



قسم: الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزئية

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

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé

Extraction et caractérisation d'enzymes protéolytiques

Présenté par : BENNABET Meriem

Le : 28/06/2025

BOUZAA Roumeissa

Jury d'évaluation :

Président : Mr. KHEDARA A. (Maître de Conférences A à l'UFM Constantine).

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

Examinateuse : Mme. KHELALFA KH. (Maître de Conférences A à l'UFM Constantine).

**Année universitaire
2024 – 2025**

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 S. 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.

Nos remerciements vont également aux membres du jury, Mr. KHEDARA A. et Mme. KHELALFA KH. pour avoir accepté d'évaluer ce modeste travail et pour l'intérêt qu'elles lui ont accordé.

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.

Un grand merci à nos familles, et en particulier à nos parents, pour leur amour, leur soutien, leur encouragement et leur patience.

Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont apporté leur aide ou leur soutien à ce travail.

À vous tous, je vous dis merci.

Dédicaces

À moi-même, pour la persévérance, la patience et les efforts déployés tout au long de ce parcours.

À ma chère mère, symbole de sacrifice et de générosité.

À mon cher père, mon premier soutien et ma source de force.

À mes sœurs chéries Asma, Djihad, hana et Lina À mes frères ZineEddine et Abdeldjalil, pour leurs soutien et encouragements constants et leur appui indéfectible.

À mes nièces Djinine, Djihan, Ghizlane et Sydra, et à mes neveux Bahaa, Djaouad et Roustem, dont la joie de vivre et l'énergie m'inspirent chaque jour.

À mes chers amis, pour leur sincérité et leur fidélité.

Et à mon binôme Roumeissa, pour son soutien constant, sa douceur et sa présence inestimable.

À vous tous, je dédie ce travail avec tout mon amour et ma profonde gratitude.

Meriem

Dédicaces

À moi-même, pour la persévérance, le courage et les efforts consentis tout au long de ce parcours.

À ma chère mère,

À mon cher père,

À toute ma famille et à mes amis,

À tous ceux qui me sont très chers,

Je dédie ce travail.

Roumeissa

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Recherche bibliographique

Chapitre 1 : Le lait

1. Le lait.....	5
1.1. Définition générale.....	5
1.2 Composition	5
1.2.1 L'eau.....	6
1.2.2 Le lactose.....	6
1.2.3 La matière grasse.....	6
1.2.4 L'azote non protéique (ANP).....	7
1.2.5 Matière minérale et saline.....	7
1.2.6 Les vitamines.....	8
1.2.7 Les protéines.....	8
1.2.7.1 Les protéines du lactosérum.....	8
2. Caséines du lait.....	9
2.1 Définition générale	9
2.2 Différentes fractions caséiques.....	10
2.3 Structure des micelles.....	11
2.4 Facteurs de stabilité de la micelle.....	13

Chapitre 2 : Coagulation du lait

1. Coagulation du lait.....	15
1.1 Types de coagulation.....	15

1.1.1 La coagulation enzymatique du lait.....	15
1.1.1.1 Hydrolyse enzymatique de la caséine κ	16
1.1.1.2 Agrégation des micelles déstabilisées.....	17
1.1.1.3 Réticulation du gel.....	17
1.1.2 La coagulation acide du lait.....	18
1.1.3 Coagulation mixte.....	20
2. Facteurs influant la coagulation du lait.....	20
2.1 Effet de la température.....	20
2.2 Effet du pH du lait.....	21
2.3 Effet de la teneur en ions calcium (CaCl ₂).....	21
2.4 Concentration en enzyme.....	21
2.5 Influence de la concentration en caséines	21

Chapitre 3 : Les Enzymes coagulantes

1. Enzymes coagulantes en technologie fromagère.....	24
1.1 Protéases d'origine animale.....	24
1.1.1 Présure.....	24
1.1.2 Pepsine.....	24
1.1.2.1 Généralité sur la pepsine.....	24
1.1.2.2 Caractéristiques de la pepsine aviaire.....	25
1.1.2.3 Applications de la pepsine	27
1.2 Protéases d'origine végétale.....	27
1.2.1 Cardosine.....	28
1.2.1.1 Étude botanique de la plante.....	28
1.2.1.2 Caractéristique des cardosines.....	30
1.2.1.3 Utilisation de la cardosine.....	32
1.2.2 Ficine.....	33
1.2.2.1 Description de la plante de figuier.....	33

1.2.2.2 Localisation et caractérisation de la ficine.....	34
---	----

1.2.2.3 Utilisation de la ficine.....	36
---------------------------------------	----

Matériel et Méthodes

1. Le lait.....	38
1.1 Caractérisation du lait.....	38
1.1.1 Détermination du pH et de l'acidité.....	38
2. Extraction des enzymes.....	39
2.1 la pepsine.....	39
2.1.1 Préparation des proventricules.....	39
2.1.2 Extraction enzymatique.....	39
2.1.3 Diagramme d'extraction.....	42
2.2 La ficine	43
2.2.1 Récupération du latex.....	43
2.2.2 Extraction de la ficine.....	43
2.3 La cardosine.....	44
2.3.1 Récolte et préparation.....	44
2.3.2 Extraction du système enzymatique	45
3. Caractérisation des extrait enzymatiques.....	46
3.1 Mesure du temps de flocculation.....	46
3.2 Evaluation de l'activité coagulante.....	47
3.3 Dosage des protéines totales.....	48
3.4 Détermination de l'activité protéolytique.....	48
3.5 Confirmation des conditions optimales de coagulation.....	49

Résultats et discussion

1.Caractérisation physico-chimique du lait.....	52
1.1 pH.....	52
1.2 Acidité Dornic.....	52

2. Extraction des enzymes.....	52
2.1 Rendement de l'extraction.....	52
2.1.1 Pepsine.....	52
2.1.2 Ficine.....	53
2.1.3 Cardosine.....	53
2.2 Caractérisation des extraits enzymatiques.....	53
2.2.1 Détermination de l'activité coagulante.....	54
2.2.2 Détermination de la force coagulante.....	56
2.2.3. Dosage des protéines des extraits enzymatiques.....	57
2.2.4. Mesure de l'activité protéolytique.....	58
2.2.5. Mesure de l'activité spécifique.....	60
2.2.6 Détermination des conditions optimales de coagulation.....	61
2.2.6.1 Influence de la température.....	62
2.2.6.2 Influence du pH.....	67
2.2.6.3 Influence de la concentration en CaCl ₂	72
Conclusion.....	79
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

AC : Activité coagulante

ADN : Acide Désoxyribonucléique

A : Akène

APs : Aspartyl-protéases

ARN : Acide Ribonucléique

β : Bêta

C : Degré Celsius

Ca²⁺ : Calcium ionisé

CaCl₂ : Chlorure de calcium

Cm : centimètre

CMP : Caséinomaclopeptide

CN-κ : caséine kappa

CO₂ : Dioxyde de carbone

Cys : Cystéine

Da, kDa : Dalton, kilo Dalton

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

F : Force coagulante

Fe³⁺ : Fer trivalent

F.I.L : Fédération Internationale de la Laiterie

γ : Gamma

g : gramme

HCl : Chlorure d'hydrogène

His : Histidine

Ig : Immunoglobuline

κ : Kappa

κ-CN : Kappa caséine

L : Litre

Leu : Leucine

N : Normalité

NaCl : Chlorure de sodium

NaHCO₃ : Sodium hydrogène carbonate

NaOH : Hydroxyde de sodium

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

N₂ : Diazote

O₂ : Dioxygène

p/v : Poids par volume

Phe : Phénylalanine

pHi : point isoélectrique

Pt : Pétales

R (%) : Rendement exprimé en pourcentage

SAB : Sérumalbumine bovine

TCA : Acide trichloracétique

Tf : Tube floral

Trp : Tryptophane

Tyr : Tyrosine

UAC : Unité d'Activité Coagulante

UP : Unité de Présure

Val : Valine

XVI^e s : Seizième siècle

α : Alpha

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un globule de matière grasse.....	7
Figure 2 : Micelle de caséine vue au microscope.....	10
Figure 3 : Représentation schématique de la structure interne d'une micelle de caséine.....	12
Figure 4 : Schématisation de la structure et de la stabilité des micelles de caséines.....	12
Figure 5 : Coagulation du lait en fromagerie.....	15
Figure 6 : Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation du lait par la présure.....	16
Figure 7 : Hydrolyse de la caséine κ par la présure.....	17
Figure 8 : Phases de coagulation enzymatique du lait.....	18
Figure 9 : Schéma du mécanisme de coagulation lactique par acidification du lait.....	19
Figure 10 : Changement de la structure de micelle de caséine durant l'acidification.....	19
Figure 11 : Formation du gel lactique.....	20
Figure 12 : (a) Appareil digestif du poulet ; (b) Complexe stomacal du poulet.....	26
Figure 13 : Représentation de l'inflorescence et de la structure florale de <i>Cynara cardunculus</i> L 1 : Capitule floral. 2 : Fleur avec ses différentes structures. 3 : Schéma du pistil.....	29
Figure 14 : Les différents stades de Florescence de <i>Cynara cardunculus</i> L.....	29
Figure 15 : Les conditions climatiques et les caractéristiques du sol favorables pour le développement des variétés <i>Cynara cardunculus</i> L.....	30
Figure 16 : Localisation tissulaire des cardosines A et B dans les fleurs d <i>Cynara</i> <i>cardunculus</i> , A : Coupe transversale du stigma, pe : papilles dermiques, sc : sclérenchyme, vb : faisceau vasculaire, tt : tissu transmetteur. B : Localisation de la cardosine A par immunofluorescence. C : Localisation de la cardosine B dans le tissu.....	31
Figure 17 : Activation protéolytique des cardosines A et B à partir de leurs précurseurs....	32

Figure 18 : Représentations morphologiques du figuier (<i>Ficus carica L.</i>), Arbre (A) et fruit (B), Latex (C) et feuilles (D).....	34
Figure 19 : Mesure du pH du lait par le pH mètre.....	38
Figure 20 : Proventricule de poulet : avant incision (A) et après incision : face intérieure (B) face extérieure (C).....	39
Figure 21 : Hachage et macération sous agitation.....	40
Figure 22 : l'activation du pepsinogène.....	40
Figure 23 : Centrifugation de pepsinogène, A : avant la centrifugation, B : après la centrifugation, C : Le surnageant clarifier.....	41
Figure 24 : Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet.....	42
Figure 25 : Extraction du latex à l'aide d'une seringue sur le tronc d'un figuier.....	43
Figure 26 : Phases du latex de figuier après centrifugation.....	44
Figure 27 : La fleurs de cardon (<i>Cynara cardunculus</i>).....	45
Figure 28 : Protocole d'obtention de l'extrait brut des fleurs du cardon.....	46
Figure 29 : Activité coagulante (en unités présure, UP) des différentes enzymes testées sur lait reconstitué.....	55
Figure 30 : Force de coagulation (US) des différentes enzymes étudiées.....	57
Figure 31 : Teneur en protéines (mg/ml) des extraits enzymatiques étudiés.....	58
Figure 32 : Activité protéolytique ($\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$) des différents extraits enzymatiques.....	59
Figure 33 : Activité spécifique (UP/mg) des différentes enzymes coagulantes testées.....	61
Figure 34 : Effet de la variation de la température sur la flocculation du lait par la pepsine....	62
Figure 35 : Effet de la variation de la température sur la flocculation du lait par la ficine.....	64
Figure 36 : Effet de la variation de la température sur la flocculation du lait par la cardosine	65
Figure 37 : Effet de la variation de la température sur la flocculation du lait par la présure.	66
Figure 38 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de la pepsine, ficine, cardosine, présure.....	67

Figure 39 : Effet de la variation du pH sur la flocculation du lait par la pepsine.....	68
Figure 40 : Effet de la variation du pH sur la flocculation du lait par la ficine.....	69
Figure 41 : Effet de la variation du pH sur la flocculation du lait par la cardosine.....	70
Figure 42 : Effet de la variation du pH sur la flocculation du lait par la présure.....	71
Figure 43 : Influence de la variation du pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine, ficine, cardosine, présure.....	72
Figure 44 : Effet de la concentration en CaCl_2 sur le temps de flocculation du lait par la pepsine.....	73
Figure 45 : Effet de la concentration en CaCl_2 sur le temps de flocculation du lait par la ficine.....	74
Figure 46 : Effet de la concentration en CaCl_2 sur le temps de flocculation du lait par la cardosine.....	76
Figure 47 : Effet de la concentration en CaCl_2 sur le temps de flocculation du lait par la présure.....	77
Figure 48 : Influence de la variation de concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante de la pepsine, ficine, cardosine, présure	78
Figure 49 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine.	
Figure 50 : Courbe d'étalonnage de la BSA	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition moyenne en g/l des laits de différentes espèces animales.....	6
Tableau 2 : Concentration moyenne des minéraux essentiels du lait en g/L	8
Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques du substrat selon Berridge.....	52
Tableau 4 : Principales caractéristiques des enzymes extraites.....	54
Tableau 5 : Dilutions optimales des enzymes pour un temps de flocculation ciblé entre 5 et 6 minutes.....	62

Introduction

Le lait occupe une place centrale dans l'alimentation humaine grâce à ses exceptionnelles propriétés nutritionnelles. Il constitue une source vitale durant la petite enfance et conserve une importance majeure à tous les stades de la vie. Toutefois, sa nature instable sur les plans biologique et physico-chimique le rend particulièrement vulnérable à l'altération, limitant ainsi sa conservation à l'état frais. Cette fragilité a conduit au développement des premières techniques de transformation du lait, notamment la fabrication du fromage, afin d'assurer sa conservation et d'élargir ses possibilités d'utilisation.

Aujourd'hui, d'après la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), environ 40 % du lait produit à l'échelle mondiale est transformé en fromage. Alors que cette transformation visait initialement à préserver les nutriments essentiels du lait, le fromage est désormais reconnu comme un produit alimentaire à haute valeur ajoutée, doté de qualités nutritionnelles et sensorielles indiscutables (**Fredot, 2005**).

La coagulation du lait constitue une étape déterminante dans le processus de fabrication fromagère, conditionnant à la fois la structure du caillé et les propriétés finales du produit. Ce phénomène repose sur des modifications physico-chimiques affectant les micelles de caséines, et dépend étroitement de la nature de l'agent coagulant utilisé, ainsi que du type de fromage visé (**Muehlhoff, Bennett *et al.*, 2013 ; Dahou *et al.*, 2021**).

Concernant les agents coagulants, Jusqu'aux années 1950, la présure d'origine animale était largement prédominante dans l'industrie fromagère. Cependant, la pénurie mondiale de cette enzyme survenue au cours des décennies suivantes, couplée à une augmentation constante de la demande fromagère, a entraîné des fluctuations de prix importantes et stimulé la recherche de coagulants alternatifs, plus accessibles et durables.

C'est dans cette perspective qu'un intérêt croissant s'est développé pour diverses protéases issues de sources végétales, microbiennes ou animales. Les protéases d'origine végétale qui sont très anciennement utilisées dans la préparation de fromages traditionnels, telles que celles provenant de l'artichaut, du chardon et de latex du figuier (**Siar, 2014**).

A côté des succédanés de présure, d'origine végétale et microbienne, existent ceux d'origine animale. Les enzymes sécrétées par l'estomac des mammifères sont celles qui sont intéressantes pour la fromagerie. Dans cet intervalle sont incluses les pepsines de différentes espèces animales, principalement bovine, ovine, caprine, porcine, aviaire et maritime (**Alais, 1984**).

Parmi les alternatives les plus prometteuses figurent la pepsine aviaire, extraite des proventricules de volaille, la ficine, provenant du latex de figuier (*Ficus carica*) Elle appartient à la famille des protéases à cystéine (**Azarkan et al., 2011 ; Zare et al., 2013**) 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. La cardosine, dérivée des fleurs de chardon (*Cynara cardunculus*).

Malgré la disponibilité de ressources enzymatiques potentielles en Algérie, notamment issues des abats de volaille ou de plantes autochtones, la filière fromagère nationale reste fortement dépendante des importations. En 2011, le marché algérien a commercialisé près de 25 000 tonnes de fromages, nécessitant l'usage d'environ 1,5 tonne de présure ou de ses substituts, selon les données de l'Office National des Statistiques (O.N.S) (**Siar, 2014**).

Cette dépendance, associée à un coût d'importation dépassant les 102 millions de dollars, soulève des enjeux majeurs de souveraineté alimentaire. Dans ce contexte, la présente étude vise à explorer et à valoriser des sources locales de coagulants enzymatiques, telles que la pepsine de volaille, la cardosine et la ficine, dans le but de renforcer la compétitivité et la durabilité de l'industrie fromagère algérienne (**Siar, 2014**).

L'objectif du présent travail est de faire 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, la cardosine extraite des fleurs de cardone et la présure, pour Déterminer l'effet des extraits enzymatiques brut sur la coagulation du lait et comparer ses résultats

Le travail est structuré en trois parties :

Une première partie inclus une étude bibliographique.

Une seconde partie expérimentale décrivant le matériel utilisé, les méthodes d'extraction et d'évaluation enzymatique, ainsi que les analyses réalisées sur la caractérisation des extraits

Une troisième et dernière partie est destinée aux résultats et à la discussion.

