variations de l'activité coagulante du substrat de Berridge par la pepsine en fonction de la concentration du  $\text{CaCl}_2$  sont présentées dans la figure 34.



**Figure 34** : Influence de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  sur l'activité coagulante de la pepsine.

Les résultats indiquent que l'activité coagulante des extraits enzymatiques de la pepsine de poulet augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration du  $\text{CaCl}_2$ , comme observé dans la figure 33.

D'après **Gordin et Rosenthal (1977)**, l'activité coagulante enzymatique dépend de la concentration du  $\text{CaCl}_2$ . Ce facteur, à des concentrations élevées, réduit le temps de coagulation et par conséquent augmente significativement l'activité coagulante.

Dans nos conditions de travail, la concentration en chlorure de calcium de 0,04 M est considérée comme une concentration optimale utilisée pour la

préparation du substrat de Berridge en vue d'évaluer le temps de floculation et par la suite estimer l'activité coagulante.

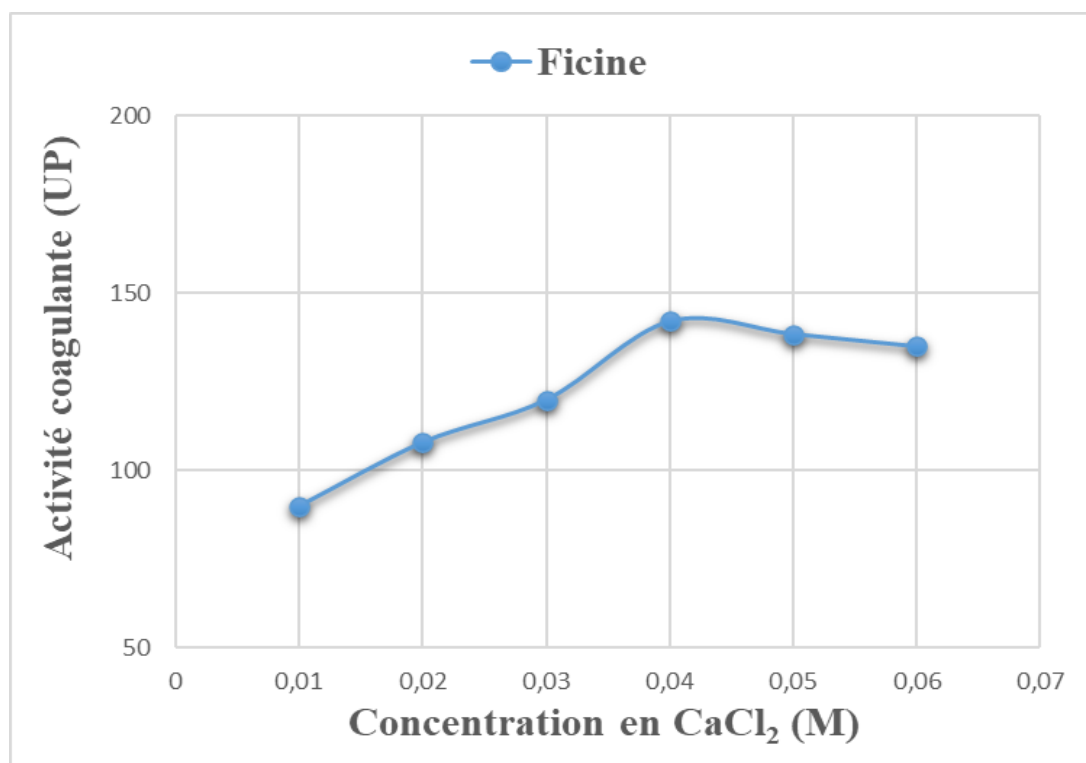
**Nouani *et al.*, (2009)** ont trouvé que l'optimum d'activité pour la préparation coagulante purifiée de poulet est de 0,02 M.

Selon **Nôel *et al.*, (1989)**, l'addition de calcium à pH constant n'a pas d'influence sur la réaction d'hydrolyse enzymatique mais elle accélère la réaction d'agrégation des micelles hydrolysée, ainsi il est bien établi que la phase de gélification est purement chimique, et elle dépend étroitement de la teneur en calcium.

En revanche, l'excès de calcium provoque une inhibition de la coagulation, du fait qu'il bloque certains sites réactifs indisponibles pour la réticulation des molécules de para caséine, induisant ainsi une précipitation partielle des caséines du lait (**Baumy *et Brulé*, 1986 ; Mc Mahon *et al.*, 1984**).

#### 4.6.3.2 Influence de la concentration en $\text{CaCl}_2$ sur l'activité coagulante de la ficine

Les variations du temps de floculation du substrat de Berridge par la ficine en fonction de la concentration du  $\text{CaCl}_2$  sont présentées dans la figure 35.



**Figure 35 :** Effet de la variation de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  sur l'activité coagulante du lait l'extrait de la ficine.

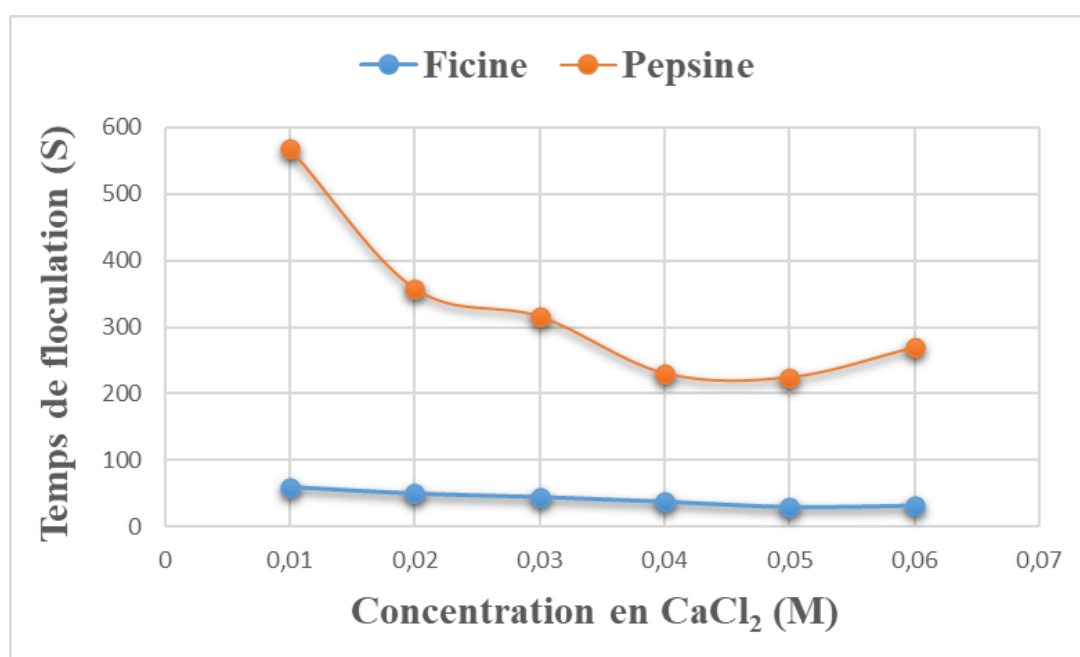
Les résultats obtenus de la présente étude montrent que pour l'intervalle de concentration en  $\text{CaCl}_2$  étudié, l'activité coagulante augmente avec la concentration en  $\text{CaCl}_2$ .

L'activité coagulante optimale de la ficine, évaluée à 143.15 UP, est atteinte à une concentration de 0.04 M. Cette concentration dépasse celle rapportée par (Nouani, Dako *et al.*, 2009), qui était évaluée à 0,02 M de  $\text{CaCl}_2$ .

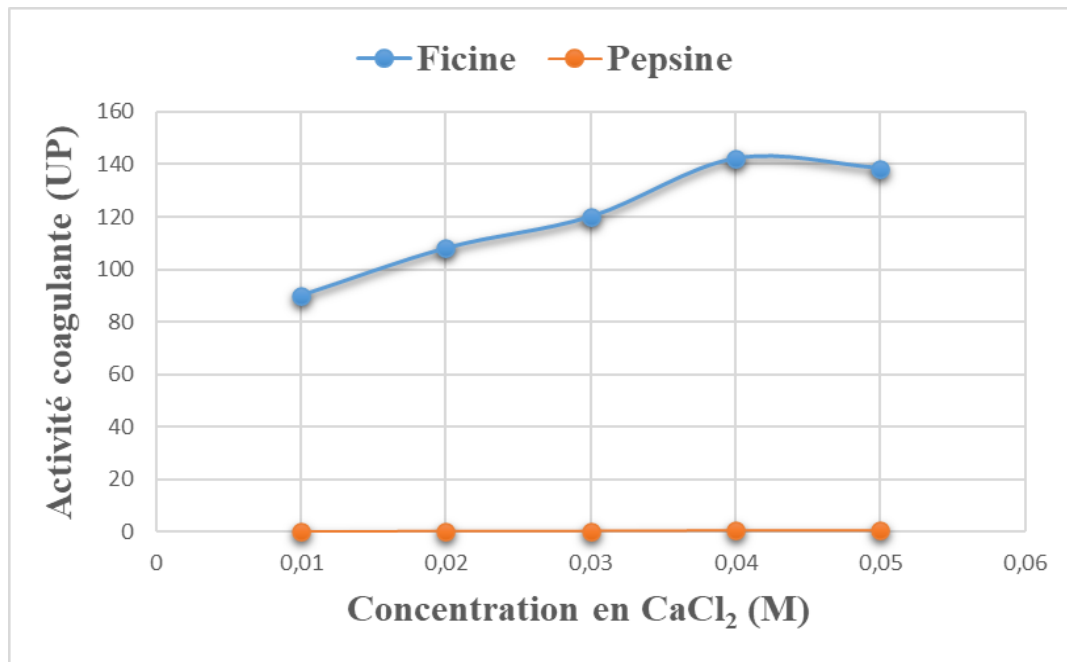
Le fait d'ajouter du chlorure de calcium au lait provoque une baisse de son pH. Il s'agit probablement d'un échange d'ions  $\text{H}^+$  par  $\text{Ca}^{++}$  sur la protéine (Alais *et Lagrange*, 1972).

#### 4.6.3.3 Comparaison de l'effet de la concentration en $\text{CaCl}_2$ sur l'activité coagulante des deux enzymes

Les figures 36 et 37 illustrent respectivement l'évolution du temps de coagulation et de l'activité coagulante des extraits étudiés par comparaison entre eux, en fonction de la variation de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  utilisée pour la préparation du substrat de Berridge.



**Figure 36 :** Influence de la variation de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  du lait sur le temps de floculation des deux enzymes étudiées.



**Figure 37 :** Influence de la variation de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  du lait sur l'activité coagulante des deux extraits enzymatiques.

Dans les deux études des enzymes, il est observé que l'activité coagulante augmente avec l'augmentation de la concentration de  $\text{CaCl}_2$ . Cependant, il y a des différences dans les concentrations optimales de  $\text{CaCl}_2$  et dans les valeurs d'activité coagulante obtenues pour la pepsine et la ficine.

Pour la pepsine de poulet, l'activité coagulante est évaluée à une concentration optimale de 0,04 M de  $\text{CaCl}_2$ , avec une activité coagulante d'environ 0,45 UP. En revanche, dans l'étude sur la ficine, l'activité coagulante optimale est observée à la même concentration de  $\text{CaCl}_2$ , à 0,04 M, mais avec une valeur d'activité coagulante beaucoup plus élevée, évaluée à 143,15 UP.

La similarité dans les concentrations optimales de  $\text{CaCl}_2$  pour l'activité coagulante entre la ficine et la pepsine peut indiquer une similarité dans les mécanismes de liaison ou d'activation de ces deux enzymes par le calcium. Le calcium joue souvent un rôle essentiel dans l'activité de nombreuses enzymes, agissant comme cofacteur ou participant à la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Ainsi, bien que les origines biologiques et les fonctions spécifiques des enzymes puissent différer, la nécessité d'une concentration de  $\text{CaCl}_2$  similaire pour leur activité coagulante optimale suggère un rôle critique du calcium dans leur fonctionnement enzymatique.



# Conclusion

### CONCLUSION

Cette étude a permis de contribuer à la recherche des substituts de la présure pouvant être utilisés à des fins industrielles. À cet effet, nous avons examiné deux enzymes différentes : la première est d'origine animale, la pepsine de poulet, tandis que la seconde est d'origine végétale, la ficine.

L'objectif de cette étude est d'analyser les caractéristiques des deux agents de coagulants proposés, c'est pourquoi nous avons suivi deux étapes dans notre approche méthodologique. Premièrement, la récupération des matières premières contenant les systèmes enzymatiques recherchés, ensuite l'extraction des enzymes.

Deuxièmement, la caractérisation des extraits en déterminant l'activité et la force Coagulante, teneur en protéines, l'activité protéolytique, et les conditions optimales d'activité (pH, température et la concentration en  $\text{CaCl}_2$ ).

Les résultats obtenus sont permis d'avoir la caractérisation des deux enzymes étudiées qui sont les suivantes :

L'extrait clarifié de pepsine de poulet obtenu, a une activité coagulante de 2 UP avec un temps de floculation d'environ 50 secondes et une force coagulante de 1/2385,68 UAC. Le rendement d'extraction estimé à 61,04 %.

La ficine quant à elle a une activité coagulante de 270 UP avec un temps de floculation d'environ 20 secondes et une force coagulante de 1/40000 UAC. Le rendement d'extraction est d'environ 62,5 %.

La teneur en protéines dans l'extrait clarifié de pepsine de poulet obtenu est de 32,92 mg/ml. Avec une activité protéolytique estimé à 134,4  $\mu\text{g/ml.min}$ .

Alors que pour la ficine elle est de 100,66 mg/ml, son activité protéolytique estimé à 154,7  $\mu\text{g/ml.min}$ .

Les résultats obtenus sur l'impact des variations de température, de pH et de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  sur la coagulation de la pepsine et de la ficine sont révélateurs. Le pH optimal de coagulation pour l'extrait de ficine et de pepsine évalué à 5,5 est le même pour les deux enzymes. Concernant la température optimale de coagulation, les résultats indiquent une disparité entre les deux enzymes. En effet, la coagulation du lait par la pepsine de poulet atteint son optimum à 50°C, tandis que celle de la ficine est de 65°C. En ce qui concerne la

concentration en chlorure de calcium, l'optimum pour la pepsine et la ficine est le même à savoir 0,04 M.

Pour conclure, nous pourrions affirmer que les résultats obtenus semblent intéressants d'autant qu'ils montrent la possibilité d'obtention des extraits enzymatiques de produits locaux capables de remplacer la présure dans l'industrie fromagère.

Toutefois, il serait utile de compléter cette étude par :

- L'optimisation des conditions d'extraction pour améliorer le rendement.
- L'étude des différents facteurs influençant l'extraction de ces deux enzymes afin d'améliorer la qualité des extraits et le rendement d'extraction.
- La purification de ces enzymes qui pourrait ouvrir la voie à d'autres applications.
- Ainsi que l'étude de la possibilité d'employer l'extrait enzymatique de la pepsine et la ficine pour la fabrication d'autres types de fromages que ceux déjà métrisés.