Recherche bibliographique

Chapitre 1 : Le lait

1. Le lait

1.1 Définition générale

Le lait est un liquide biologique sécrété par les glandes mammaires des femelles mammifères telles que la vache, la chèvre ou la brebis, et il est destiné à l'alimentation du jeune nouveau-né (**Jeantet et al., 2008** ; **Vignola, 2010**). Il constitue ainsi la source exclusive de nutrition chez les mammifères au début de la vie (**Debry, 2001**).

D'un point de vue physique, le lait se présente comme un fluide aqueux, opaque, de couleur blanche à légèrement jaunâtre, en fonction de la teneur en β -carotène, et parfois légèrement bleuté. Il possède une saveur douceâtre et un pH légèrement acide, compris entre 6,6 et 6,8, proche de la neutralité (**Mathieu, 1997** ; **Alais, 1984** ; **Vignola, 2002**). Le lait est généralement considéré comme une émulsion de matière grasse dispersée dans une phase aqueuse (**Alais, 1984**).

D'un point de vue légal, il a été défini en 1908 lors du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée, recueilli proprement et ne contenant pas de colostrum » (**Luquet, 1985**). Cette définition a été reprise et complétée par la Fédération Internationale de la Laiterie (F.I.L.), qui le décrit comme : « le produit de sécrétion mammaire normale, obtenu par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction » (**Levieux, 1999**).

Enfin, bien qu'il existe autant de laits différents que de mammifères, le terme lait sans qualificatif renvoie par convention au lait de vache (**Fredot, 2005**).

1.2 Composition

La composition du lait est soumise à de nombreux facteurs tels que l'espèce et la race de l'animal, le stade de lactation, la saison, l'état sanitaire ainsi que l'alimentation (**Mahaut et al., 2000**).

Le lait se présente comme un système complexe constitué de quatre phases principales :

- Phase grasse : une émulsion de globules lipidiques contenant des vitamines liposolubles (A et D).
- Phase colloïdale : suspension de caséines sous forme de micelles.
- Phase aqueuse : solution contenant les protéines solubles, le lactose, des vitamines hydrosolubles (B et C), des sels minéraux et de l'azote non protéique.

- Phase gazeuse : composée d'oxygène (O₂), d'azote (N₂) et de dioxyde de carbone (CO₂), représentant environ 5 % du volume total du lait.

Ces différentes phases sont maintenues en suspension les unes dans les autres. Toutefois, certains facteurs comme l'abaissement du pH ou l'ajout de présure peuvent rompre cet équilibre, provoquant la coagulation de la phase colloïdale. Ce phénomène est exploité dans la fabrication des produits laitiers (**Fredot, 2005**).

Tableau 1 : Composition moyenne en g/l des laits de différentes espèces **animales** (**Alais, 1984 ; Luquet, 1985 ; Belitz et Grosch, 1987**).

Le lait	Protéines totales	Caséine	Lactose	Matière grasse	Minéraux totaux
Vache	32	28	40-60	39	9
Brebis	55	45	47	71,9	9
Chèvre	28	23	44-47	33,8	5-8
Chamelle	30	28	33	53,8	7

1.2.1 L'eau

L'eau représente le constituant principal du lait, représentant environ 87 à 88 % de son poids (**Vignola, 2002**). Elle existe sous deux formes : libre (96 %), servant de solvant pour les composés hydrophiles tels que le lactose, les minéraux, les protéines solubles et certaines vitamines, et liée (4 %), qui participe à la structure des micelles de caséines (**Luquet, 1985**).

1.2.2 Le lactose

Le lactose constitue pratiquement la totalité des glucides présents dans le lait (**Fredot, 2005**). Il représente environ 4,8 % du lait, soit près de 40 % de la matière sèche totale (**Veisseyre, 1975**). On trouve également de petites quantités de glucose et de galactose, produits de l'hydrolyse du lactose (**Vignola, 2002**). Le lactose joue un rôle majeur en raison de sa fermentescibilité, essentielle dans la production de nombreux produits laitiers (**Mahaut et al., 2000**).

1.2.3 La matière grasse

La matière grasse est présente sous forme de globules lipidiques en émulsion (**Mahaut et al., 2000**). Leur diamètre varie entre 0,1 et 22 µm (**Scott, 1981**). À pH 6,7, l'enveloppe des

globules possède une charge électrique négative, ce qui empêche leur agrégation (**Mathieu, 1998**).

La matière grasse se compose principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable riche en cholestérol (**Vignola, 2002**). Les globules gras (Figure 1) contiennent au centre des triglycérides liquides à bas point de fusion, entourés de triglycérides solides à point de fusion plus élevé. La membrane externe est formée de phospholipides (qui jouent un rôle d'émulsifiants) et de lipoprotéines (**Keenan et Patton, 1995**).

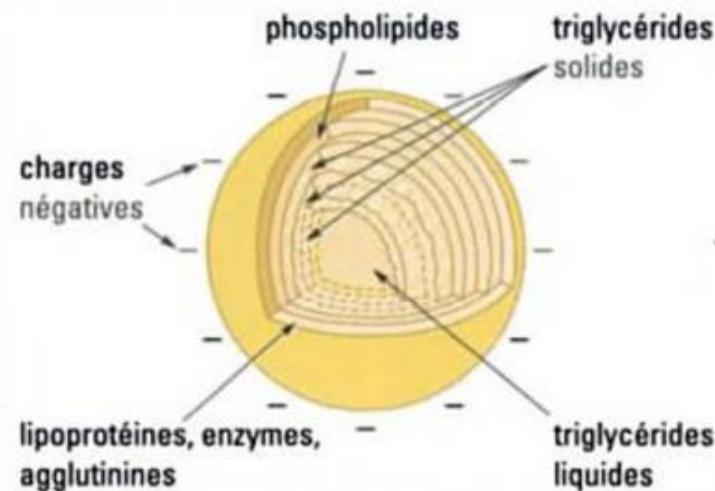


Figure 1 : Structure d'un globule de matière grasse (**Vignola, 2002**).

1.2.4 L'azote non protéique (ANP)

L'azote non protéique (ANP) comprend toutes les molécules contenant de l'azote autres que les protéines (**Ribadeau-Dumas, 1981**). Ce sont généralement des substances de faible poids moléculaire (Alais, 1984) qui ne précipitent pas lors de l'acidification, de l'élévation de température ou de l'ajout de présure. Leur concentration varie de 1,5 à 16 g/L dans le lait de vache (**Veisseyre, 1975**). L'urée représente la majeure partie de l'ANP, soit 33 à 79 % (**Ribadeau-Dumas, 1981**).

1.2.5 Matière minérale et saline

Le lait constitue une source importante de minéraux essentiels, tels que :

Le calcium, le potassium, le phosphore, le sodium, le magnésium et le chlore

Tableau 2 : Concentration moyenne des minéraux essentiels du lait en g/L

Minéral	Calcium	Potassium	Chlore	Phosphore	Sodium	Magnésium
Concentration (g/L)	1,25	1,5	1,2	0,95	0,5	0,13

Ces minéraux sont partiellement dissous et partiellement associés aux micelles de caséines. La fraction colloïdale représente 65 % du calcium, 50 % du phosphore et 60 % du magnésium (**Mahaut *et al.*, 2000**). L'équilibre entre les formes dissoutes et colloïdales dépend de la température et du pH (**Scott, 1981**). Le lait contient également des oligoéléments tels que le zinc (3,5 mg/L), l'iode (20 à 100 µg/L) et le cuivre (20 à 50 µg/L) (**Mahaut *et al.*, 2000**).

1.2.6 Les vitamines

Le lait contient à la fois des vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) et des vitamines liposolubles (A, D, E, K) (**Fredot, 2005**). Toutefois, il ne couvre pas l'ensemble des besoins vitaminiques quotidiens. C'est pourquoi certains laits commerciaux sont enrichis en vitamines essentielles, notamment A, B1 et B2, contribuant à sa valeur nutritionnelle (**Jeantet *et al.*, 2008**).

1.2.7 Les protéines

Le lait renferme en moyenne 3,5 % de protéines, une teneur susceptible de varier selon l'alimentation de l'animal, la saison et le stade de lactation (**Fredot, 2005**). Ces protéines se répartissent en deux grandes familles : les caséines, qui sont insolubles et forment des micelles en suspension colloïdale, et les protéines du lactosérum, solubles et précipitant sous l'effet de la chaleur (**Vignola, 2002**).

1.2.7.1 Les protéines du lactosérum

Les protéines sériques représentent 15 à 28 % des protéines totales du lait de vache et 17 % des matières azotées. Elles restent solubles à pH 4,6 (**Vignola, 2002**).

- **β-lactoglobuline** : principale protéine sérique (55 %), avec un point isoélectrique de 5,1 et un poids moléculaire de 18,3 kDa. Elle possède une poche

hydrophobe capable de fixer la vitamine A et certains acides gras (Debry, 2001 ; Vignola, 2002).

- **α -lactalbumine** : métalloprotéine représentant 22 % des protéines sériques. Son point isoélectrique est de 4,8 et son poids moléculaire de 14,1 kDa. Elle participe à la biosynthèse du lactose (Cayot et Lorient, 1998 ; Vignola, 2002).
- **Immunoglobulines** : environ 13 % des protéines sériques, réparties en cinq catégories (IgG1, IgG2, IgA, IgM, IgE), avec des points isoélectriques variant de 5,5 à 8,3 (Cayot et Lorient, 1998 ; Vignola, 2002).
- **Sérumalbumine bovine (SAB)** : représentant 7 % des protéines sériques, avec un poids moléculaire de 66 kDa et contenant 35 résidus de cystéine (Brule, 1996).
- **Lactoferrine** : représentant 4 % des protéines sériques, cette protéine fixe le fer sous forme d'ions ferriques (Fe^{3+}), avec un point isoélectrique compris entre 8,4 et 9 (Vignola, 2002).

2. Caséines du lait

2.1 Définition générale

Les caséines sont les principales protéines du lait, représentant environ 80 % des protéines totales (Brule *et al.*, 1997 ; Jeant *et al.*, 2008) (figure2). Elles se composent de quatre types majeurs : α s1, α s2, β et κ , présents respectivement à 33 %, 11 %, 33 % et 11 % (Dalgleish et Corredig, 2012). Ce sont des phosphoprotéines acides de 150 à 200 acides aminés qui précipitent à pH 4,6 (Vignola, 2002). Leur point isoélectrique est de 4,65 et elles s'organisent sous forme de micelles sphériques (Vignola, 2002). Elles se caractérisent par la présence de groupements phosphoséryles, une richesse en glutamate, leucine et proline, une hydrophobicité marquée, et une faible teneur en cystéine (Mahaut *et al.*, 2003 ; Huppertz *et al.*, 2006). On note également la présence d'une caséine γ , issue de l'hydrolyse de la caséine β (Vignola, 2002).

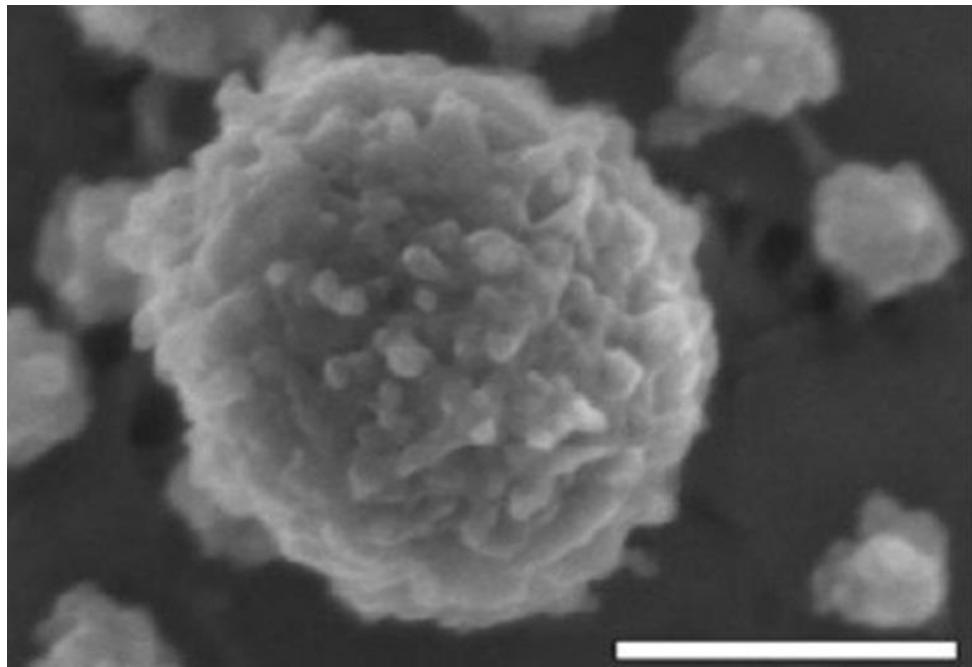


Figure 2 : Micelle de caséine vue au microscope (Hristov et al., 2015).

Les caséines constituent environ 80 % des protéines du lait (brule *et al.*, 1997 ; jeant *et al.*, 2008) et se répartissent en quatre types principaux : α s1, α s2, β et κ , dans les proportions de 33 %, 11 %, 33 % et 11 % respectivement (Dalglish et Corredig, 2012). Ce sont des phosphoprotéines de nature acide, précipitant autour de pH 4,6 (vignola, 2002). Elles contiennent des groupements phosphoséryles, sont riches en glutamate, leucine et proline, et pauvres en cystéine (mahuaut *et al.*, 2003 ; huppertz *et al.*, 2006). Leur organisation en micelles s'explique par leur point isoélectrique proche de 4,65 et leur caractère hydrophobe (vignola, 2002).

2.2 Différentes fractions caséiques

Les caséines sont classées en quatre grandes familles : α s1, α s2, β et κ , auxquelles s'ajoute une fraction γ dérivée de la dégradation enzymatique de la caséine β . Ces différentes fractions se distinguent par leur structure primaire, leur composition en acides aminés, leur affinité pour les ions calcium, ainsi que leur localisation au sein de la micelle.

- **La caséine α s1** est la fraction la plus abondante, représentant environ 35 à 40 % des caséines totales (Vignola, 2002). Sa structure primaire compte 199 acides aminés et son poids moléculaire est d'environ 23 600 Da. Elle est riche en groupements phosphoséryls (8 à 9), ce qui lui confère une forte sensibilité au calcium (Fox, 1989).
- **La caséine α s2** représente environ 10 à 11 % des caséines. Elle contient 207 acides aminés avec une forte teneur en groupements phosphorylés (10 à 13). Elle est

hydrophile du fait de sa richesse en groupements cationiques et peut exister sous forme dimérique, stabilisée par des ponts disulfures.

- **La caséine β** représente 25 à 35 % des caséines, constituée de 209 acides aminés avec un poids moléculaire de 24 000 Da (**fox, 1989**). Riche en proline, elle adopte une structure ouverte et flexible, localisée au centre des micelles (**vignola, 2002**).
- **La caséine κ** constitue 11 à 12 % des caséines totales. Composée de 169 acides aminés, elle contient 1 à 2 groupements phosphoséryls et 2 résidus de cystéine lui permettant de former des ponts disulfure (**cayot et lorient, 1998**). Elle est indispensable à la stabilité micellaire, avec une portion hydrophile (glycomacropeptide) libérée lors de la coagulation enzymatique.
- **La caséine γ** est un produit de l'hydrolyse de la β -caséine par la plasmine. Elle est représentée par trois fragments ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) et contribue à la périphérie des micelles (**swaisgood, 1982**).

2.3 Structure des micelles

La micelle de caséine est une particule sphérique dont le diamètre moyen varie entre 100 et 500 nm, avec une moyenne autour de 180 nm (**Amiot et al., 2002** ; **Lenoir et al., 1997** ; **Debry, 2001**). Elle est constituée de sous-unités appelées submicelles, de taille comprise entre 8 et 20 nm (**Debry, 2001** ; **Lenoir et al., 1997**), pouvant contenir environ 10 molécules des quatre caséines majeures ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β et κ) en proportions variables (**Cayot et Lorient, 1998**).

Les submicelles sont reliées entre elles par des ponts phosphocalciques, principalement formés entre les groupements phosphates et les ions calcium, avec une contribution secondaire du magnésium et du citrate (**De Kruif et al., 2012** ; **Cayot et Lorient, 1998** ; **Mahaut et al., 2000**), les submicelles riches en caséine κ , de nature hydrophile, sont localisées en périphérie de la micelle, tandis que celles pauvres en κ sont situées au centre (**Brule et al., 1997** ; **Dalgleish, 1998** ; **Dalgleish, 2007**). Cette répartition confère à la micelle sa stabilité colloïdale, les chaînes flexibles des caséines κ , situées en surface, jouant un rôle protecteur contre l'agrégation (**Cayot et Lorient, 1998**). La teneur en caséine κ influence également la taille des micelles : une plus forte proportion de cette caséine tend à limiter leur croissance, ce qui explique pourquoi les micelles les plus petites sont souvent les plus riches en κ -caséine (**Lovisi et al., 2003** ; **Dalgleish et Corredig, 2012**) (figure 3).