# Résumés

## Résumé

Ce projet de recherche explore deux principaux axes : tout d'abord, il se concentre sur l'étude de quelques caractéristiques physico-chimiques du lait, la collecte des matières premières renfermant les systèmes enzymatiques recherchés, et l'extraction des enzymes coagulantes pour trouver une alternative possible à la présure.

Ces enzymes proviennent des proventricules de poulet (pepsine) et du latex du figuier (ficine). Ensuite, la caractérisation de l'extrait enzymatique se fait en déterminant l'activité et la force coagulante des enzymes extraites qui sont évaluées en mesurant le temps de floculation du lait.

Pour mieux comprendre le profil coagulant de la pepsine de poulet par rapport à celui de la ficine de figuier, une analyse est menée sur la variation du temps de floculation en fonction des changements de pH, de température et du CaCl<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait de la pepsine clarifiée présente une activité coagulante de 2 UP, une force coagulante de 2385,68, et une activité protéolytique estimée à 134,4 µg/ml.min. L'extrait brut de la ficine possède une activité coagulante de 270 UP, une force coagulante de 40000, et une activité protéolytique estimée à 154,7 µg/ml.min.

**Mots clés :** Extraction, Coagulation, Pepsine, Ficine, force coagulante, activité coagulante, activité protéolytique.

## Abstract

This research project explores two main axes: firstly, it focuses on studying some physicochemical characteristics of milk, collecting raw materials containing the desired enzymatic systems, and extracting coagulating enzymes to find a possible alternative to rennet.

These enzymes come from chicken proventriculus (pepsin) and fig tree latex (ficin). Next, the enzymatic extract is characterized by determining the activity and coagulating strength of the extracted enzymes, which are evaluated by measuring the milk's flocculation time.

To better understand the coagulating profile of chicken pepsin compared to fig tree ficin, an analysis is conducted on the variation of flocculation time depending on changes in pH, temperature, and CaCl<sub>2</sub> concentration in the reaction medium.

The results show that the clarified pepsin extract exhibits a coagulating activity of 2 UP, a coagulating strength of 2385.68, and an estimated proteolytic activity of 134.4 µg/ml.min. The crude extract of ficin has a coagulating activity of 270 UP, a coagulating strength of 40000, and an estimated proteolytic activity of 154.7 µg/ml.min.

**Keywords:** Extraction, Coagulation, Pepsin, Ficin, coagulating force, coagulating activity, proteolytic activity.

## الملخص

هذا البحث يستكشف محورين رئيسيين: أولاً، يركز على دراسة بعض الخصائص الفيزيائية والكيميائية للحليب، وجمع المواد الخام التي تحتوي على الأنظمة الإنزيمية المطلوبة، واستخراج الإنزيمات المختثرة للعثور على بديل ممكن للخميرة.

هذه الإنزيمات تأتي من البروفنتريكولوس الدجاج (الببسين) ومادة اللاتكس من شجرة التين (فيسين). بعد ذلك، يتم توصيف الاستخراج الإنزيمي عن طريق تحديد النشاط وقوة التخثر للإنزيمات المستخرجة التي يتم تقييمها من خلال قياس وقت تكثف الحليب.

لفهم البروفيل التخثري للببسين الدجاج مقارنة بفيسين شجرة التين بشكل أفضل، يُجرى تحليل على تغير وقت التكتل اعتماداً على التغيرات في قيمة الحموضة الهيدروجينية، ودرجة الحرارة، وتركيز كلوريد الكالسيوم في الوسط التفاعلي.

تظهر النتائج المُستخلصة أن الاستخراج الببسين المُوضح يعرض نشاط تخثري يُقدر بحوالي 2 وحدة، وقوة تخثرية بقيمة 2385.68، ونشاط بروتيني مُقدر بحوالي 134.4 ميكروغرام/مل. دقيقة. يحتوي الاستخراج الخام للفيسين على نشاط تخثري بقيمة 270 وحدة، وقوة تخثرية بقيمة 40000، ونشاط بروتيني مُقدر بحوالي 154.7 ميكروغرام/مل. دقيقة.

**الكلمات الرئيسية :** استخلاص، تخثر، ببسين، فيسين، قوة التخثر، النشاط التخثري، النشاط البروتيني .

### A

- **Adoui, F., (2007).** Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir des proventricules de poulet. Mémoire magister. Univ. Mentouri Constantine. 64p.
- **Adoui, F., & Zidoune, M. N. (2007).** *Extraction d'enzyme coagulant de lait à partir de proventricules de poulet* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).
- **Adoui, F., Boudefa, M., Bouguemra, B., & Boughellout, H. (2022).** Formulation de préparations fromagères à tartiner à base de cheddar et d'emmental. *Revue des Sciences et de la Technologie*, 40, 63-69.
- **Afnor, (1993).** Contrôle de la qualité des produits alimentaires : lait et produits laitiers : analyses physicochimiques, Paris La Défense, 4e éd, 581 p.
- **Agrawal, A. A., & Konno, K. (2009).** Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40, 311-331.
- **Akar, B., & Fadiloglu, S. (1999).** Teleme production by purified ficin. *Journal of Food Quality*, 22(6), 671-680.
- **Alais, C., (1984).** Sciences du lait, principes des techniques laitières, 4ème édition,SEPAIC, 818 p.
- **Alais, C., & Novak, G. (1968).** Étude d'un enzyme coagulant microbien dérivé de *Endothia parasitica*. I-Propriétés biochimiques de l'enzyme coagulant Pfizer et propriétés rhéologiques des caillés formés dans le lait. *Le lait*, 48(477), 393-418.
- **Alais, C., & Lagrange, A. (1972).** Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*. I. Activité coagulante et activité protéolytique. *Le lait*, 52(517), 407-427.
- **Alamargot, J. (1982).** Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaires, édition du point vétérinaire- Alfort 1982, 289 p.
- **Altun, G. D., & Cetinus, S. A. (2007).** Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food chemistry*, 100(3), 964-971.
- **Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P., & Simpson, R. (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. *Science et technologie du lait*, 1-74. <https://agronomie.info/fr/generalites-sur-le-lait/>
- **Amimour, M. (2019).** Essais d'optimisation des procédés de fabrication des fromages traditionnels de qualité (jben et klila) (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).



- **Anifantakis, E. M., & Kandarakis, J. C. (1983).** Use of bovine pepsin in the manufacture of feta cheese from sheep's milk [composition, organoleptic properties]. *Lait*.
- **Antonov, V.K., Ginodman, L.M., Kapitannikov, Y.V., Barshevskaya, T.N., Gurova, A.G., & Rušmsh, L.D. (1978).** Mechanism of pepsin catalysis: general base catalysis by the active-site carboxylate ion. *FEBS Lett.* 88, 87e90.
- **Aouissi, L., & Brinet, H. (2016).** Extraction de la pepsine à partir des proventricules des volailles et aptitude à la coagulation du lait. Mémoire de master académique, Université 8 Mai 1945 Guelma, 45 p.
- **Armstrong, W. P. (2006).** Sex determination and life cycle of *Ficus carica*. *Journal of Botanical Research*, 25(3), 123-135.
- **Aworh, O. C., & Nakai, S. (1986).** Extraction of milk clotting enzyme from Sodom apple (*Calotropis procera*). *Journal of Food Science*, 51(6), 1569-1570.
- **Aworh, O. C., & Muller, H. G. (1987).** Cheese-making properties of vegetable rennet from sodom apple (*Calotropis procera*). *Food chemistry*, 26(1), 71-79.
- **Azarkan, M., Dibiani, R., Baulard, C., & Baeyens-Volant, D. (2006).** Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and activity. *International journal of biological macromolecules*, 38(3-5), 216-224.
- **Azdad, O., Mejrhit, N., & Aarab, L. (2018).** Reduction of the allergenicity of cow's milk  $\alpha$ -lactalbumin under heat-treatment and enzymatic hydrolysis in Moroccan population. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 50(4), 177-183.

### **B**

- **Baba, W. N., Baby, B., Mudgil, P., Gan, C. Y., Vijayan, R., & Maqsood, S. (2021).** Pepsin generated camel whey protein hydrolysates with potential antihypertensive properties: Identification and molecular docking of antihypertensive peptides. *Lwt*, 143, 111135.
- **Balcones, E., Olano, A., & Calvo, M. M. (1996).** Factors affecting the rennet clotting properties of ewe's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 1993-1996.
- **Beaudryet, M., Sylvie, C., & Julie, L. (2006).** Biologie de l'allaitement : Le sein, Le lait, Le geste, Presses de l'Université du Québec, 570 p.
- **Bekhit, A. A., Hopkins, D. L., Geesink, G., Bekhit, A. A., & Franks, P. (2014).** Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(8), 1012-1031.

- **Belhamiche, N. (2005).** *Extraction, purification et caractérisation de la coagulase de *Mucor pusillus**. Mémoire Mag. Sces. agro., Inst. Nat. Agro., El-Harrach, 57 p.
- **Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009).** *Food chemistry*. 4ème Ed Springer Verlag Berlin, P.1070
- **Bensalah, A., et Korib, H. (2013).** Contribution à l'étude de quelques variétés de figuier dans la région de Tlemcen. Mémoire de Master en agronomie, 10, 13, 15, 33 p.
- **Benyahia-Krid, F.A., ATTIA, H., ZIDOUNE, M.N., (2010).** Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: Interactions and microstructure. *J. of Agriculture, Biotechnology and Ecology*, vol.3, pp: 75-86.
- **Benyahia, F. (2013).** Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des proventricules de volailles au profit de la filière lait en Algérie, Doctorat en sciences, Université Constantine 1.119p
- **Benyahia-Krid, F. A., Aissaoui-Zitoun, O., Boughellout, H., Adoui, F., Harkati, A., Siar, E. H., ... & Zidoune, M. N. E. (2016).** Chicken pepsin and rennet gels: Internal bonds, rheology and microstructure. *J. Vet. Sci. Technol*, 7, 375.
- **Berridge, N. J. (1945).** The purification and crystallization of rennin. *Biochemical Journal*, 39(2), 179.
- **Bohak, Z. (1969).** Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *Journal of Biological Chemistry*, 244(17), 4638-4648.
- **Bohak, Z. (1970).** Chicken pepsinogen and chicken pepsin. In *Methods in Enzymology* (Vol. 19, pp. 347-358). Academic Press.
- **Bouakkaz, S. (2013).** *Métabolites secondaires du figuier *Ficus carica L.*, Isolement, identification structurale, dosage par HPLC couplée à la spectrométrie de masse et activités biologiques* (Doctoral dissertation).
- **Bougatef, A., Balti, R., Zaied, S. B., Souissi, N., & Nasri, M. (2008).** Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences. *Food Chemistry*, 107(2), 777-784.
- **Boughellout, H. (2007).** Coagulation du lait par la pepsine du poulet. Mémoire magister, université Mentouri constantine, 69p.
- **Boujenah, H., (2012).** Aptitude à transformation de lait camelin en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de camelins. Thèse de doctorat en science Biologique, université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- **Bouyoucef, Y., & Taouzinet A. (2016).** Obtention et caractérisation d'une protease coagulante de *Penicillium sp.* Thèse doctorat en sciences alimentaire. Université de Béjaia, Algérie

- **Bretonneau, J., & Faure, Y. (1990).** Atlas d'arboriculture fruitière. Ed. Tes et doc Lavoisier, 3eme Edition, 4, 289.
- **Brulé, G., & Lenoir, J. (1984).** Le fromage. 3 Ed. Paris, Technique & documentation (Lavoisier), p.p. 1-21.7
- **Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales. Éd Lavoisier, France, 1292 p.

### C

- **Calvo, M. M. (2002).** Influence of fat, heat treatments and species on milk rennet clotting properties and glycomacropptide formation. *European Food Research and Technology*, 214, 182-185.
- **Cayot, P., & Lorient, D. (1998).** Structures et technofonctions des protéines du lait. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 363 p
- **Choyam, S., Jain, P. M., & Kammara, R. (2021).** Characterization of a potent new-generation antimicrobial peptide of Bacillus. *Frontiers in Microbiology*, 12, 710741.
- **Cogan, U., Kopelman, I. J., & Schab, R. (1982).** Combined temperature-concentration effects on the clotting rate of chicken pepsin. *Journal of Dairy Science*, 65(7), 1130-1134.
- **Collin, J. C., Muset de Retta, G., Martin, P. (1982).** Immunological identification of milk-clotting enzymes. *J Dairy Res*, 49, 221-230.
- **Collin, J. C. (2015).** Présures et coagulants de substitution : Comment faire le bon choix?. Editions Quae.
- **Cuvellier, G. F. (1993).** Production des enzymes In : Biotechnologie. Edition Scriban R. Coord 4eme édition Tec et Doc. Lavoisier pp, 948.

### D

- **Devaraj, K. B., Kumar, P. R., & Prakash, V. (2008).** Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from Ficus carica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11417-11423.
- **Devaraj, K. B., Kumar, P. R., & Prakash, V. (2011).** Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process biochemistry*, 46(2), 458-464.
- **Dheyauldeensalahlidin, O., Alrawi, D., & k Buniya, H. (2021).** Partial purification of pepsin enzyme produced by Staphylococcus sciuri and Pythium sp. using whey, Mater. Today, Proc.
- **Di Pierro, G., O'Keefe, M. B., Poyarkov, A., Lomolino, G., & FitzGerald, R. J. (2014).** Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by Ficus carica L.-derived proteinase. *Food chemistry*, 156, 305-311.
- **Domsalla, A., & Melzig, M. F. (2008).** Occurrence and properties of proteases in plant latices. *Planta medica*, 74(07), 699-711.

- **Durand, P. (1981).** Etude de la fraction azotée soluble de l'anchois sale en cours de maturation. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 45(4), 271-281.
- **Dybowska, B. E., & Fujio, Y. (1996).** Effect of temperature and glucono- $\delta$ -lactone (GDL) concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method. *Milchwissenschaft*, 51, 557–560.

### E

- **Eck, A., & Gillis, J. C. (1997).** Le fromage : De la science à l'assurance-qualité. 3 Ed. Paris, Technique & documentation, 891p.
- **El-Abbassy, F. M., & Wahba, A. (1986).** Milk clotting and proteolytic activities of chicken pepsin. *Journal of Dairy Science*, 69(5), 1204-1208.

### F

- **Faccia, M., Picariello, G., Trani, A., Loizzo, P., Gambacorta, G., Lamacchia, C., & Di Luccia, A. (2012).** Proteolysis of Cacioricotta cheese made from goat milk coagulated with capriferin (Ficus carica sylvestris) or calf rennet. *European Food Research and Technology*, 234, 527-533.
- **Fadyloğlu, S. (2001).** Immobilization and characterization of ficin. *Food/Nahrung*, 45(2), 143-146.
- **Feijoo-Siota, L., & Villa, T. G. (2011).** Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1066-1088.
- **Fox, P. F., McSweeney, P. L., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (Eds.). (2004).** *Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Volume 1: 3ème Ed* Elsevier Academic Press, London, P. 640

### G

- **Gagaoua, M., Boucherba, N., Bouanane-Darenfed, A., Ziane, F., Nait-Rabah, S., Hafid, K., & Boudechicha, H. R. (2014).** Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (Ficus carica L.) latex. *Separation and Purification Technology*, 132, 461-467.
- **García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, L., Munoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, á. et Vázquez, M. (2020).** Type de présure et transglutaminase microbienne dans le fromage : effet sur les propriétés sensorielles. *Recherche et technologie alimentaires européennes*, 246, 513- 526.