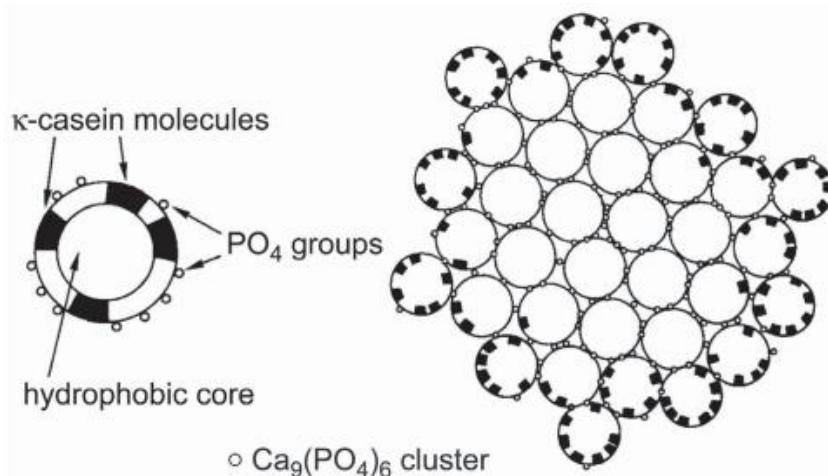


Figure 3 : Représentation schématique de la structure interne d'une micelle de caséine (Schmidt, 1982).

Selon **Dalgleish *et al.* (1989)**, la surface des micelles contient entre 39 et 47 % de κ -caséine, 0 à 10 % de β -caséine et 47 % de caséines α , tandis que l'intérieur est constitué à parts égales de caséines α et β (environ 47 % chacune) et seulement 1 % de κ -caséine. Les micelles sont fortement hydratées, retenant entre 2 et 4 g d'eau par gramme de protéine (**Debry, 2001** ; **Lenoir *et al.*, 1997**), et contiennent environ 7 % de leur extrait sec sous forme de minéraux colloïdaux, principalement du calcium, du phosphate, du magnésium et du citrate, localisés dans l'espace inter-submicellaire (**Debry, 2001**). Enfin, la stabilité des micelles est également assurée par les répulsions électrostatiques générées en surface, qui empêchent leur agrégation (**Mahaut *et al.*, 2000** ; **Mahaut *et al.*, 2003**) (figure 4).

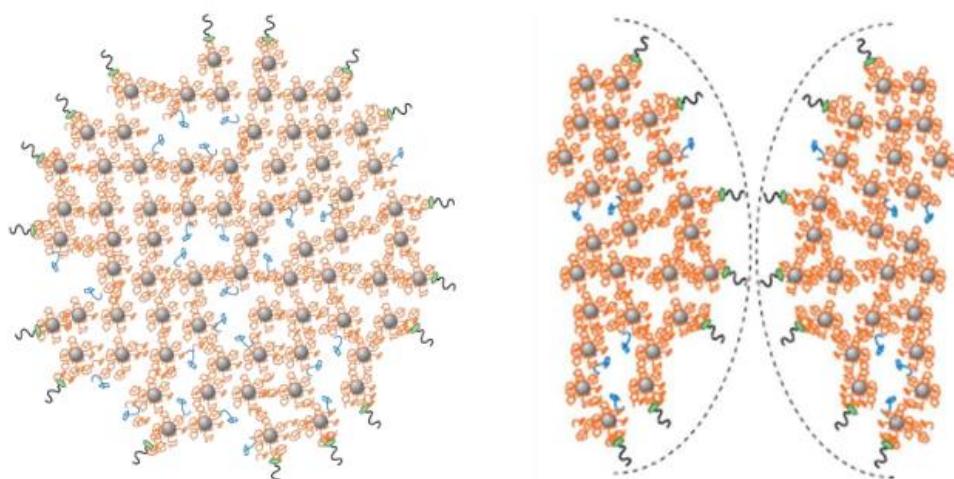


Figure 4 : Schématisation de la structure et de la stabilité des micelles de caséines (Dalgleish et Corrig, 2012).

2.4 Facteurs de stabilité de la micelle

Les micelles de caséines comptent tenu de leurs dimensions, présentent une grande stabilité. Elles supportent une longue conservation et des traitements thermiques ou mécaniques relativement sévères. Plusieurs facteurs contribuent à conférer aux micelles leur stabilité ; les principaux sont leur charge électrique et leur degré d'hydratation.

- La charge électrique des micelles du lait frais est fortement négative. Ce caractère résulte de la présence de nombreux groupements COO-, correspondant aux amino acides dicarboxyliques constituant en particulier la caséine κ. Ainsi, les répulsions électrostatiques s'opposent au rapprochement des micelles et à leur agrégation. Ces répulsions contribuent au maintien de la dispersion malgré la très forte densité de la population et la faible distance entre particules ;
- Le degré d'hydratation des micelles est élevé : 1 g de protéines fixe environ 2,5 g d'eau. Ce caractère très hydrophile de la micelle correspond à la présence à sa périphérie d'une couche d'eau liée, étroitement fixée aux protéines, et d'une couche d'eau d'hydratation à structure moléculaire plus lâche, et moins orientée.

Ces enveloppes d'eau contribuent à stabiliser fortement la micelle. Ces facteurs primaires de la stabilité des micelles dépendent eux-mêmes de divers paramètres. Les uns liés à la composition saline de la phase aqueuse (concentration en ions H+, Ca++, phosphate...etc.) ; les autres liés à la composition même des micelles (teneur en phosphate de calcium, proportion de la caséine κ) (Alais, 1984).

Chapitre 2 : La coagulation du lait

1. Coagulation du lait

La coagulation du lait constitue une transformation irréversible du lait liquide en un gel semi-solide appelé caillé (coagulum) (Cecchinato *et al.*, 2012). Ce phénomène repose sur des modifications physico-chimiques des micelles de caséines, déclenchées soit par des enzymes protéolytiques, soit par acidification lactique, soit par une combinaison des deux (Eck et Gillis, 1997 ; Farkye, 2004 ; Janhøj et Qvist, 2010). Les micelles de caséines, formées de sous-micelles de caséines α , β et κ , stabilisées par des ponts de phosphate de calcium, jouent un rôle central. La coagulation résulte de la déstabilisation de ces micelles et de leur agrégation. Ce processus est crucial, car il conditionne l'égouttage et les propriétés finales du fromage (Hsieh et Pan, 2012). L'aptitude du lait à coaguler dépend de sa richesse en caséines et de sa composition minérale (Alais, 1974 ; Lenoir et Schneid, 1997) (figure 5).



Figure 5 : Coagulation du lait en fromagerie

1.1 Types de coagulation

1.1.1 La coagulation enzymatique du lait

La coagulation enzymatique du lait est une opération technologique essentielle qui transforme le lait liquide en un gel semi-solide appelé caillé. Ce processus repose sur l'action d'enzymes protéolytiques spécifiques, principalement la présure, qui contient majoritairement la chymosine (Eck, 1990). Cette enzyme agit en hydrolysant la caséine κ , protéine clé qui assure la stabilité colloïdale des micelles de caséines (Dagleish et Corredig, 2012).

Ce mécanisme entraîne l'agrégation des micelles et la formation d'un réseau protéique qui piège le lactosérum. La coagulation enzymatique suit trois étapes : l'hydrolyse enzymatique, l'agrégation des micelles déstabilisées et la réticulation du gel (**Eck et Gillis, 1997** ; **Walstra et Jenness, 1984** ; **Lucey, 2002**) (figure 6).

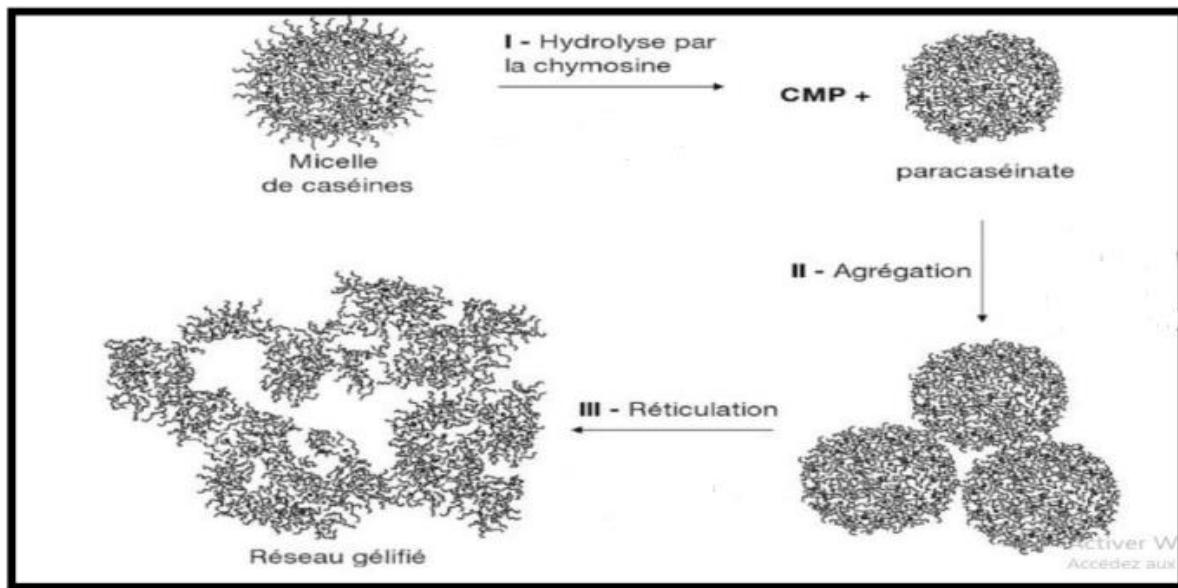


Figure 6 : Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation du lait par la présure (**Thomas et al., 2008**).

1.1.1.1 Hydrolyse enzymatique de la caséine κ (Phase primaire)

Au cours de la phase primaire, la chymosine hydrolyse spécifiquement la liaison peptidique entre la phénylalanine (105) et la méthionine (106) de la caséine κ (**Fox et al., 1994** ; **Tunick, 2008**). Cette coupure entraîne la libération du caséinomacropéptide (CMP) (résidus 106-169), qui passe dans le lactosérum (**Dalgleish, 1997**). Le fragment restant (résidus 1-105), appelé paracaséine κ, de nature hydrophobe, demeure intégré à la micelle (**Li et Dalgleish, 2006**) (figure 7).

La perte du CMP réduit la charge négative des micelles et leur degré d'hydratation, diminuant ainsi les forces de répulsion électrostatiques (**Alais, 1974** ; **Dalgleish, 1982, 1997**). Cette déstabilisation colloïdale rend les micelles capables de s'agrégner dès que 80 à 90 % de la caséine κ est hydrolysée (**Cheftel et al., 1985** ; **Lenoir et Veisseyere, 1987** ; **Mickael Eskin, 1990**). Selon **Berridge (1954)** et **Alais (1953)**, cette hydrolyse correspond à environ 60 % du temps de flocculation.

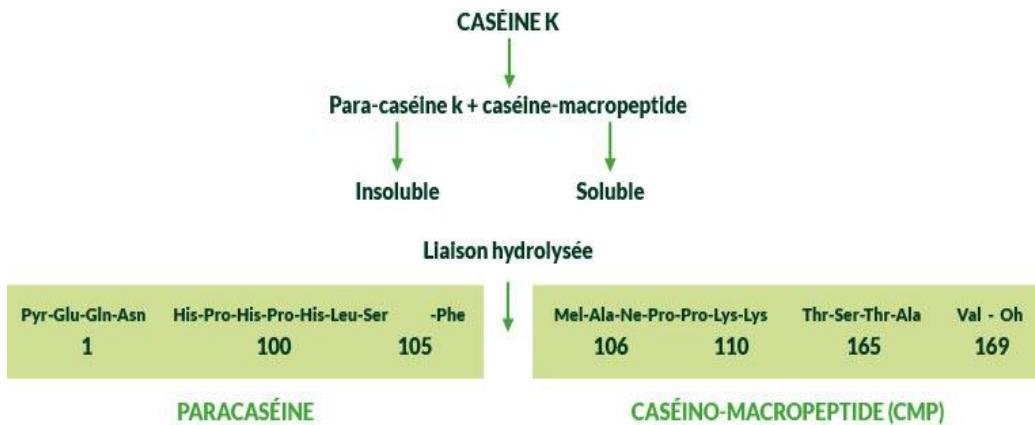


Figure 7 : Hydrolyse de la caséine κ par la présure (Fox *et al.*, 1994).

1.1.1.2 Agrégation des micelles déstabilisées (Phase secondaire)

Lorsque la majorité de la caséine κ est hydrolysée, les micelles déstabilisées commencent à s'agréger (Mahaut *et al.*, 2000 ; Lucey, 2002). La réduction des forces de répulsion électrostatiques permet aux micelles de se rapprocher (Fox et Mulvihill, 1990). Les interactions hydrophobes dominent en raison de la nature hydrophobe de la paracaséine κ (Jean, 2015). Simultanément, les ions calcium (Ca^{2+}) neutralisent les charges résiduelles et établissent des ponts calciques entre les micelles (Schmidt, 1982 ; Walstra et Jenness, 1984).

Les micelles s'assemblent en chaînes linéaires puis en amas, constituant un réseau tridimensionnel qui piège le lactosérum (Lenoir et Veisseyere, 1987 ; Lucey, 2003). Cette phase est influencée par le pH (optimal entre 6,3 et 6,6) et la température (31 à 40 °C). À des températures inférieures à 15 °C, aucune agrégation ne se produit, ce qui souligne l'importance des liaisons hydrophobes (Dalgleish, 1997 ; Lucey, 2003).

1.1.1.3 Réticulation du gel (Phase tertiaire)

La phase tertiaire correspond à la réticulation du gel. Les agrégats de micelles subissent des réorganisations structurales complexes. Des liaisons phosphocalciques et des ponts disulfures peuvent se former entre les para-caséines, renforçant la cohésion et la fermeté du gel (Vignola, 2002 ; Brulé *et al.*, 1997 ; Schmidt, 1982).

Selon **Lucey (2003)** et **Jean (2015)**, cette réticulation détermine la texture finale du gel. Elle permet aussi l'initiation de la synérèse, c'est-à-dire l'expulsion du lactosérum. Par ailleurs, la présure résiduelle peut continuer à hydrolyser d'autres caséines, notamment la

caséine α_1 , contribuant à l'affinage et au développement des caractéristiques sensorielles du fromage (Brulé *et al.*, 1997) (figure 8).

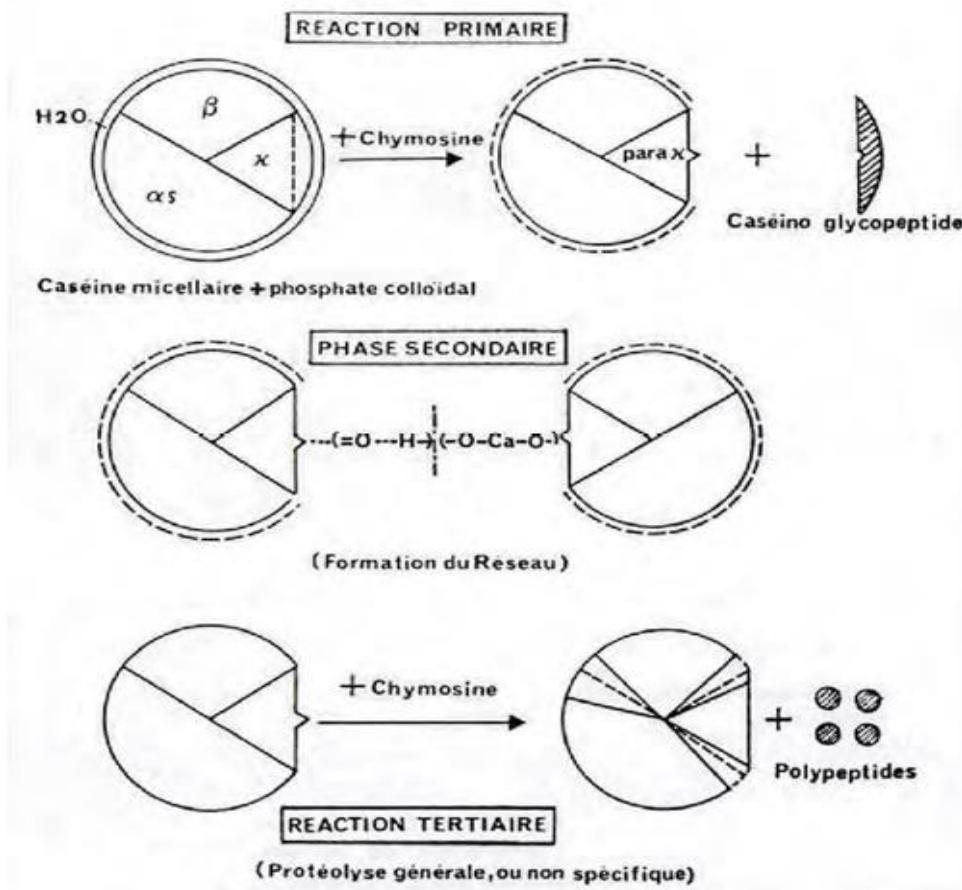


Figure 8 : Schéma des étapes de la coagulation enzymatique du lait par la présure (Alais, 1984).