- **Garnier, J., Mocquot, G., Ribadeau-Dumas, B., & Maubois, J. L. (1968).** Coagulation du lait par la présure : aspects scientifiques et technologiques. In *Annales de la nutrition et de l'alimentation* (pp. B495-B548). Centre national de la recherche scientifique.
- **Gastaldi, E., PELLIGRINI, O., Lagaude, A., & De La Fuente, B. T. (1994).** Functions of added calcium in acid milk coagulation. *Journal of Food Science*, 59: 310-320.
- **Gausсен, H., Leroy, J. F., & Ozenda, P. (1982).** Précis de Botanique, tome II, végétaux supérieurs. *Ed. Masson, Paris*, 110.
- **Gelais, St., & Tirard, C. (2009).** Fromage : Science et technologie du lait transformation du lait. Canada : ED/ISBN. Canada. P 345
- **Gerber, H. J. (2010).** *Tree training and managing complexity and yield in fig (Ficus carica L.)* (Doctoral dissertation, Stellenbosch: University of Stellenbosch), 104.
- **Glick, D. M., Shalitin, Y., & Hilt, C. R. (1989).** Studies on the irreversible step of pepsinogen activation. *Biochemistry*, 28(6), 2626-2630.
- **Gonzalez-Rabade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., & del Carmen Oliver-Salvador, M. (2011).** Production of plant proteases in vivo and in vitro—a review. *Biotechnology advances*, 29(6), 983-996.
- **Gordin, S., & Rosenthal, I. (1978).** Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *Journal of food Protection*, 41(9), 684-688.
- **Gouda, A., El-Zayat, A. T., El-Safty, M. S., & Genied, R. H. (1988).** Utilization of chicken pepsin in cheese making. I. Extraction and some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(2), 277-280.
- **Goursaud, J. (1993).** Coagulation enzymatique du lait. In: Scriban R. (coord.). *Biotechnologie*. Ed. Tec. & Doc., Lavoisier, Paris, 4ème éd., pp. 393-405.
- **Green, M. L., & Llewelin, J. M. (1973).** The purification and properties of a single chicken pepsinogen fraction and the pepsin derived from it. *Biochemical Journal*, 133(1), 105-115.
- **Green, M. L., & Stackpoole, A. (1975).** The preparation and assessment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase–swine pepsin mixture for Cheddar cheese-making. *Journal of Dairy Research*, 42(2), 297-312.
- **Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., & Wiczak, W. (2007).** Cysteine proteases. *Industrial enzymes : structure, function and applications*, 181-195.

## H

- **Haesslein, D., & Oreiller, S. (2008).** Fraîche ou séchée, la figue est dévoilée Heds (Haute école de santé) Genève. *Filière nutrition et diététique*, 1-4.

- **Hamrani, L. (2008).** *Étude comparative de deux protéases coagulant le lait, extraites de pro ventricules de poulet (Gallus gallus) et d'estomacs de limon (Seriola sp.)* (Doctoral dissertation, INA).
- **Haard, N. F. (1992).** A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(1), 17-35.
- **Hartmeier, W. (1979).** Immobilized pepsin: properties and use to prevent haze formation in beer and wine. *Biotechnology Letters*, 1, 225-230.
- **Horne, D. S., & Muir, D. D. (1994).** Genetic polymorphism of  $\kappa$ -casein and rennet coagulation time: Effects of serum phase components. *Journal of Dairy Research*, 61(4), 591-603.
- **Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Wang, H., & Zhou, K. (2009).** Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. *Food Chemistry*, 117(3), 438-443.
- **Huppertz, T., Upadhyay, V. K., Kelly, A. L., & Tamime, A. Y. (2006).** Constituents and properties of milk from different species. Brined cheeses, 1-42.

### I

- **Ilboudo, A. J., Savadogo, A., Seydi, M. G., & Traore, A. S. (2012).** Place de la matière azotée dans le mécanisme de la coagulation présure du lait. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(6), 6075-6087.
- **Isselnane, S. (2014).** *Caractérisation chromatographique et électrophorétique de l'extrait coagulant issu de caillettes de dromadaires adultes* (Mémoire de magister en science biologiques, Université Mouloud Mammeri).

### J

- **Jarmul, I., Reps, A., Poznanski, S., & Zelazowska, H. (1982).** Utilisation du mélange de la pepsine avec la préparation microbienne "Fromase" dans la fabrication des fromages Edam et Kortowski. *Le lait*, 62(611-612), 75-86.
- **Janick, J. (2006).** Ficus carica fig. En: The encyclopedia of fruit and nuts. CAB International, 493-503.
- **Jeantet, R. (2007).** Science des aliments : biochimie, microbiologie, procédés, produits. Paris, Lavoisier, 456 p.
- **Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P., & Brulé, G. (2007).** *Les produits laitiers* (pp. 184-p). Editions Tec & Doc Lavoisier.

- **Johnston, N., Dettmar, P. W., Ondrey, F. G., Nanchal, R., Lee, S. H., & Bock, J. M. (2018).** Pepsin: biomarker, mediator, and therapeutic target for reflux and aspiration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1434(1), 282-289.
- **Joseph, J., & Raj, S. J. (2011).** Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn-an overview *Research. 3* : pp 08-12.

### K

- **Katsaros, G. I., Katapodis, P., & Taoukis, P. S. (2009).** High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering*, 91(1), 42-48.
- **Kailasapathy, K. (2015).** Chemical composition, physical, and functional properties of milk and milk ingredients. *Dairy processing and quality assurance*, 77-105.
- **Kersten, A. (1937).** Le lait. 918-927p, 53-59
- **Kjellberg, F., Doumesche, B., & Bronstein, J. L. (1988).** Longevity of a fig wasp (*Blastophaga psenes*). *Ecological Entomology*, 13(4), 389-395.
- **Kim, Y. S., Park, S. J., Lee, E. J., Cerbo, R. M., Lee, S. M., Ryu, C. H., ... & Ha, Y. L. (2008).** Antibacterial compounds from rose Bengal-sensitized photooxidation of  $\beta$ -caryophyllene. *Journal of food science*, 73(7), C540-C545.

### L

- **Larbier, M., & Leclercq, B. (1992).** *Nutrition and feeding of poultry* (pp. 355-pp).
- **Lansky, E. P., Paavilainen, H. M., Pawlus, A. D., & Newman, R. A. (2008).** *Ficus* spp.(fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(2), 195-213.
- **Lecoq, R. (1965).** Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles, tome II, éditions DOIN-DERENET Cie, France, 1240 p.
- **Lenoir, J., Remeuf, F., & Schneid, N. (2006).** Le lait de fromagerie in : « le fromage ». Paris, Ed. Tech. Et Doc. Lavoisier (3ème édition), p.p. 229- 253.
- **Lombardi, J., Ciocia, F., Uniacke-Lowe, T., Boeris, V., Risso, P. et McSweeney, PLH. (2019).** Application d'un extrait enzymatique d'*Aspergillus niger* comme coagulant pour la fabrication du fromage cheddar. *Archives brésiliennes de biologie et de technologie*, 62, e19180128.
- **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.

- **Luo, Q., Chen, D., Boom, R. M., & Janssen, A. E. (2018).** Revisiting the enzymatic kinetics of pepsin using isothermal titration calorimetry. *Food chemistry*, 268, 94-100.
- **Luquet, F. M., & Boudier, J. F. (1976).** Lexique des termes utilisés en industrie laitière. *Lait*, 56(558-559), 255-274.