1.1.2 La coagulation acide du lait

La coagulation acide du lait est un mécanisme fondamental dans la fabrication de produits laitiers fermentés tels que les yaourts, les fromages frais et certains fromages à pâte molle. Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ($pHi = 4,6$) par acidification biologique ou chimique. L'acidification biologique est réalisée à l'aide de bactéries lactiques, naturellement présentes dans le lait ou ajoutées sous forme de levains, qui transforment le lactose en acide lactique (Mahaut *et al.*, 2000) (figure 9).

L'acidification chimique peut être effectuée par injection de CO_2 ou addition de glucono- δ -lactone (Mahaut *et al.*, 2000). On peut aussi utiliser l'ajout de protéines sériques à pH acide pour provoquer la coagulation (Dagleish et Corredig, 2012).

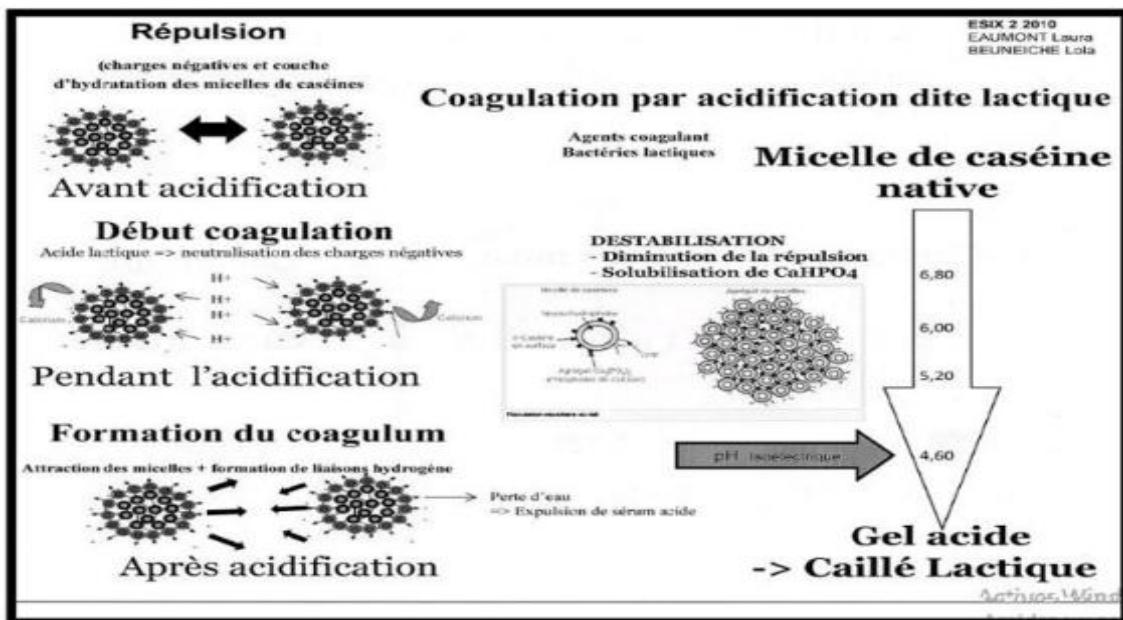


Figure 9 : Schéma du mécanisme de coagulation lactique par acidification du lait (Ronez, 2012).

Le processus de coagulation acide est consécutif à l'abaissement du pH, qui réduit l'ionisation des caséines. Cette diminution de charge entraîne la solubilisation du phosphate de calcium micellaire et conduit à la précipitation des caséines à leur point isoélectrique (Fredot, 2005). Lorsque le pH du lait passe de 6,7 à 5, la structure de la micelle de caséine change notablement : sa taille diminue et elle perd sa surface hétérogène, ce qui reflète une forte sensibilité de cette structure aux variations des constituants minéraux et à la charge de la caséine (Ouanezar *et al.*, 2012) (Figure 10).

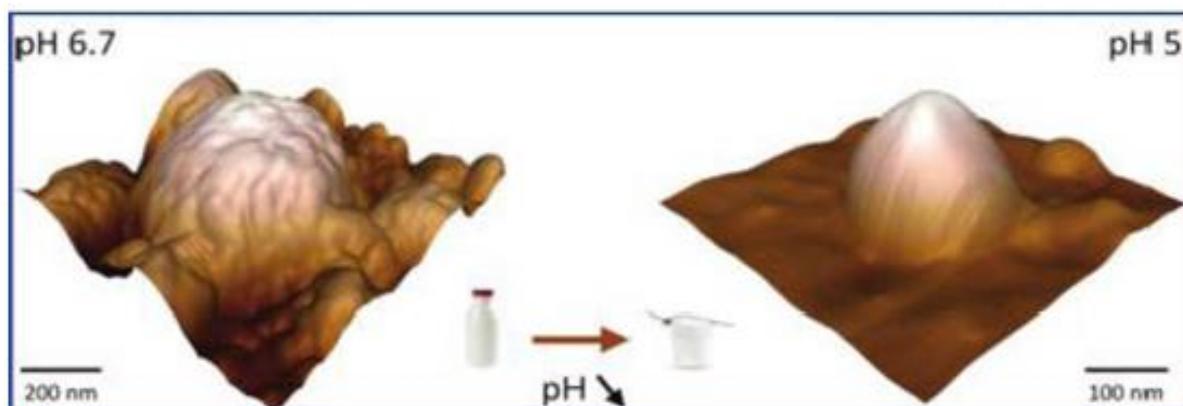


Figure 10 : Changement de la structure de micelle de caséine durant l'acidification (Ouanezar *et al.*, 2012).

Au pH 5,3, la micelle perd la majorité de ses ions calcium, phosphate et magnésium (Marchin *et al.*, 2007). À pH 5,2, tout le phosphate inorganique est éliminé et à pH 4,6, les ions calcium sont complètement perdus (Gaucheron *et al.*, 1997). Cette perte minérale contribue à la déstabilisation des micelles et favorise leur agrégation.

La coagulation acide aboutit à la formation d'un gel lorsque les micelles déstabilisées s'associent. Au point isoélectrique, les caséines dénaturées forment un réseau tridimensionnel. Ce gel lactique présente une perméabilité satisfaisante, mais une friabilité élevée. Son élasticité et sa plasticité sont pratiquement nulles, ce qui s'explique par le manque de structuration du réseau. Les liaisons formées sont de faible énergie, de type hydrophobe, et offrent peu de résistance aux traitements mécaniques (Lefebvre-Cases *et al.*, 1998 ; Mahaut *et al.*, 2000) (Figure 11).

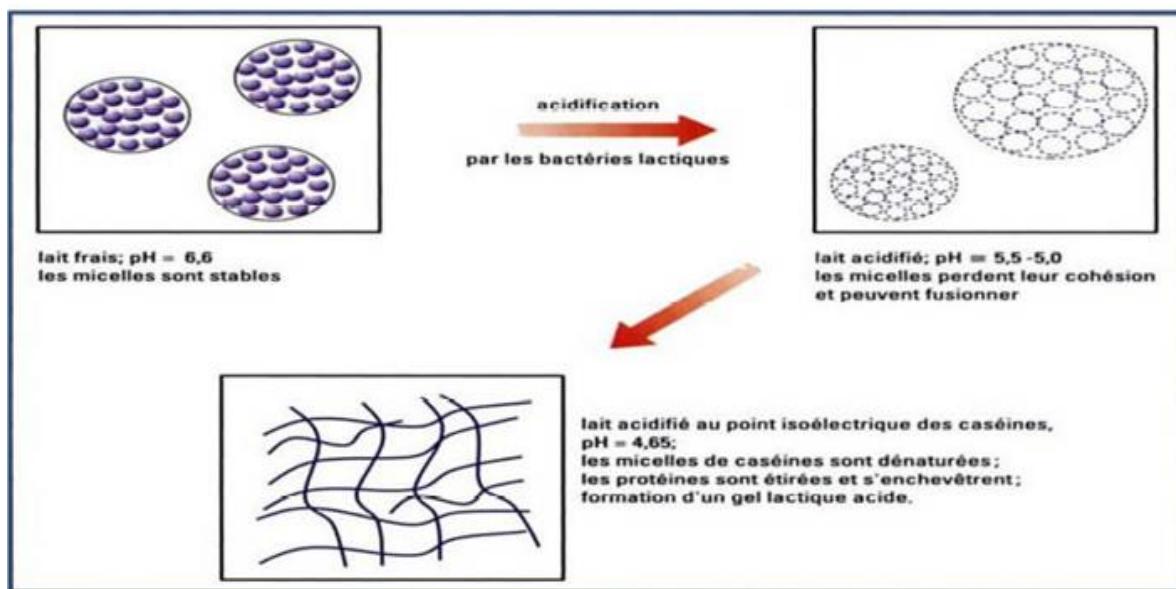


Figure 11 : Formation du gel lactique (Vignola, 2002).

1.1.3 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. Facteurs influant la coagulation du lait

2.1 La température

Selon **Mekhaneg, 2020** Le phénomène de coagulation est fortement dépendant de la température

- Au-dessous de 10°C, la coagulation du lait ne se produit pas.
- Dans l'intervalle 10 à 20° C, la vitesse de coagulation est lente.
- Au-dessus de 20°C, elle augmente progressivement jusqu'à 40 à 42°C, au-delà elle diminue.
- Au-dessus de 65°C, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme est inactive.

2.2 Le pH

L'abaissement du pH du lait entraîne un temps de coagulation plus court. Cela résulte d'une part d'un effet sur l'activité de l'enzyme, dont le pH optimal d'action sur la caséine k est de 5,5, d'autre part de la diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges et de la libération d'ions calcium à partir des complexes dissous et colloïdaux (**Mekhaneg, 2020**).

2.3 La teneur en ions calcium (CaCl2)

L'addition de CaCl2 entraîne une augmentation du calcium ionisé et du calcium colloïdal ayant pour conséquence une augmentation de la taille des micelles (plus la dimension de la micelle est grande, plus le temps de coagulation est court (**Mekhaneg, 2020**)).

2.4 La concentration en enzyme

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme, ce qui peut se formaliser selon l'équation suivante (**Mekhaneg, 2020**).

2.5 Influence de la concentration en caséines

La vitesse d'hydrolyse enzymatique est proportionnelle à la teneur en protéines. Ainsi, la vitesse d'agrégation et la fermeté des gels augmentent avec la teneur en caséines.

La coagulation enzymatique est influencée par le diamètre des micelles de caséine. En outre, plus le diamètre est grand, plus le temps de prise est long et plus le taux de raffermissement et la fermeté finale sont faibles (**St-Gelais et Tirard-Collet, 2002**). En fromagerie, la taille des petites micelles sont recherchées puisqu'elles sont associées à un temps de prise plus court et un taux de raffermissement plus rapide (**Park et al., 2007**). De plus, les micelles de petites tailles fusionnent plus étroitement entre elles et caractérisent la

forme dense et ferme du réseau protéique, en revanche de celle des micelles de grande taille (**Delacroix-Buchet *et al.*, 1993 ; Choisy *et al.*, 1997 ; Roupas et Mead, 2001**).

Chapitre 3 : Les enzymes coagulantes

1. Enzymes coagulantes en technologie fromagère

Les enzymes sont des catalyseurs biochimiques de nature protéique qui interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possibles, qu'elles accélèrent par activation spécifique dans des conditions précises de température et de pH (**Cuvellier, 1993**).

Ce sont des outils clés de la biotechnologie et de la bioindustrie. Un grand nombre d'enzymes protéolytiques, qui ont la faculté de coaguler le lait, sont soit d'origine animale (présure, pepsine) ; soit d'origine végétale (ficine, bromélaïne, enzymes extraites de l'artichaut, du chardon ...etc.) ; soit d'origine microbienne (enzyme de certaines moisissures ou bactéries) (**Mahaut *et al.*, 2000**).

1.1 Protéases d'origine animale (protéases gastriques)

Nombreuses sont les protéases d'origine animale, nous en citerons deux, impliquée dans notre étude.

1.1.1 Présure

La présure est une enzyme protéolytique, extraite de la quatrième poche de l'estomac (abomasum ou caillette) des jeunes ruminants nourris exclusivement au lait (avant sevrage) (**Eck et Gillis, 1997**). La présure de veau est l'agent coagulant traditionnellement utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages (**Alais, 1984** ; **Ramet, 1997**). Elle contient deux fractions actives, l'une majeure, constituée par la chymosine (80%) l'autre mineure, par la pepsine (10 –20%) (**Alais, 2003**).

1.1.2 Pepsine

1.1.2.1 Généralité sur la pepsine

La pepsine est une enzyme digestive majeure présente dans le suc gastrique de nombreux animaux. Classée dans la famille des protéases à acide aspartique en raison de son mécanisme catalytique impliquant deux résidus d'aspartate, elle fut d'abord reconnue comme protéase, puis comme endopeptidase (**Simpson, 2000**). **Hartley (1960)**, l'a ultérieurement classée comme protéase acide, son activité étant optimale à un pH très bas, généralement compris entre 1,5 et 3,5 (**Banga-Mboko *et al.*, 2002**).

Son rôle principal consiste à hydrolyser les liaisons peptidiques des protéines alimentaires, facilitant ainsi leur digestion dans l'environnement acide de l'estomac. Historiquement, la pepsine a été identifiée pour la première fois par Theodor Schwann en

1836, qui la nomma en référence au mot grec « pepsis » signifiant digestion. Toutefois, les effets du suc gastrique avaient été observés dès 1752 par Réamur, et les propriétés digestives furent démontrées plus tard par Spallanzani. En 1930, John H. Northrop est parvenu à cristalliser la pepsine, prouvant sa nature protéique (Aehle, 2007).

La pepsine est synthétisée sous forme inactive, le pepsinogène, qui subit une activation autocatalytique déclenchée par l'acidité gastrique (Kerboeuf *et al.*, 2002). Cette étape est essentielle pour le déclenchement de la digestion protéique.

L'enzyme est largement présente dans le tractus digestif des mammifères, oiseaux, poissons et amphibiens (Pletschke *et al.*, 1995b). Chez les vertébrés, elle est principalement localisée dans l'estomac, mais des quantités moindres ont été détectées dans le sang, les muscles, l'urine, les ovaires (ex. truite de ruisseau), ou encore la peau (ex. puffer Fish) (Effrontés *et al.*, 2007 ; Bobe et Goetz, 2001 ; Kurokawa *et al.*, 2005).

La pepsine a été isolée et étudiée chez de nombreuses espèces : homme (Sogawa *et al.*, 1983), singe (Kageyama et Takahashi, 1980), porc (Foltmann *et al.*, 1995), bovin (Chow et Kassel, 1968), dromadaire (Abuharfeel et Abuereish, 1984), rat, lapin, ainsi que plusieurs espèces de poissons (De Melo Oliveira *et al.*, 2014). Cette diversité biologique confirme l'importance évolutive de la pepsine et sa conservation fonctionnelle chez les animaux vertébrés.

1.1.2.2 Caractéristiques de la pepsine aviaire

La pepsine de poulet est obtenue à partir du proventricule, ou ventricule succenturié, une partie allongée d'environ 3 cm, située entre le jabot et le gésier, légèrement décalée vers la gauche dans l'abdomen. Cette zone est tapissée d'un épithélium formé de cellules cylindriques (Alamargot, 1982) (figure 12). L'activation de la pepsine se fait à partir de son précurseur inactif, le pepsinogène, sous l'effet de l'acide chlorhydrique dans un environnement acide, typiquement entre pH 2 et 4 (Donta et Vanvunakis, 1970).

Selon Bohak (1969), le pepsinogène de poulet a un poids moléculaire de 43 kDa et contient 387 acides aminés. Une fois activée, la forme purifiée de la pepsine présente un poids moléculaire réduit à 35 kDa, avec 308 acides aminés. Des recherches menées par Green et Llewellyn (1973), ont identifié au moins cinq types de pepsinogènes dans un extrait brut de l'estomac de poulet. L'un d'eux a été isolé et transformé en pepsine active, avec des masses moléculaires respectives de 36 kDa pour le pepsinogène et 34 kDa pour l'enzyme. Ces

auteurs ont également déterminé que le point isoionique de la pepsine se situait autour d'un pH égal à 4,0, et que l'enzyme restait stable même à des pH atteignant 7,0.

Donta et Vanvunakis (1970), ont également identifié trois formes distinctes de pepsinogènes désignées A, B et C. En ce qui concerne son activité enzymatique, la pepsine de poulet est la plus active dans un environnement acide dont le pH est compris entre 1,5 et 4,5, avec un maximum d'activité à pH 2,8, lorsque l'hémoglobine est utilisée comme substrat (**Bohak, 1969**).

Sur le plan moléculaire, la pepsine est une protéine contenant plusieurs résidus de tryptophane au total cinq (Trp39, Trp141, Trp181, Trp190 et Trp300) ce qui lui confère une structure dite poly-tryptophane. Elle est organisée en deux domaines homologues : un domaine N-terminal allant du résidu 1 à 172 et un domaine C-terminal s'étendant du résidu 173 à 326. Entre ces deux régions se situe le site actif de liaison de la pepsine, qui permet l'interaction avec diverses petites molécules. Ce site catalytique est défini par la présence de deux résidus d'acides aspartiques (Asp32 et Asp215), dont l'un doit être protoné et l'autre déprotoné pour que l'enzyme soit fonctionnelle (**Antonov *et al.*, 1978**).