### M

- **Mahaut, M., Jeantet, R., & Brulé, G. (2000).** Initiation à la technologie fromagère. TEC & DOC Lavoisier : Paris ; 194 p.
- **Mahaut, M., Jeantet, R., & Brulé, G. (2003).** Initiation à la technologie fromagère. Paris, Lavoisier, Technique Et Documentation, Lavoisier, France ; Pp 24-102.
- **Mahaut, M., Jeantet, R., & Brule, G. (2005).** Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc, Paris, France. 1-21.
- **Mandy, J., Jaros, D., & Rohm, H. (2011).** Recent advances in milk clotting enzymes. *International journal of dairy technology*, 64(1), 14-33.
- **Marcel, M. e. (2007).** Milk clotting protease : structure, fonction ; Milk (Vol. 35).
- **Marshall, R. J. (1982).** An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *Journal of Dairy Research*, 49(2), 329-336.
- **Martin, P., Collin, J., Garnot, P., Ribadeau-Dumas, B., & Mocquot, G. (1982).** Méthodes d'analyse quantitative des "extraits de présure et de pepsine bovines". Détermination des teneurs en enzymes actifs. *Lait*, 62(616-617), 206-215.
- **Mathieu, U. (1981).** Présure, pepsine bovine et protéase acide en fromagerie. Circulation du 28 janvier 1981, technique laitière. Vol : 954. P 51-52.
- **Matoub, L. (2000).** Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Mémoire de Magister. *Sciences alimentaires. INA El-Harrach*.
- **Mauri, N. (1960).** Les figuiers cultivés en Algérie. Documents et renseignements agricoles, bulletin N° 5, 66p.
- **Mazloomi, S. N., Mahoonak, A. S., Mora, L., Ghorbani, M., Houshmand, G., & Toldrá, F. (2021).** Pepsin hydrolysis of orange by-products for the production of bioactive peptides with gastrointestinal resistant properties. *Foods*, 10(3), 679.
- **Mechakra, A., Auberger, B., Remeuf, F., & Lenoir, J. (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sciences des Aliments (France)*, 19(6).



- **McMahon, D. J., Richardson, G. H., & Brown, R. J. (1984).** Enzymic milk coagulation: Role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *Journal of Dairy Science*, 67(6), 1185-1193.
- **McMahon, D. J., & Brown, R. J. (1990).** Development of surface functionality of casein particles as the controlling parameter of enzymic milk coagulation. *Colloids and surfaces*, 44, 263-279.
- **McSweeney, P. L. (2004).** Biochemistry of cheese ripening. *International journal of dairy technology*, 57(2-3), 127-144.
- **Meridor, D., & Gedanken, A. (2014).** Enhanced activity of immobilized pepsin nanoparticles coated on solid substrates compared to free pepsin. *Enzyme and microbial technology*, 67, 67-76.
- **Michel, A. (2002).** La rousse agricole.
- **Mietton, B., Desmazeaud, M., De Roissart, H., & Weber, F. (1994).** Transformation du lait en fromage. In : de Roissart H. & Luquet F.M. (Coord.). Les bactéries lactiques (Vol. II).Ed. Loriga, Uriage, FR, pp.
- **Montilla, A., Balcones, E., Olano, A., & Calvo, M. M. (1995).** Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(7), 1908-1911.
- **Morellon-Sterling, R., Tavano, O., Bolivar, J. M., Berenguer-Murcia, Á., Vela-Gutiérrez, G., Sabir, J. S., ... & Fernandez-Lafuente, R. (2022).** A review on the immobilization of pepsin: A Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline pH values. *International journal of biological macromolecules*, 210, 682-702.

### N

- **Nájera, A. I., De Renobales, M., & Barron, L. J. R. (2003).** Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food chemistry*, 80(3), 345-352.
- **Nassar, A. H., & Newbury, H. J. (1987).** Ficin production by callus cultures of *Ficus carica*. *Journal of plant physiology*, 131(3-4), 171-179.
- **Nouani, A., Hamrani, L., & Bellal, M. M. (2011).** Purification and characterization of milk clotting enzyme extracted from the chicken (*Gallus gallus*) Proventricule [Conference poster].
- **Nouani, A. (2009).** Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait. Doctorat en sciences agronomiques, INA, Alger, 135p.
- **Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet, S., Bellal, M. M., & Dadie, A. (2009).** Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex

(Ficus carica) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J. Food Technol*, 7(1), 20-29.

### O

- **Oliveira, A. P., Silva, L. R., Ferreres, F., Guedes de Pinho, P., Valentao, P., Silva, B. M., ... & Andrade, P. B. (2010).** Chemical assessment and in vitro antioxidant capacity of Ficus carica latex. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(6), 3393-3398.
- **Öner, M. D., & Akar, B. (1993).** Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in gaziantep cheese production. *LWT-Food Science and Technology*, 26(4), 318-321.
- **Oukabli, A. (2003).** Le figuier un patrimoine génétique diversifier à exploiter Unité de Recherche sur l'Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto-génétiques INRA, Centre Régional de Meknès, N° 106.

### P

- **Palma-Albino, C., Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga, K., Rodríguez-Arana, N., Solano, E., Flores, E., ... & Hernández-Ledesma, B. (2021).** Albumin from Erythrina edulis (Pajuro) as a promising source of multifunctional peptides. *Antioxidants*, 10(11), 1722.
- **Payne, T. C. (2009).** Enzymes in Meat Systems Enzymes. Chapter 8, R, Tarté (ed.), *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*, 26p.
- **Pereira, P. C. (2014).** Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6), 619-627.
- **Petersen, K. U. (2018).** Pepsin and its importance for functional dyspepsia: relic, regulator or remedy?. *Digestive Diseases*, 36(2), 98-105.
- **Polaina, J., & MacCabe, A. (2007).** Industrial enzymes: structure, function and applications. New York, Springer.

### R

- **Raj, S. J., & Baby Joseph, B. J. (2011).** Pharmacognostic and phytochemical properties of Ficus carica Linn-an overview. 3 (1), 08-12.
- **Ramet, J. P. 1997.** Les Agents de la transformation du lait. In: A. Eck and J. C. Gillis (Eds.) pp, 165-174, le fromage.
- **Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
- **Rebour, H. (1968).** *Fruits méditerranéens autres que les agrumes*. la Maison rustique maison rustique, p 190-206. **Robbins, B. H. (1930).** A Proteolytic

Enzyme in Ficin, the Anthel-mintic Principle of Leche de Higueron *J. Biol. Chem.* 87, 251-257.

- **Ribadeau-dumas, B. (1991).** Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. *Le lait*, 400 : 17-32.
- **Robbins, B. H. (1930).** A Proteolytic Enzyme in Ficin, the Anthel-mintic Principle of Leche de Higueron *J. Biol. Chem.* 87, 251-257.
- **Romain, J., Thomas, C., Mahaut, M., Schuck, P., & Brulé, G. (2008).** Les produits laitiers (éd. Tec and Doc).
- **Roy, G. (1951).** Technologie Laitière. Recueil de travaux de chimie analytique, university of Chicago 1956 .17, oct. 2011, 34-59p.

### S

- **Schmidt, D. G. (1980).** Colloidal aspects of casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 34(1), 42-64.
- **Shah, M. A., Mir, S. A., et Paray, M. A. (2014).** Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, 94, 5-16.
- **Siar, E. H., et Zidoune, M. N. (2014).** *Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).
- **Sielecki, A. R., Fedorov, A. A., Boodhoo, A., Andreeva, N. S., et James, M. N. (1990).** Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 214(1), 143-170.
- **Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005).** Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 89(1), 19-26.
- **Singleton, A., & Buttle, D. J. (2013).** Ficain. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2, 1141-1143.
- **Smith, J., et Jones, A. (2023).** Extraction optimisée de la pepsine à partir des proventricules de poulet. *Journal of Poultry Science*, 45(3), 217-225.
- **Solorza, F. J., & Bell, A. E. (1998).** The effect of calcium addition on the rheological properties of a soft cheese at various stages of manufacture. *International journal of dairy technology*, 51(1), 23-29.
- **Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (2002).** Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82(2), 151-170.

- **St-Gelais, D., et Tirard-Collet, P. (2002).** Fromage. *Science et technologie du lait : transformation du lait* coordonnateur Vignola C.C, Fondation de technologie laitière du Québec.
- **Storry, J. E., & Ford, G. D. (1982).** Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in renneted milk. *Journal of Dairy Research*, 49(3), 469-477.
- **Stover, E., Aradhya, M., Ferguson, L., & Crisosto, C. H. (2007).** The fig: overview of an ancient fruit. *HortScience*, 42(5), 1083-1087
- **Sugiura, M., & Sasaki, M. (1974).** Studies on proteinases from *Ficus carica* var. Hōraishi. V. Purification and properties of a sugar-containing proteinase (Ficin S). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 350(1), 38-47.

### V

- **Veisseyre, R. (1975).** Technologie du lait : Récolte, traitement et transformation du lait. La maison rustique, 3 Ed. Paris. 696 p.
- **Vervaeke, I. J., Dierick, N. A., Demeyer, D. I., & Decuypere, J. A. (1989).** Approach to the energetic importance of fibre digestion in pigs. II. An experimental approach to hindgut digestion. *Animal Feed Science and Technology*, 23(1-3), 169-194.
- **Vidaud, J. (1997).** Le Figuier : Monographie. Edition Centre Technique Interprofessionnel des Fruits, 267p.
- **Vierling, E. (1999).** Aliments et boissons, filières et produits CRDP d'Aquitaine, édition DOIN, 270 p.
- **Vierling, (2003).** Aliments et boissons. Filières et produits. Doin éditeurs. Centre regional de documentation pédagogique d'Aquitaine.
- **Vignola, C. L. (2002).** *Science et technologie du lait : transformation du lait*. Presses inter Polytechnique, Québec ; 608p.
- **Vilmorin, J.B. (2003).** Histoire d'arbre. Ed. Jean Paul Gisserot, 74p.
- **Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2000).** Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 451-456.

### W

- **Wang, Y. M., Li, X. Y., Wang, J., He, Y., Chi, C. F., & Wang, B. (2022).** Antioxidant peptides from protein hydrolysate of skipjack tuna milt: Purification, identification, and cytoprotection on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damaged human umbilical vein endothelial cells. *Process Biochemistry*, 113, 258-269.

- **Williams, D. C., Sgarbieri, V. C., & Whitaker, J. R. (1968).** Proteolytic activity in the genus *Ficus*. *Plant Physiology*, 43(7), 1083-1088.

### Z

- **Zhang, J., Liu, W., Fang, L., Gu, R., Lu, J., & Li, G. (2020).** Effect of acid and in vitro digestion on conformation and IgE-binding capacity of major oyster allergen Cra g 1 (tropomyosin). *Allergologia et Immunopathologia*, 48(1), 26-33.
- **Zidoune, M. N., & Adoui, F. (2017).** Extraction d'enzyme coagulant de lait à partir de proventricules de poulet. *Revue des Sciences et de la Technologie*, 33, 42-48.

# **Annexes**

### *Annexe 1*

#### **Préparation des solutions :**

##### **1- Préparation de Phénolphtaléine**

Dissolve 1 gramme de phénolphtaléine dans 100 millilitres d'alcool éthylique à 95 degrés.

##### **2- Préparation d'hydroxyde de sodium (NaOH) pour déterminer l'acidité titrable du lait**

On cherche la masse à prélever pour préparer 100 ml de NaOH avec une concentration de 0,1N :

$$m = C \times V \times M$$

$$m = 0,1 \times 0,1 \times 40$$

$$m = 0,4 \text{ g}$$

La solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) est préparée en dissolvant avec une grande précision 0.4 gramme d'hydroxyde de sodium en pastilles dans 100 ml d'eau distillée.

##### **3- Préparation de la solution d'extraction de la pepsine : (solution de macération)**

Dissoudre 3g de NaCl et 0.7g de NaHCO<sub>3</sub> dans 300 ml d'eau distillé pour 100g de proventricule

##### **4- Préparation de la Solution de Hcl 3N :**

$$V1=C2.V2/C1.$$

V1 : volume de Hcl concentré.

C1 : concentration de Hcl.

C2 : concentration de Hcl dilué.

V2 : volume de Hcl dilué.

Pour préparer 10 ml de solution Hcl de 3N on prélève 1.76 ml de Hcl concentré 17 mol/l et ont dilué par l'eau distillé jusqu'à 10 ml.

##### **5- Préparation de la Solution de NaOH 3N :**

$$m=C.V.M$$

M : la masse de NaOH.

C : concentration de solution.

## Les annexes

---

V : volume de solution.

M : molaire.

Pour préparer 10 ml de NaOH 3N on dissoudre 1.2g de NaOH de masse molaire 40 g/l dans 10 ml d'eau distillé.

### 6- Préparation de solution tampon phosphate (0.1M ; PH=7)

Préparation des solutions mères :

- Préparez une solution mère de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  à une concentration de 0,1 M en dissolvant 1,77g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dans environ 50 ml d'eau distillée. Mélangez jusqu'à dissolution complète.
- Préparez une solution mère de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à une concentration de 0,1 M en dissolvant 1,5 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dans environ 50 ml d'eau distillée. Mélangez jusqu'à dissolution complète.

- Masse molaire ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) = 177,99g/mol

177,99g  $\longrightarrow$  1mol

$$X1 = (177,99 \times 0,1) \div 1 = 17,799\text{g}$$

X1  $\longrightarrow$  0,1mol

17,799g  $\longrightarrow$  1000ml

X2  $\longrightarrow$  100ml

$$X2 = (17,799 \times 100) \div 1000 = \mathbf{1,77\text{g}}$$

- Masse molaire ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ) = 156,01g/mol