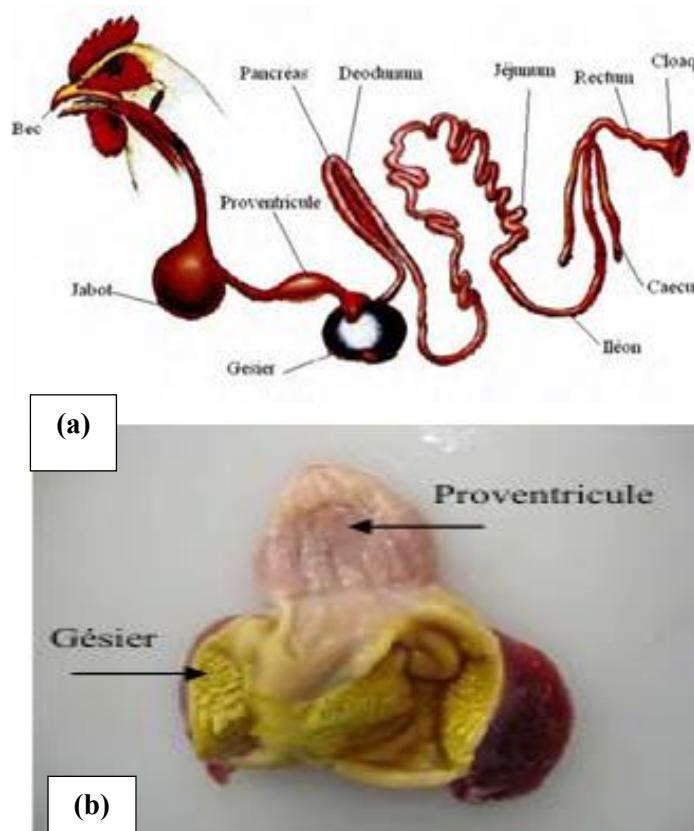


Figure 12 : (a) Appareil digestif du poulet ; (b) Complexé stomacal du poulet (**Larbier et Leclercq, 1992**).

1.1.2.3 Applications de la pepsine

La pepsine de poulet, extraite à partir des proventricules représente une enzyme aspartique d'origine animale aux applications variées dans plusieurs domaines industriels. Selon **Jamdar et Harikumar (2016)**, les intestins de poulet, en tant que sous-produit de l'industrie avicole, peuvent constituer une source intéressante de protéases, dont la pepsine, pouvant remplacer d'autres enzymes utilisées dans le secteur agroalimentaire. En transformation fromagère, cette enzyme a déjà fait l'objet de recherches en tant que substitut potentiel à la présure, à l'image de la pepsine bovine, utilisée depuis les années 1960 (**Ramet, 1997**). En Algérie, elle est notamment employée dans la fabrication artisanale d'un fromage frais du Sud appelé Takamérite (**Larbier et Leclercq, 1992**). Les travaux de **Krid (2013)** ont d'ailleurs mis en évidence son efficacité dans la coagulation du lait.

Au-delà du domaine laitier, la pepsine de poulet est aussi utilisée pour l'extraction du collagène, notamment à partir des pieds de poulet ou de bœuf, dans une solution acide à basse température, avec un rendement pouvant atteindre 22,94 % du poids sec (**Hashim, 2014**). Cette application est particulièrement recherchée dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques (**De Melo Oliveira et al., 2014**). Elle est également impliquée dans la digestion des acides nucléiques, utilisés comme compléments alimentaires pour améliorer la santé et la croissance chez les volailles (**Liu et al., 2016**). Dans le secteur des sous-produits marins, elle est mise en œuvre dans la production de silage de poisson et contribue à améliorer la digestibilité des protéines dans l'alimentation animale (**De Melo Oliveira et al., 2014**).

La pepsine trouve également des applications dans d'autres secteurs industriels, notamment dans la production d'hydrolysats caséiniques. Elle peut aussi être utilisée pour modifier la protéine de soja, en la soumettant à un traitement thermique visant à neutraliser les facteurs antinutritionnels. Par ailleurs, cette enzyme intervient dans l'élaboration d'hydrolysats et de poudres protéiques issus du poisson ou des légumes, ainsi que dans la fabrication de certaines boissons. Elle présente un réel potentiel pour la production de peptides à valeur biologique ou technologique. De plus, elle pourrait contribuer à réduire l'allergénicité des protéines du lait, notamment en agissant sur la β -lactoglobuline (**Krid, 2013**).

1.2 Protéases d'origine végétale

Nombreuses sont les protéases d'origine végétale, nous en citerons deux, impliquées dans notre étude.

1.2.1 Cardosine

1.2.1.1 Étude botanique de la plante

Le cardon (*Cynara cardunculus* L.) est une plante diploïde, vivace et robuste, pouvant atteindre une hauteur de 80 à 150 cm. Elle appartient à la famille des Asteraceae et est originaire du bassin méditerranéen (**Quezel et Santa, 1963** ; **Coste, 1983** ; **Sonnante et al., 2007**). Durant sa première année de croissance, la plante ne produit qu'une rosette de feuilles stériles (**Bayer et al., 1990**). Elle se distingue de l'artichaut par ses feuilles profondément lobées, se terminant par des épines, ainsi que par ses bractées d'involucres terminées par une pointe dure et acérée (**Perrot, 1944**). La domestication de la forme sauvage de *Cynara* a donné naissance à deux variétés principales : le cardon cultivé et l'artichaut, toutes deux largement répandues autour du bassin méditerranéen (**Rottenberg et Zohary, 1996**).

Les fleurs du cardon sont tubulaires, androgynes, et se terminent par cinq pointes. Elles mesurent entre 4 et 5 cm et présentent une coloration variant du bleu au violet. Chaque fleur mature comprend un pistil (partie femelle), un tube floral, des pétales et un akène. Le pistil est lui-même formé d'un stigma, d'un stylet et de l'ovaire (**Rahmalho-Santos et al., 1997** ; **Duarte et al., 2006**) (figure 13). La floraison des variétés de *Cynara cardunculus* s'étend principalement de mai à juillet (**Wiklund, 1992**), et peut être divisée en quatre grandes phases (**Archontoulis et al., 2010**). La première est marquée par l'apparition de la tige principale et du capitule, ce dernier étant de forme ovale (33–75 mm × 32–95 mm) et servant de base à la floraison (**Gominho et al., 2009**). La deuxième phase correspond à l'épanouissement des nombreuses fleurs tubulaires. Les deux dernières phases représentent respectivement le vieillissement floral et la maturation des graines (figure 14).

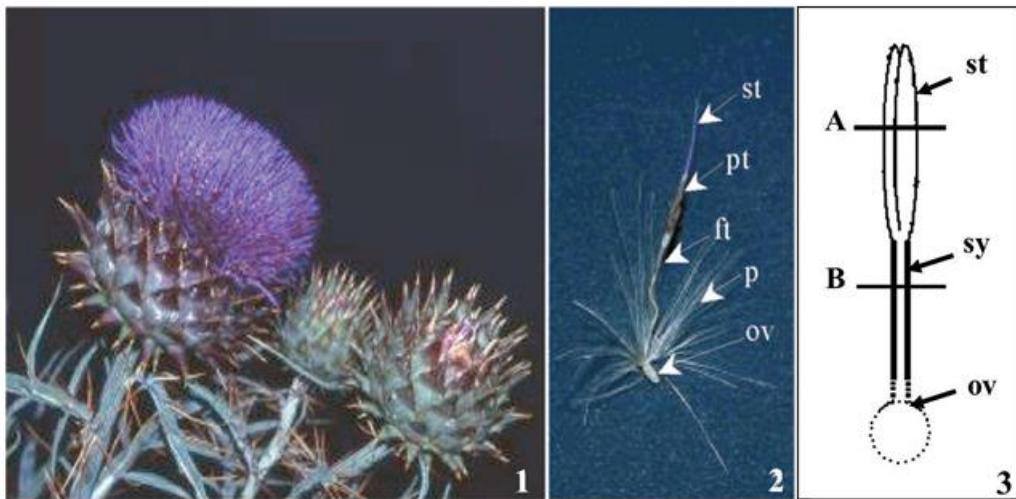


Figure 13 : Représentation de l’inflorescence et de la structure florale de *Cynara cardunculus L* 1 : Capitule floral. 2 : Fleur avec ses différentes structures. 3 : Schéma du pistil (**Duarte et al., 2006**).

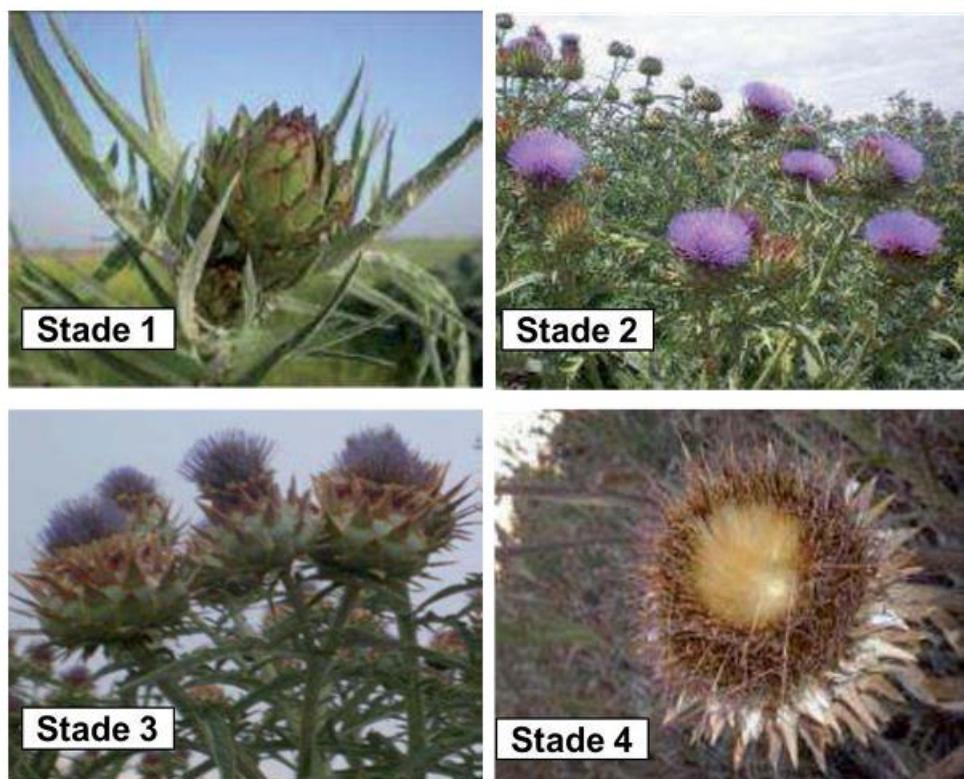


Figure 14 : Les différents stades de Florescence de *Cynara cardunculus L* (**Archontoulis et al., 2010**).

Les variétés de *Cynara cardunculus* sont bien adaptées au climat méditerranéen, caractérisé par des hivers froids et humides et des étés chauds et secs. Au stade de semis, la plante est sensible aux basses températures, mais une fois arrivée au stade rosette, elle peut

supporter des températures allant jusqu'à -5°C (Fernandez et Curt, 1995). Sa croissance est fortement influencée par la disponibilité en eau, la précipitation idéale étant d'environ 450 mm. Des quantités inférieures peuvent limiter la production de biomasse. Pour un développement optimal, la plante requiert un sol profond, légèrement argileux, modérément calcaire et à pH basique. En revanche, elle supporte mal les sols salins (Fernandez et Curt, 1995) (figure 15).

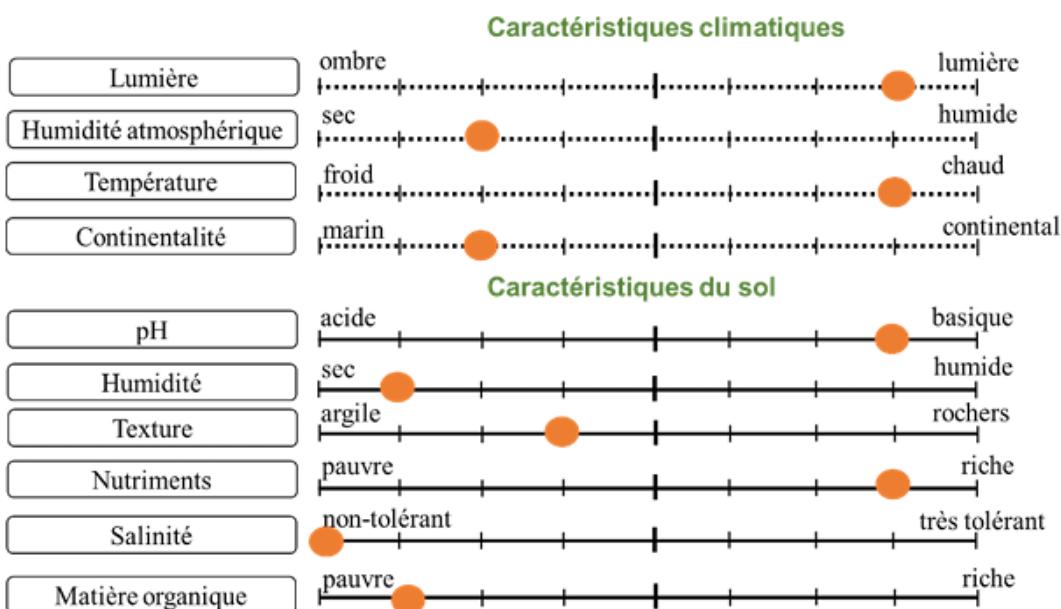


Figure 15 : Les conditions climatiques et les caractéristiques du sol favorables pour le développement des variétés *Cynara cardunculus L* (Fernandez et Curt, 1995).

1.2.1.2 Caractéristiques des cardosines

Les cardosines sont des enzymes protéolytiques appartenant à la famille des aspartyl-protéases (EC 3.4.23), dont l'activité catalytique repose sur la présence de deux résidus d'acide aspartique au niveau de leur site actif (Faro et al., 1998 ; Sarmento et al., 2009 ; James, 2012 ; Nair et Jayachandran, 2019). Elles sont extraites des fleurs de *Cynara cardunculus* et sont responsables de l'activité enzymatique de la plante. Deux isoformes principales, la cardosine A et la cardosine B, ont été identifiées et caractérisées (Verissimo et al., 1996), auxquelles s'ajoute plus récemment un groupe distinct appelé cardosine A0, composé des sous-unités E, F, G et H (Sarmento et al., 2009).

Les cardosines A et B proviennent de deux gènes différents et sont spécifiquement exprimées dans le pistil. La cardosine A, la plus abondante, est localisée dans les vacuoles et dans les cellules épidermiques, tandis que la cardosine B est retrouvée au niveau des parois

cellulaires et de la matrice extracellulaire (**Rahmalho-Santos et al., 1997 ; Duarte et al., 2006**) (figure 16). Ces enzymes sont synthétisées sous forme de proenzymes inactives et ne deviennent fonctionnelles qu'après un clivage protéolytique qui libère leur forme mature (**Rahmalho-Santos et al., 2012**). Le précurseur de la cardosine A, appelé cardosinogène A, contient 504 acides aminés, tandis que celui de la cardosine B (procardsine B) en compte 506. L'activation des enzymes nécessite la coupure de deux liaisons peptidiques internes. Durant ce processus, une séquence appelée « PSI », caractéristique des aspartyl-protéases végétales, est complètement éliminée dans le cas de la cardosine A, mais seulement partiellement dans celui de la cardosine B, ce qui pourrait expliquer la différence observée dans leurs masses moléculaires (**Verissimo et al., 1996 ; Faro et al., 1998 ; Ramalho-Santos et al., 2012**) (figure 17).

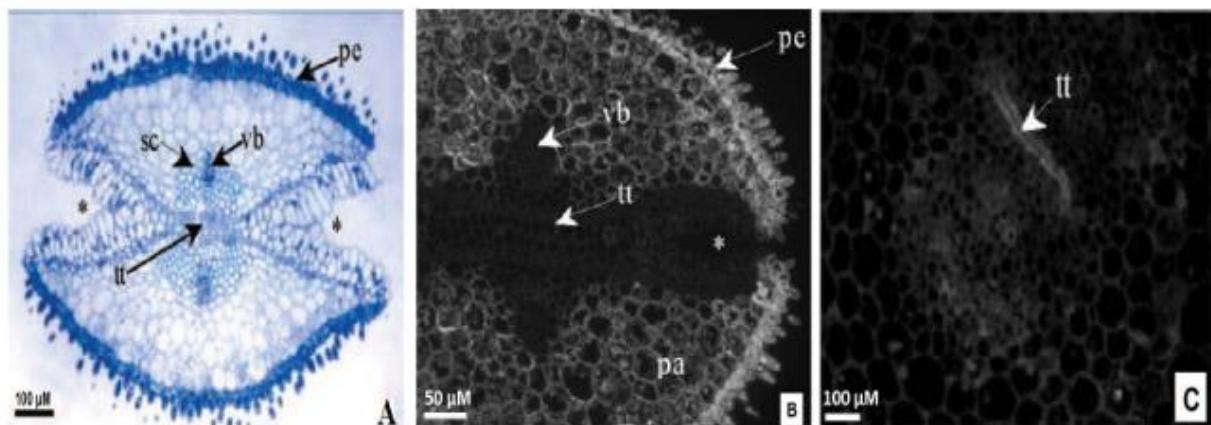


Figure 16 : Localisation tissulaire des cardosines A et B dans les fleurs de *Cynara cardunculus*, A : Coupe transversale du stigma, pe : papilles dermiques, sc : sclérenchyme, vb : faisceau vasculaire, tt : tissu transmetteur. B : Localisation de la cardosine A par immunofluorescence. C : Localisation de la cardosine B dans le tissu transmetteur (**Duarte et al., 2006**).

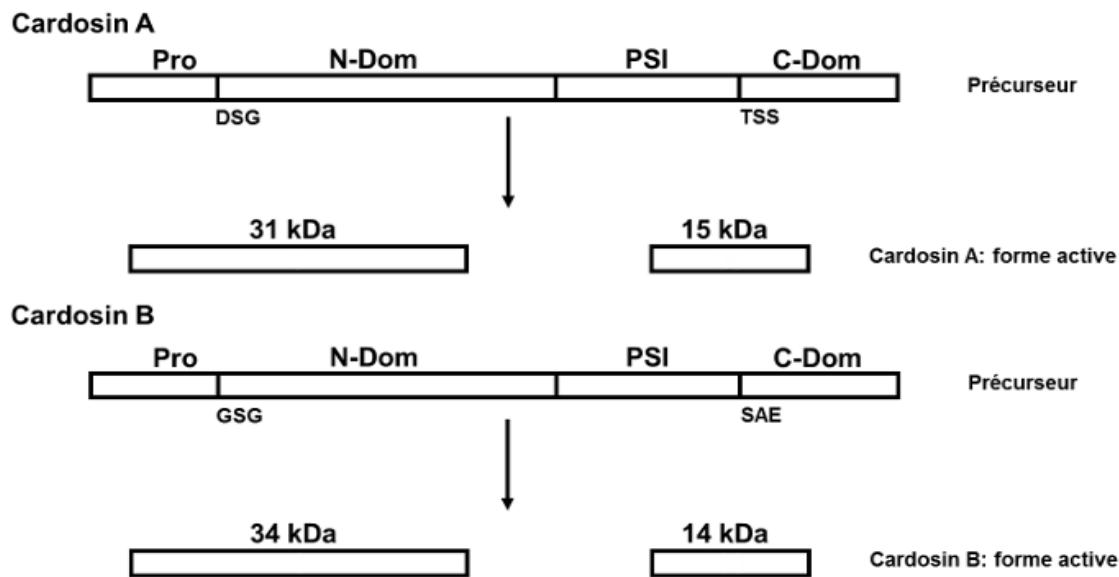


Figure 17 : Activation protéolytique des cardosines A et B à partir de leurs précurseurs (Veríssimo *et al.*, 1996).

À l'état mature, les deux enzymes se présentent sous forme de dimères. La cardosine A est constituée de deux chaînes polypeptidiques de 31 kDa et 15 kDa, tandis que la cardosine B est composée de sous-unités de 34 kDa et 14 kDa (Veríssimo *et al.*, 1996). Elles montrent une activité enzymatique dans une large plage de pH allant de 2 à 7, avec un optimum autour de pH 5, et sont toutes deux inhibées par la pepstatine A ainsi que le diazoacétyl norleucine méthyl ester (DAN), ce qui confirme leur appartenance à la classe des aspartyl-protéases (Veríssimo *et al.*, 1996). Il a également été montré que ces enzymes conservent leur stabilité à des températures élevées, jusqu'à 65 °C (Roseiro *et al.*, 2003).

1.2.1.3 Utilisation de la cardosine

La cardosine est principalement utilisée comme enzyme coagulante dans le domaine fromager. Elle est capable d'hydrolyser la caséine κ , provoquant ainsi la coagulation du lait, un mécanisme exploité dans la fabrication de fromages à pâte molle comme le Serra da Estrela, Serpa ou Azeitão (Roseiro *et al.*, 2003 ; Veríssimo *et al.*, 1995). En Algérie, l'utilisation d'extraits de cardosine issus de fleurs locales de *Cynara cardunculus* a permis la production expérimentale de fromages de type Brie et Camembert avec de bons rendements et des caractéristiques sensorielles satisfaisantes (Zikiou, 2013 ; Ben Amira *et al.*, 2017).

En dehors de l'industrie laitière, la cardosine A a montré une activité enzymatique spécifique sur la chaîne $\alpha 2$ du collagène humain de type I, indiquant un potentiel

d'application dans le domaine biomédical, notamment pour la dégradation contrôlée des protéines structurales (**Duarte et al., 2005**). Ainsi, la cardosine présente un double intérêt, technologique et thérapeutique, confirmé par des recherches ciblées.

1.2.2 Ficine

1.2.2.1 Description de la plante de figuier

Le figuier (*Ficus carica L.*), appartenant à la famille des Moracées, est un arbre emblématique des régions méditerranéennes, où il est cultivé depuis des milliers d'années (**El Khaloui, 2010**). Son nom botanique fait référence à ses vertus médicinales traditionnelles : *Ficus* évoque l'usage de son latex contre les verrues, tandis que *Carica* désigne une ancienne région d'Asie Mineure, correspondant à l'actuelle Turquie (**Oukabli, 2003**). Cette espèce fruitière figure parmi les plus anciennes cultivées par l'homme, avec une culture qui remonte à plus de 5 000 ans (**Lim, 2015**). D'ailleurs, sa dimension symbolique est renforcée dans la tradition musulmane, puisqu'une sourate entière lui est dédiée dans le Coran : « At-Tin » (**Chaker, 1997**).

Le figuier se présente sous forme d'arbrisseau (4–5 m) ou de petit arbre (jusqu'à 10 m), aux nombreuses branches étalées et à la capacité de régénération remarquable (**Tonelli et Gallouin, 2013**). Son tronc peut atteindre plus de 2 mètres de circonférence (**Chawla et al., 2012**), bien que son bois reste fragile (**Raj et Joseph, 2011**). Les feuilles sont caduques, vertes, alternées, de forme palmée, inodores et légèrement amères (**Starr et al., 2003** ; **Chawla et al., 2012**).

Les fleurs sont invisibles de l'extérieur car elles sont enfermées dans un réceptacle appelé sycone, muni d'un ostiole (**Bachi, 2012**). Le fruit, connu sous le nom de figue, se présente sous diverses teintes (vert, jaune, rouge, violet à noir), de forme arrondie ou pyramidale, et mesure entre 5 et 8 cm (**Starr et al., 2003**). La figue n'est pas un vrai fruit, composé d'une pellicule (épiderme), une pulpe composée d'un réceptacle charnu (le synconium), contenant les graines (akènes), un ostiole (œil) et un pédoncule (Figure 18A) (**Haesslein et Oreiller, 2008**). La peau de la figue est mince, tendre, blanchâtre, pale, jaune, rose, rouge ou pourpre dépendant de la variété. À maturité, la figue est un fruit sucré, doux, délicieux et juteux (**Lansky et Paavilainen, 2011**).



Figure 18 : Représentations morphologiques du figuier (*Ficus carica L.*), Arbre (A) et fruit (B), Latex (C) et feuilles (D) (Hafid, 2021).

Le figuier produit deux types de figues : celles du printemps, appelées figues fleurs (*El-Bacoor*), issues des rameaux de l'année précédente, et celles d'automne (*Karmoss*), qui se forment sur les jeunes pousses. Les variétés qui produisent les deux types sont dites « bifères », tandis que celles qui ne donnent que la récolte d'automne sont qualifiées d'« unifères » (Ouakbli, 2013 ; Azzi, 2012).

D'un point de vue agronomique, le figuier est sensible au froid et sa culture commerciale est déconseillée en dessous de 5 °C en hiver. En moyenne, une plantation compte 100 arbres par hectare et offre un rendement de 5 à 8 tonnes, avec une pleine production atteinte vers la douzième année (Espiard, 2002).

Enfin, le figuier est également reconnu pour son latex blanc, un liquide visqueux présent dans toutes les parties de la plante (Kim *et al.*, 2003). Ce latex, rapidement coagulé et séché après récolte, donne la ficine brute (Bruneton, 2009). Il contient une richesse en composés bioactifs : caoutchouc, résine, protéines (dont les enzymes protéolytiques comme la lipase, estérase, catalase et peroxydase), sucre et acide malique (Raj *et Joseph*, 2011).

1.2.2.2 Localisation et caractérisation de la ficine

La ficine, également appelée ficaine (EC 3.4.22.3), est une endopeptidase appartenant à la famille des protéases à cystéine (Low, 1976 ; Nassar et Newbury, 1987 ; Grzonka *et al.*, 2007 ; Nouani *et al.*, 2009 ; Devaraj *et al.*, 2008 ; Azarkan *et al.*, 2011 ; Zar *et al.*, 2013 ; Shah *et al.*, 2014). Cette enzyme est constituée de 210 acides aminés, et son poids

moléculaire varie entre 20 et 35 kDa (**Devaraj et al., 2008 ; 2011**). D'autres auteurs l'estiment plus précisément entre 25 et 26 kDa (**Tarté, 2009**) ou à 25 kDa (**Lowe, 1976 ; Katsaros et al., 2009**).

Le site actif de la ficine est formé de deux résidus essentiels : la cystéine (Cys-25) et l'histidine (His-159) (**Feijoo-Siota et Villa, 2011 ; Katsaros et al., 2009**). Comme toutes les endopeptidases de ce groupe, elle est activée par des agents réducteurs tels que la cystéine, le thiosulfate ou le glutathion, et au contraire, elle est inhibée par les ions métalliques, les oxydants ou tout composé réagissant avec les groupes thiols. Le mécanisme catalytique typique des protéases à cystéine (ou protéases à thiol) repose justement sur l'implication d'un groupe thiol dans leur site actif (**Gonzalez-Rabade et al., 2011**).

En termes de spécificité, la ficine montre une grande capacité à hydrolyser les liaisons peptidiques impliquant des acides aminés non chargés, aromatiques ou hydrophobes (**Di Pierro et al., 2014**). Elle agit notamment sur les résidus de tyrosine, phénylalanine et valine (**Tarté, 2009 ; Van Oort et Whitehurst, 2010**). Son action sur la κ -caséine, précisément au niveau de la liaison Phe105–Met106, est similaire à celle exercée par la chymosine (**Walstra, 1999**). Toutefois, contrairement à cette dernière, la ficine présente une activité protéolytique plus étendue et moins spécifique, touchant également les caséines α et β . Cette activité excessive réduit le temps de coagulation, ce qui peut entraîner la formation de peptides au goût amer, la déstabilisation du caillé, ainsi qu'une diminution de sa concentration, affectant par conséquent le rendement en fromage (**Akar et Fadiloglu, 1999 ; Tarté, 2009**).

La ficine possède une grande stabilité thermique, avec une température d'activité comprise entre 67 et 77 °C (**Nassar et Newbury, 1987**). Une température optimale de 75 °C a été observée (**Siar et al., 2017**). D'autres auteurs ont rapporté une plage de température optimale située entre 45 et 65 °C (**Kortt et al., 1974**). Une température d'activité maximale de 60 °C a également été signalée (**Sugiura et Sasaki, 1974 ; Deveraj et al., 2008 ; Gagaoua et al., 2014**). La ficine présente aussi une température d'inactivation parmi les plus basses des protéases végétales, estimée à environ 70 °C (**Grzonka et al., 2007**). Cette enzyme est active à pH neutre et devient complètement inactive en dessous de pH 3,0 (**Polaina et MacCabe, 2007**). Son activité optimale se situe dans une plage de pH comprise entre 5,0 et 8,0 (**Polaina et MacCabe, 2007**).

1.2.2.3 Utilisation de la ficine

La figue est un fruit polyvalent qui peut être consommé frais, grillé ou séché. Avant même l'apparition du sucre raffiné, elle servait déjà comme édulcorant naturel. Son intérêt industriel repose sur ses multiples possibilités de transformation, notamment en produits dérivés tels que les confitures et les sirops. Le latex extrait du figuier, une fois séché et réduit en poudre, est utilisé comme agent coagulant dans la fabrication du fromage (**Jeddi, 2009**).

Depuis l'Antiquité, les protéases végétales issues de certaines plantes ont été utilisées dans les pratiques alimentaires et médicinales. Le latex du figuier, en particulier, est connu pour ses propriétés coagulantes et vermifuges, il entre dans la fabrication artisanale de fromage (**Shah *et al.*, 2014**). En Algérie, notamment en Kabylie, le latex brut est utilisé de manière traditionnelle pour produire un lait fermenté appelé *Agugli* ou *Iguissi*, qui a l'apparence du yaourt et un goût doux. Ce produit est obtenu en ajoutant quelques gouttes de latex au lait de chèvre (**Gagaoua *et al.*, 2014 ; Ziane *et al.*, 2014**).

Outre son usage en fromagerie, la ficine est également utilisée pour attendrir la viande. Elle présente une activité moins agressive envers les différentes protéines comparée à la papaïne ou à la bromélaïne. Cette enzyme à thiol cible en priorité les protéines myofibrillaires, tout en exerçant une faible action sur le collagène et l'élastine. Elle est capable de dégrader l'élastine dès 20 °C, mais son activité sur le collagène et les protéines myofibrillaires reste limitée en dessous de 40 °C (**Payne, 2009**).

Matériels et Méthodes

1. Le lait

Le lait employé dans ce présent travail est du lait écrémé en poudre, un produit industriel de marque MONT D'OR lait, contenant entre 1,5 et 2 % de matière grasse. Il est reconstitué par dissolution de 12g de poudre de lait écrémé dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M. Le lait écrémé ainsi reconstitué est appelé substrat de BERRIDGE. Le lait sera stocké à 4°C pendant 12 h avant utilisation afin de permettre l'équilibre physico-chimique d'une part, et d'autre part, la stabilité et la réhydratation des micelles. Pour éviter le développement microbien, 0,04 % (m/v) d'azide de sodium sont ajoutés (Benyahia, 2013).

1.1 Caractérisation du lait

- Détermination du pH et de l'acidité

Le pH et l'acidité titrable sont deux mesures d'acidité du lait. Le pH permet de déterminer la concentration des ions H⁺, alors que l'acidité titrable exprime la quantité d'acide lactique qui englobe l'acidité due en partie aux caséines, aux acides organiques et aux substances minérales contribuant à la formation d'acide lactique.

Le pH du lait à 25°C, change normalement dans une marge relativement étroite de 6,5 à 6,7. Cependant, l'acidité titrable varie de 0,12 à 0,18% d'acides lactiques, soit 12 à 18°D (1°D représente 0.1g d'acide lactique).

La détermination du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre selon la méthode Afnor, (1986).



Figure 19 : Mesure du pH du lait par pH mètre

L'acidité du lait est déterminée par titrage direct à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 N. La phénolphtaléine est utilisée comme indicateur visuel, son changement de couleur marquant le point de neutralisation. Les résultats sont exprimés en degrés Dornic (°D), chaque degré correspondant à 0,1 gramme d'acide lactique contenu dans un litre de lait, selon la méthode décrite par la norme **Afnor (1986)**.

2. Extraction des enzymes

2.1 La Pepsine

2.1.1 Préparation des proventricules

Les proventricules sont prélevés dans une boucherie située à Aïn Smara (wilaya de Constantine). Après récupération, ils sont incisés longitudinalement, puis soigneusement lavés à l'eau du robinet afin d'éliminer les résidus graisseux et le contenu interne. Une fois nettoyés (figure 20), les échantillons sont conservés à 2 °C durant toute la nuit. Le lendemain matin, ils sont directement transportés au laboratoire de l'université dans un bain de glace pour préserver leur qualité et éviter toute altération avant la réalisation des manipulations expérimentales.



Figure 20 : Proventricule de poulet : avant incision (A) et après incision : face intérieure (B) face extérieure (C) (**Hafid, 2021**).

2.1.2 Extraction enzymatique

L'extraction de la pepsine de poulet est effectuée selon le diagramme décrit par **Bohak, (1970)**. Une quantité de 100 g de proventricules de poulet est finement hachée à l'aide d'un hachoir électrique. Les tissus obtenus sont ensuite transférés dans 300 ml d'une solution de macération contenant du chlorure de sodium (NaCl) 6g, et du bicarbonate de sodium (NaHCO₃) 2,1g, puis laissés en agitation pendant trois heures à température ambiante (figure 21).



Figure 21 : Hachage et macération sous agitation des proventricules de poulets.

À l'issue de la macération, le mélange est filtré à l'aide d'une compresse afin d'éliminer les résidus solides. Le filtrat, riche en pepsinogène est soumis à une acidification contrôlée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl, 3 N), jusqu'à atteindre un pH de 2, favorisant ainsi l'activation enzymatique du pepsinogène (figure 22).



Figure 22 : Activation du pepsinogène.

La solution a été incubée à température ambiante pendant 30 minutes, puis neutralisée progressivement à un pH de 6,6 à l'aide d'une solution de soude (NaOH, 1 N).