156,01g  $\longrightarrow$  1mol

$$X1 = (156,01 \times 0,1) \div 1 = 15,01\text{g}$$

X1  $\longrightarrow$  0,1mol

15,601g  $\longrightarrow$  1000ml

X2  $\longrightarrow$  100ml

$$X2 = (15,601 \times 100) \div 1000 = \mathbf{1,5\text{g}}$$

2. Mélangez doucement les deux solutions mères pour obtenir une solution homogène.



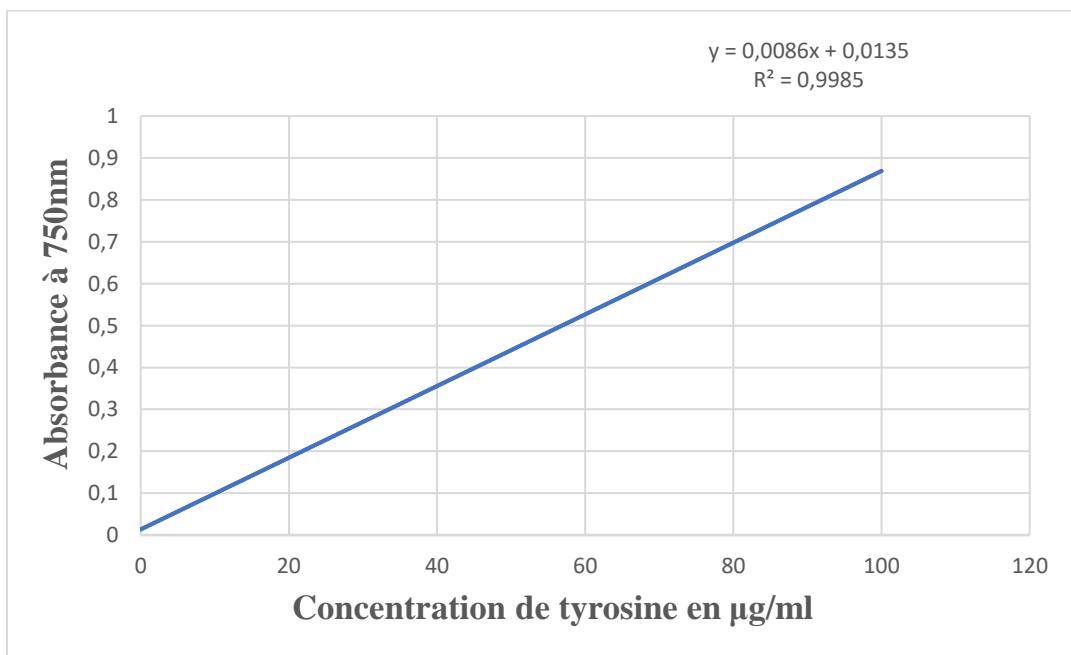
### Annexe 2

#### 1- Réalisation de la courbe d'étalonnage de la tyrosine

La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de la tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100 µg/ml selon le tableau suivant :

Concentration de Tyr (µg /ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de Tyr (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
T.C.A (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Folin-Ciocalteu dilué au 1/2	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

L'absorbance lue à 750nm permet de tracer la courbe



**Figure 38** : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine

### Annexe 3

#### 1- Dosage des protéines (Lowry et al, 1951)

##### 1) Préparation des Solutions

###### - Solution A :

5g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 100 ml Eau distillée

###### - Solution B :

0.5 g Cu SO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O + 1g Tartrate double de Na et K + 100 ml Eau distillée

###### - Solution C :

50 ml de la solution A + 2 ml de la solution B à préparer immédiatement.

###### - Solution D :

4g NaOH (1 N) + 1000 ml Eau distillée

###### - Solution E :

0.5 ml Réactif de folin ciocalteau

###### - Solution F :

200 mg BSA + 100 ml Eau distillée

##### 2) Gamme étalon

A partir de la solution mère de BSA des dilutions sont préparé selon le tableau ci- dessous :

Concentration en BSA µg/ml	0	25	50	75	100	150	200
Solution mère BSA (ml)	0	0.125	0.250	0.375	0.500	0.750	1
Eau distillée (ml)	1	0.875	0.750	0.625	0.500	0.250	0

##### 3) Méthode :

- 1- Prélevez 1 ml de l'échantillon.
- 2- Ajoutez 3 ml de la solution C et agitez pour mélanger.
- 3- Ajoutez ensuite 1 ml de la solution D.
- 4- Laissez reposer pendant 10 minutes à température ambiante.

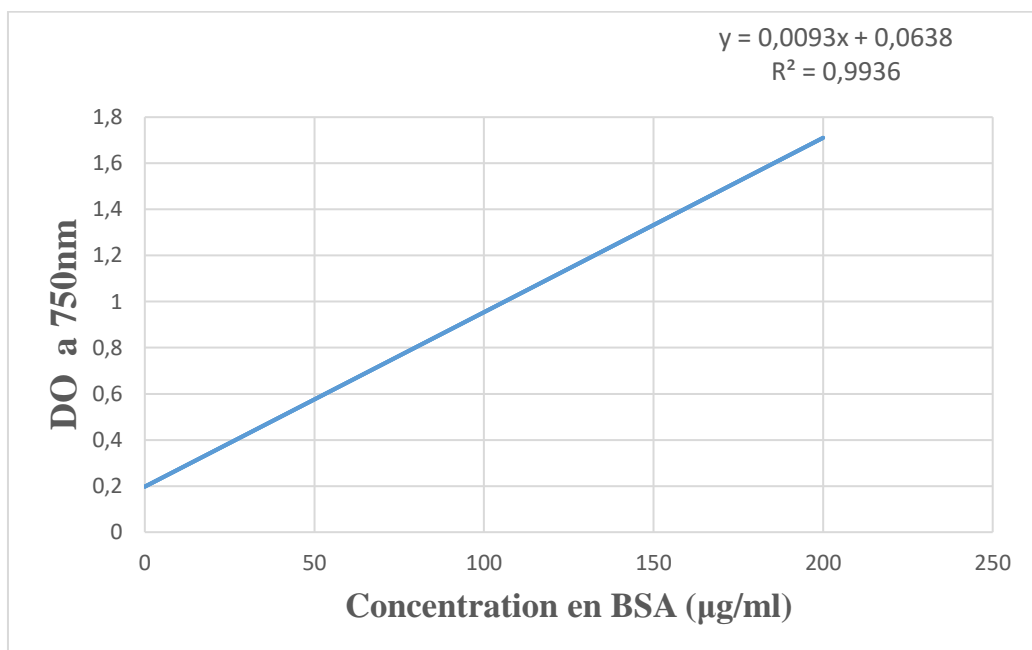
## Les annexes

- 5- Ajoutez 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu.
- 6- Mesurez l'absorbance à une longueur d'onde de 750 nm.

### 4) Expression des résultats :

Une courbe étalon est tracé en portant sur l'axe des abscisses les concentrations en BSA des dilutions préalables préparées et sur l'axe des ordonnées les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration en protéines inconnue X, est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetées sur l'axe des abscisses.



**Figure 39 :** Courbe d'étalonnage de la BSA

**Année universitaire : 2023-2024**

**Présenté par : BENTAILA Wissal  
HAMEL Sara**

**Thème : Evaluation, Extraction et caractérisation des deux protéases : la pepsine du poulet et la ficine de figuier et leurs utilisations dans la coagulation du lait.**

**Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master  
Domaine : Science de la Nature et de Vie  
Filière : Biochimie  
Spécialité : Biochimie appliquée**

### **Résumé**

Ce projet de recherche explore deux principaux axes : tout d'abord, il se concentre sur l'étude de quelques caractéristiques physico-chimiques du lait, la collecte des matières premières renfermant les systèmes enzymatiques recherchés, et l'extraction des enzymes coagulantes pour trouver une alternative possible à la présure.

Ces enzymes proviennent des proventricules de poulet (pepsine) et du latex du figuier (ficine). Ensuite, la caractérisation de l'extrait enzymatique se fait en déterminant l'activité et la force coagulante des enzymes extraites qui sont évaluées en mesurant le temps de floculation du lait.

Pour mieux comprendre le profil coagulant de la pepsine de poulet par rapport à celui de la ficine de figuier, une analyse est menée sur la variation du temps de floculation en fonction des changements de pH, de température et du  $\text{CaCl}_2$  dans le milieu réactionnel.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait de la pepsine clarifiée présente une activité coagulante de 2 UP, une force coagulante de 2385,68, et une activité protéolytique estimée à 134,4  $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$ . L'extrait brut de la ficine possède une activité coagulante de 270 UP, une force coagulante de 40000, et une activité protéolytique estimée à 154,7  $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$ .

**Mots clés :** Extraction, Coagulation, Pepsine, Ficine, force coagulante, activité coagulante, activité protéolytique.

**Laboratoire de Biochimie – Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université les Frères Mentouri, Constantine.**

**Présidente du jury :** Mme BAHY A (Maître de Conférences A à l'UFM Constantine).

**Encadrante :** Mme BENSMIRA S (Maître Assistante A à l'UFM Constantine).

**Examinatrice :** Mme BOUKHALFA H (Maître de Conférences A à l'UFM Constantine).