Le mélange est ensuite centrifugé à froid à 3200 tours par minute pendant 30 minutes, permettant la séparation du mucilage et des débris tissulaires (figure 23). Le surnageant clarifié, correspondant à l'extrait enzymatique actif est récupéré et conservé au congélateur jusqu'à son utilisation.

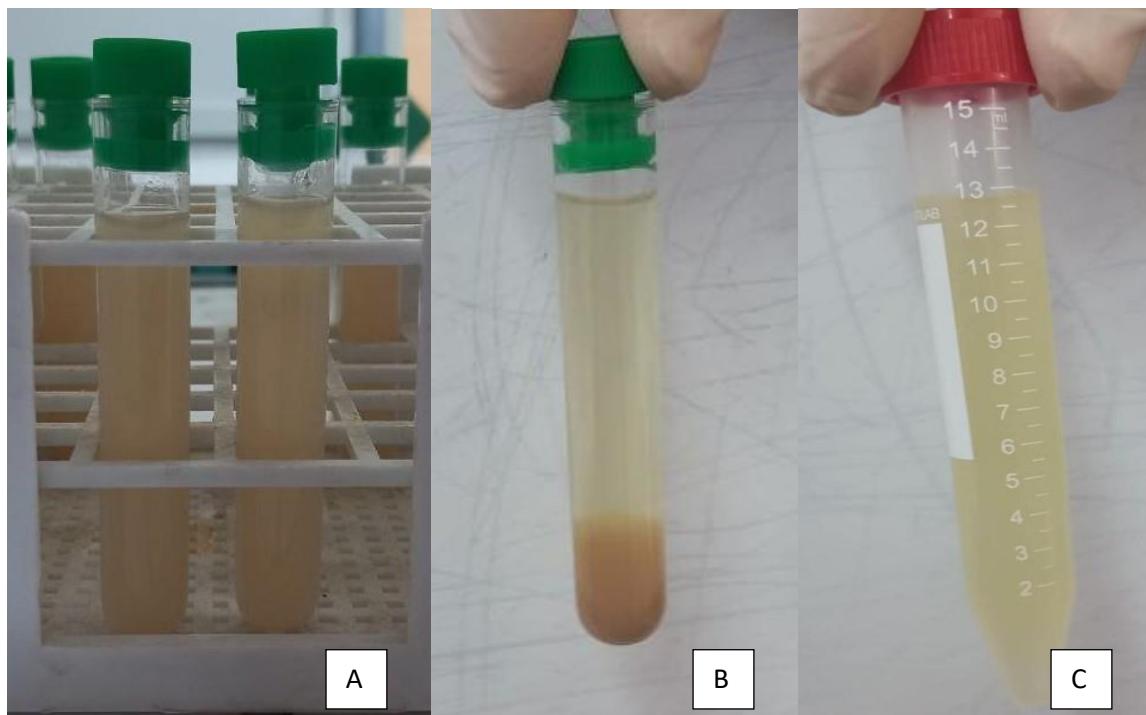


Figure 23 : Centrifugation de l'extrait enzymatique. A : avant la centrifugation, B : après la centrifugation, C : Le surnageant clarifier.

2.1.3 Le diagramme d'extraction

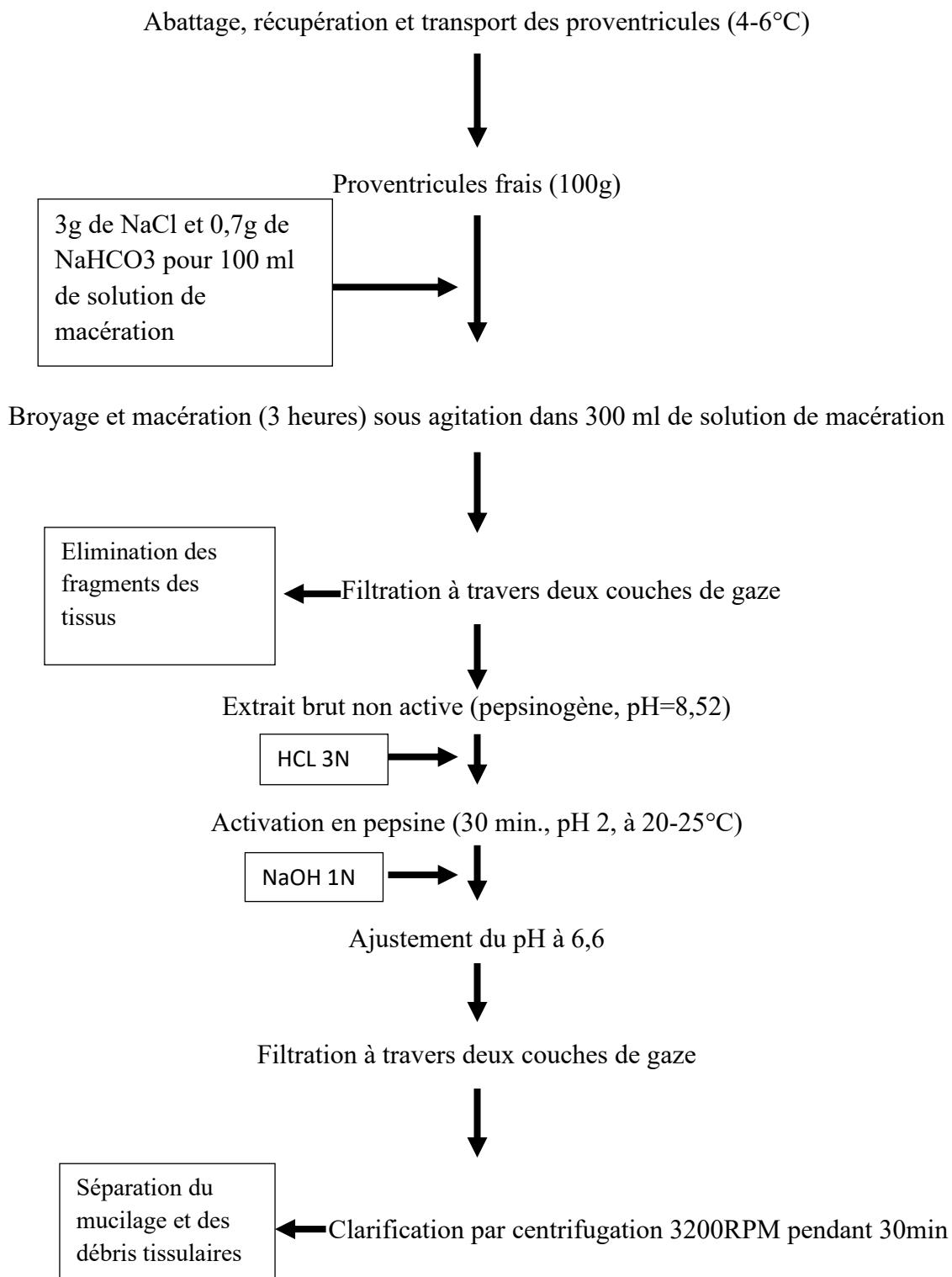


Figure 24 : Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet (Bohak, 1970).

2.2 La ficine

2.2.1 Récupération du latex

La matière première végétale utilisée dans ce travail est le latex, un liquide blanc et visqueux s'écoulant des feuilles et des fruits du figuier (*Ficus carica*) lorsqu'ils sont séparés de leurs tiges. Le prélèvement du latex est effectué au mois d'avril dans la région d'El Mechira, située dans la wilaya de Mila. La collecte s'est faite manuellement, par incision du tronc de l'arbre, et le latex frais a été recueilli dans des flacons de 15 ml (Figure 25). Après récolte, le latex est conservé au réfrigérateur, à une température comprise entre 2 et 4 °C, en attendant l'extraction du système enzymatique.



Figure 25 : Extraction du latex à l'aide d'une seringue sur le tronc d'un figuier.

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 phases sont récupérées. La phase superficielle représente les gommes, la phase inférieure représente les débris, alors que l'extrait de ficine, est récupéré dans la phase du milieu (figure 26). L'extrait enzymatique brut de la ficine, est conservé dans des Eppendorf de 1ml, au congélateur jusqu'à son utilisation.

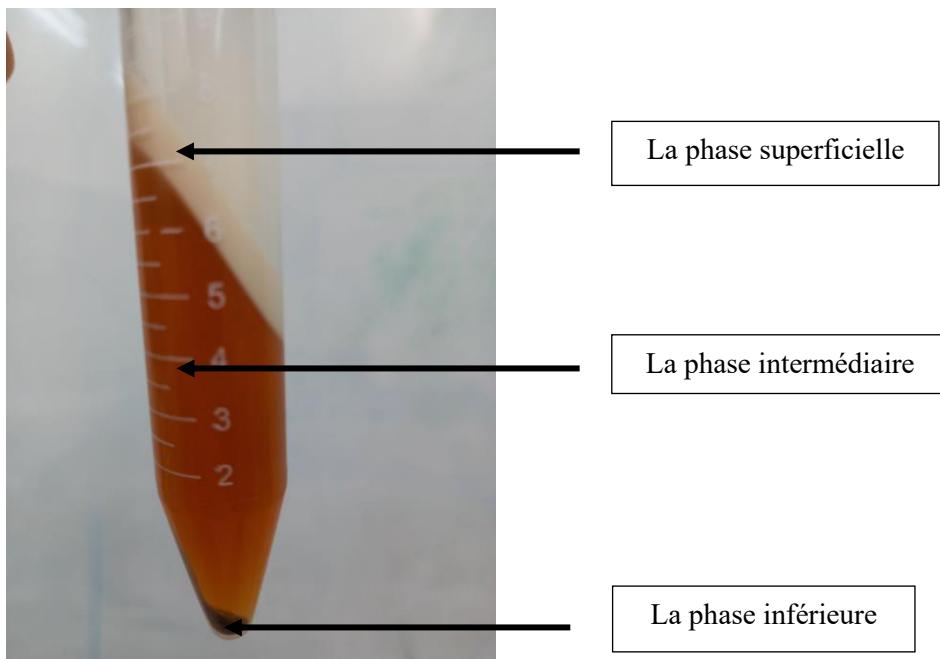


Figure 26 : Phases du latex de figuier après centrifugation.

2.3 Extraction de la cardosine

2.3.1 Récolte et préparation

Les fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*) sont récoltées manuellement au mois de Mai dans la région d'El Mechira, située dans la wilaya de Mila (figure 27). Les fleurs utilisées dans cette étude sont prélevées à un stade avancé de floraison (présentant une couleur violette foncée), à partir de capitules frais et bien développés, afin d'assurer une activité coagulante optimale et un meilleur rendement lors de l'extraction. Une fois récoltées, les parties extérieures et épineuses sont soigneusement éliminées. Seule la partie interne est conservée, correspondant principalement au réceptacle floral et à la base des fleurons tubulaires, reconnaissables par leur couleur blanche et violette. Ces structures contiennent les enzymes coagulantes recherchées pour l'extraction de la cardosine.



Figure 27 : Fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*).

2.3.2 Extraction du système enzymatique

Pour extraire le système enzymatique des fleurs sèches de cardon on utilise le protocole décrit par **Tsouli, (1974)** et optimisé par **Nouani *et al.*, (2009)** (figure 28). Ainsi 10 g de fleure de cardon sont broyées dans 100 ml de tampon d'acétate de sodium à 0,1 M pH 5. Ensuite, 0,2 % d'acide borique est ajouté afin d'éviter toute prolifération de micro-organisme. On laisse macérer pendant 24 heures à l'obscurité. Dans le but d'extraire un maximum de matière enzymatique l'ensemble est congelé à -20°C pendant 6h, puis décongelé à température ambiante sous une agitation douce pendant 1h, le liquide est ensuite centrifugé à 11000g pendant 10 minutes, le surnageant est ensuite filtré et l'extrait brut des fleurs de cardon est obtenu.

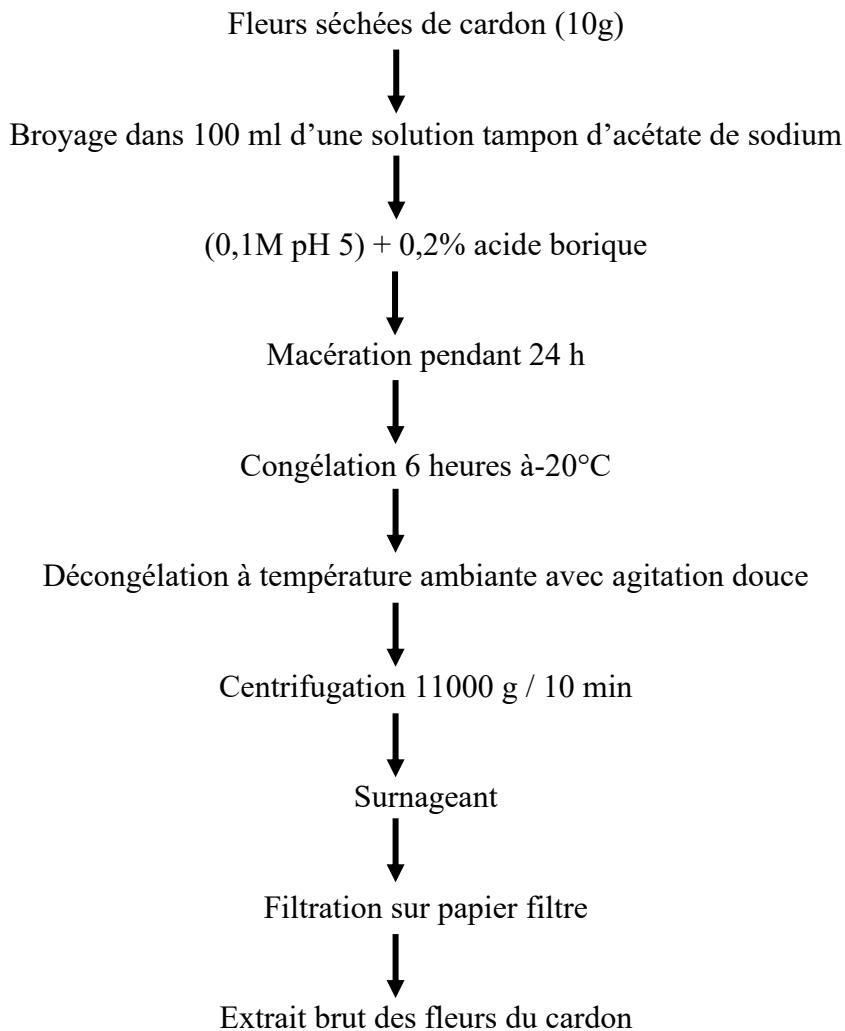


Figure 28 : Protocole d'obtention de l'extrait brut des fleurs du cardon (Nouani *et al.*, 2009).

3. Caractérisation de l'activité enzymatiques des extraits

3.1 Mesure du temps de floculation

Dix ml du substrat de Berridge (pH 6,6) contenus dans un tube à essai sont maintenus au bain Marie à 30°C. Le chronomètre est déclenché lors de l'ajout de 1 ml de la dilution enzymatique. Le tube est ensuite soumis à une légère rotation, le chronomètre est arrêté dès l'apparition des premiers flocons sur la paroi du tube et le temps de floculation est noté et employé dans le calcul de l'activité coagulante. La dilution d'enzyme retenue est celle qui donne un temps de floculation compris entre 300 et 360 secondes (Green *et al.*, 1984), Rappelons que la dilution de l'extrait brut de pepsine, ficine, cardosine et celle de la présure suscitée ont servi à l'ensemble des différentes déterminations de notre étude.

3.2 Evaluation de l'activité coagulante

L'activité coagulante qui exprime la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait, est déterminée selon la méthode de **Berridge (1995)**. Elle est basée sur l'évaluation visuelle de l'apparition des premiers flocons de la coagulation du substrat du Berridge. Cette activité est exprimée en unité d'activité coagulante (U.A.C) ou d'unité présure (UP) qui est définie par la quantité d'enzyme contenue dans 1mL de la solution enzymatique qui peut coaguler 10 ml de substrat standard de Berridge en 100 secondes à 35°C.

La mesure du temps de coagulation correspond au temps s'écoulant entre l'addition de l'extrait enzymatique au substrat de Berridge, et de l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne du tube inclinée, subissant un lent mouvement rotationnel. L'activité coagulante, exprimée en Unité Présure (UP), est calculée selon l'expression suivante :

$$U.A.C = \frac{100*V}{10*t*v}$$

Avec :

V = volume de lait (substrat de Berridge)

10 = volume du substrat standard (10 ml)

100 = temps de coagulation du substrat standard (100 secondes).

V = volume de l'extrait d'enzyme

t = temps de flocculation en secondes.

L'activité coagulante peut être également exprimée par la force coagulante (F), donnée en unité Soxhlet (US). Elle représente le nombre de volumes de lait frais coagulé par un volume d'extrait coagulant, pendant un temps de 40min à 35°C.

La force coagulante (F) est calculée selon la formule suivante :

$$F = \frac{2400*V}{T*v}$$

Avec :

V : volume de lait ;

v : volume de l'extrait de l'enzyme ;
T : temps de coagulation en secondes ;
2400 : temps d'incubation (40min) x 60 secondes.

2.3 Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est effectué en utilisant la méthode de **Lowry et al., (1951)**, 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).

2.4 Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée selon la méthode décrite par **Green et Stackpoole (1975)** (Annexe 2). Cette mesure permet d'évaluer le taux de dégradation du substrat (caséine) par l'enzyme pendant la phase primaire (phase enzymatique). Pour cela, nous avons mesuré la concentration des produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12 % concentration finale.

En effet, l'activité protéolytique de nos extraits enzymatiques est déterminée en employant la caséine comme substrat. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par une protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés.

L'activité protéolytique est mise en évidence par un dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de **Lowry et al., (1951)**.

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard.

Une unité de protéase (U) correspond à l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée en une heure de digestion par 1 ml d'extrait enzymatique, avec comme substrat, soit la caséine, soit l'hémoglobine (**Mechakra et al., 1999**).

Le mélange réactionnel consiste à mélanger 1g de caséine dans 50 ml de tampon phosphate (0.1M, pH 7).

Un volume de 1ml de ce mélange est additionné de 1 ml d'extrait enzymatique, qui sera ensuite bien agité et incubé au bain marie à la température de 35 pendant 20 minutes, et

la réaction est arrêtée par l'addition de 5 ml de TCA à 5% et laissée au repos pendant 15mines à température ambiante.

L'ensemble est alors centrifugé, et 0.5 ml du surnageant est additionné de 2,5 ml de la solution C préparée en mélangeant un volume de 100 ml de la solution A avec un volume de 2 ml de la solution B.

La solution A est préparée en mélangeant 1g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 5 g de carbonate de sodium (Na_2CO_3) dans 250 ml d'eau distillée.

La solution B est préparée en mélangeant 0.1 g de tartrate sodium-potassium ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$) et 0.032g de sulfate de cuivre (CuSO_4) dans 10 ml d'eau distillée.

Après une incubation pendant 10 minutes à 35 °C, un volume de 250 μL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/2) sont ajoutés.

Une fois bien agité et incubé à température de 35°C pendant 20 min, une coloration bleue apparaît, et l'absorbance est alors mesurée à 660 nm.

La concentration en tyrosine des tubes, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la tyrosine dans les mêmes conditions expérimentales (annexe).

L'activité protéolytique, exprimée en $\mu\text{g}/\text{h.ml}$, correspond à la libération de 1 μg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans 1mL de substrat.

A partir de l'activité protéolytique, une activité spécifique, exprimée en U/mg, est calculée. Elle est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique et la teneur en protéines de l'extrait enzymatique (**Nouani et al., 2009**).

Activité spécifique = activité enzymatique (U) / teneur en protéines (mg).

2.5 Confirmation des conditions optimales de coagulation

Pour mieux caractériser le profil coagulant de la pepsine de poulet, nous avons procédé à l'étude de la variation du temps de flocculation en fonction des variations des facteurs du milieu réactionnel (pH, température et concentration en CaCl_2). Le temps de flocculation le plus court noté pour chaque paramètre offre une activité coagulante plus importante. Les valeurs de pH, de température et de concentration en CaCl_2 du substrat sont déterminées comme suit :

Le pH a été ajusté pour les valeurs de : 5,5- 6- 6,5- 7- 7,5 et 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 de même préparation et de même température (bain Marie 30 °C). Un volume de 1 ml de chaque dilution enzymatique (pepsine de poulet ou présure) est rajouté et le temps de flocculation est déterminé (**Gordin et Rosenthal, 1978**).

Pour la température, des tubes contenant 10 ml de substrat de Berridge à pH 6,6 sont incubés dans un bain Marie, où les températures sont variées de 30°C à 65°C (intervalle de 5°C). Après 5 minutes d'incubation, 1 ml de chaque dilution enzymatique (pepsine de poulet ou présure) est rajouté et le temps de flocculation est déterminé (**Gordin et Rosenthal, 1978**).

La vérification de la concentration en CaCl₂, est réalisée par la dissolution de 12 grammes du lait en poudre écrémé dans 100 ml d'eau distillée contenant de 0,008-0,01-0,015-0,02-0,03 et 0,04 M de CaCl₂. Les tubes contenant 10mL de solution à tester de pH 6,6 sont mis dans le bain Marie (30°C) puis 1 ml de chaque dilution enzymatique (pepsine de poulet ou présure) est rajouté et le temps de flocculation est déterminé (**Gordin et Rosenthal, 1978**).

Résultats et discussion

1. Caractérisation physico-chimique du lait

Après reconstitution du lait par dissolution de 12 g de poudre de lait écrémé dans 100ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M.

1.1 pH

Le pH des substrats de Berridge préparés varie entre 6,6 et 6,8, avec une moyenne de 6,7. Ce résultat est en accord avec ceux de plusieurs chercheurs, notamment **Kersten (1937)**, qui rapporté un pH compris entre 6,4 et 6,6.

1.2 Acidité titrable

Selon **Ribadeau-Dumas (1991)** ainsi que **Silva et Malcata (2005)**, l'acidité titrable varie de 0,12 à 0,18% d'acides lactiques, soit 12 à 18°D (1°D représente 0,1g d'acide lactique). Dans notre étude, l'acidité obtenue varie entre 16 et 18°D.

Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques du substrat selon Berridge

Caractéristiques	Substrat de Berridge
Acidité	16 ,5
pH	6.67

2. Extraction des enzymes

2.1 Rendement de l'extraction

2.1.1 Pepsine

L'extrait brut de pepsine de poulet, obtenu selon le protocole appliqué, s'est présenté sous forme d'une solution de couleur jaune clair ; un résultat comparable à celui rapporté par **Adoui (2007)**, et **Siar (2014)**.

L'extraction de la pepsine à partir de 100 g de proventricules de poulet, réalisée à l'aide de 300 ml de solution d'extraction, a permis d'obtenir en moyenne 190,80 ml d'extrait enzymatique clarifié. Le rendement d'extraction obtenu a été estimé à 63,6 %. Ce rendement s'est révélé proche de celui rapporté par **Bentaila et Hamel (2024)**, évalué à 61,04 %, mais inférieur à la valeur de 78,5 % mentionnée dans l'étude de **Smith et Jones (2023)**.

Cela est probablement dû à la nature des proventricules utilisés, aux conditions spécifiques d'extraction appliquées (temps, température, agitation) ou encore à la fraîcheur de la matière première, qui peuvent influencer l'efficacité de l'extraction enzymatique.

2.1.2 Ficine

L'extrait enzymatique de ficine ainsi récupéré s'est caractérisé par une couleur brun clair, une texture visqueuse et une odeur fruitée prononcée. Ces caractéristiques ont été confirmées par les résultats de **Nouani, Dako et ces collaborateurs (2009)**.

Nous avons obtenu un rendement de récupération du système enzymatique brut à partir du latex de figuier de 60 %, correspondant à un volume de 18 ml d'extrait de ficine pour 30 ml de latex initial. Ce rendement s'est avéré proche de celui rapporté par **Bentaila et Hamel (2024)**, qui ont obtenu 62,5 %, bien qu'il soit resté inférieur au taux de 76,19 % mentionné par **Dahmoune et Goussem (2018)**.

2.1.3 Cardosine

L'extrait des fleurs de cardon que nous avons obtenu s'est présenté sous forme d'une solution brunâtre, une caractéristique également confirmée par **Zikiou (2013)**.

Le schéma de base appliqué pour l'extraction du système enzymatique des fleurs de cardon a reposé principalement sur une macération de 10 g de fleurs sèches dans 100 ml de tampon acétate de sodium (0,1 M, pH = 5). La quantité moyenne de fleurs de cardon récupérée après séchage a été estimée à 75 g, ce qui a permis d'obtenir un volume d'extrait de 620 ml, correspondant à un rendement de 82,66 %. **Zikiou (2013)**, a obtenu, quant à lui, un volume de 86 ml d'extrait à partir de 10 g de fleurs sèches. Ainsi, dans notre travail, nous avons estimé qu'une quantité de 10 g de fleurs sèches a permis de produire environ 83 ml d'extrait enzymatique, un résultat très proche de celui rapporté par cet auteur.

2.2 Caractérisation des extraits enzymatiques

Les extraits enzymatiques obtenus après l'extraction ont été caractérisés par leur activité coagulante, leur force coagulante, leur activité protéolytique, leur activité spécifique ainsi que leur teneur en protéines, comme présenté dans le tableau 4.

Tableau 04 : Principales caractéristiques des enzymes extraits.

Caractéristiques	Pepsine	Ficine	Cardosine	Présure
Taux de protéine (mg/ml)	20,723 mg/ml	20,72 mg/ml	10,26 mg/ml	4,71 mg/ml
Temps de flocculation (seconds)	15	2	254	40
Activité coagulante (UP)	6,7 UP	50 UP	0,39 UP	2,5 UP
Force coagulante (UAC)	1/1600 US	1/12000 US	1/94,48 US	1/600 US
Activité spécifique UP/mg	0,0159 UP/mg	0,013 UP/mg	0,03 UP/mg	0,53 UP/mg
Activité protéolytique µg/ml.min	9,06 µg/ml min	28,64 µg/ml min	2,02 µg/ml min	2,16 µg/ml min
Couleur	Jaune claire	Brune	Brunâtre	Transparent
Texture	Liquide	Visqueuse	Liquide	Liquide

2.2.1 Détermination de l'activité coagulante

Une unité de présure (1 UP ou 1 U.A.C.) correspond à la quantité d'enzyme contenue dans 1 mL de solution capable de coaguler 10 mL de lait standard en 100 secondes, à une température d'environ 30 °C.

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de pepsine de poulet est estimée à 6,7 UP. Cette valeur est relativement proche de celle rapportée par **Paez De Leon et al. (1995)**, qui obtiennent une activité de 5,52 UP, mais elle reste inférieure à celles rapportées par **Nouani et al. (2011)** et **Adoui (2007)**, avec respectivement 13,33 UP et 15,08 UP. En revanche, elle se révèle supérieure aux activités rapportées par **Boughellout (2007)**, **Bentaila**

et Hamel (2024), ainsi que Amari et Akil (2022), qui obtiennent respectivement 2,42 UP, 2 UP et 2,5 UP.

Concernant la ficine, l'activité coagulante de son extrait brut est mesurée à 50 UP. Cette valeur s'est avérée inférieure à celle trouvée par Siar (2014), soit 121,09 UP, mais nettement supérieure à celles rapportées par Moussa (2021) et Kherbouche-Belkacemi (2019), estimées respectivement à 0,36 UP et 14,53 UP.

L'extrait enzymatique de cardosine est présenté une activité coagulante de 0,39 UP, une valeur nettement inférieure à celle rapportée par Zikiou (2013), qui était de 3,23 UP.

Quant à la présure, son activité coagulante est évaluée à 2,5 UP, un résultat inférieur à ceux obtenus par Kherbouche-Belkacemi (2019) et Moussa (2021), qui ont rapporté respectivement 5,33 UP et 33,21 UP.

Ainsi, parmi tous les extraits testés, la ficine s'est distinguée par une activité coagulante nettement plus élevée (50 UP), comparée à la pepsine (6,7 UP), à la présure (2,5 UP) et à la cardosine (0,39 UP), (figure 29). Ces écarts d'activité peuvent être expliqués par les spécificités enzymatiques propres à chaque extract, notamment leur origine (végétale ou animale), leur affinité pour la caséine, ainsi que leurs conditions optimales d'action, telles que le pH et la température.

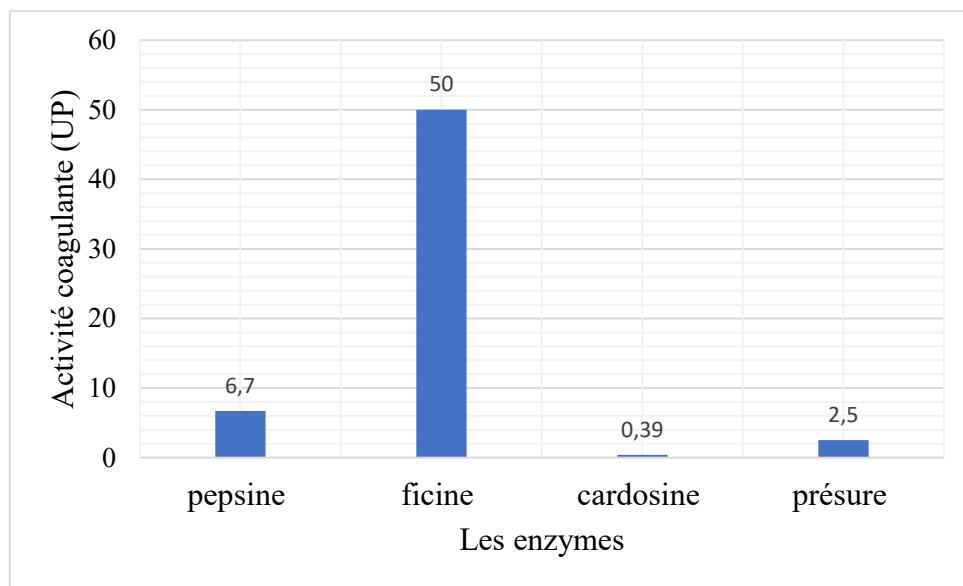


Figure 29 : Activité coagulante (en unités présure, UP) des différentes enzymes testées sur lait reconstitué

2.2.2 Détermination de la force coagulante

La force coagulante de l'extrait enzymatique de pepsine de poulet que nous obtenons est estimée à 1/1600 US, ce qui signifie qu'un millilitre de cet extrait est capable de coaguler 1600 mL de lait en 40 minutes. Cette valeur se rapproche de celle rapportée par **Amimour (2019)**, évaluée à 1/1638 US, mais demeure largement inférieure à celles rapportées par **Siar (2014)**, **Nouani *et al.* (2011)** et **Adoui (2007)**, estimées respectivement à 1/6041,64 US, 1/3200 US et 1/2579 US.

L'extrait enzymatique de ficine présente une force coagulante de 1/12000 US, ce qui correspond à une valeur considérablement élevée. Toutefois, elle reste inférieure à celles rapportées par **Siar (2014)** et **Nouani, Dako *et al.* (2009)**, qui indiquent des forces de 1/42059,7 US et 1/40000 US respectivement. En revanche, elle se révèle supérieure à celle rapportée par **Kherbouche-Belkacemi (2019)**, évaluée à 1/3487,2 US.

La force coagulante de la cardosine est déterminée à 1/94,49 US. Cette valeur demeure largement inférieure à celle rapportée par **Zikiou (2013)**, qui observe une force de 1/888 US.

La présure présente une force coagulante de 1/600 US, ce qui reste également inférieur à la valeur de 1/1279,2 US rapportée par **Kherbouche-Belkacemi (2019)**.

Ainsi, parmi les extraits évalués, la ficine se distingue par la force coagulante la plus élevée (1/12000 US), confirmant son efficacité supérieure par rapport à la pepsine (1/1600 US), à la présure (1/600 US) et à la cardosine (1/94,49 US). Cette supériorité reste cohérente avec les propriétés intrinsèques des protéases végétales, notamment leur forte affinité pour les substrats laitiers (figure 30).

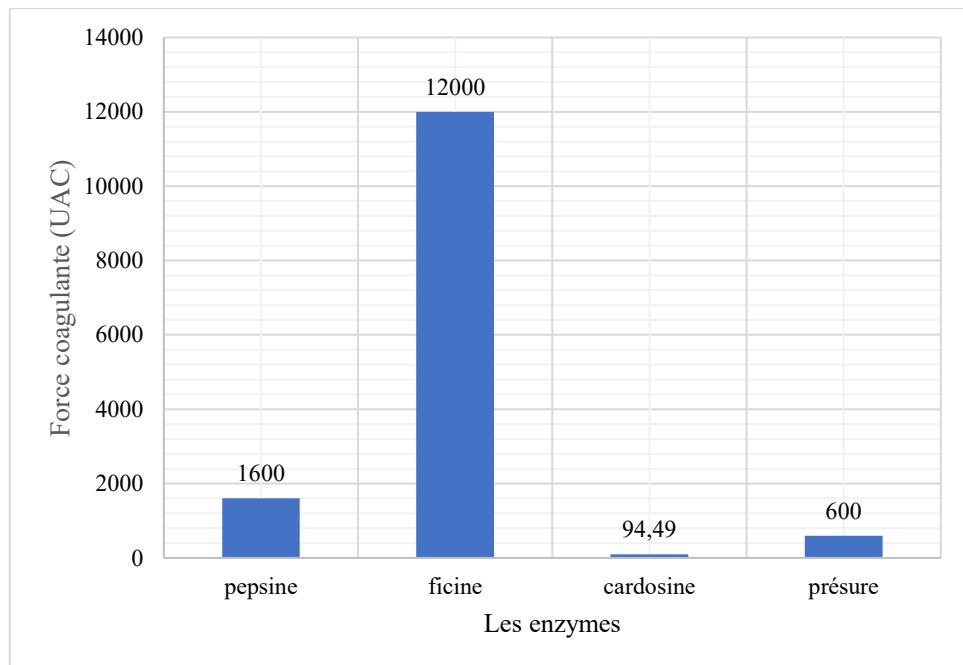


Figure 30 : Force de coagulation (US) des différentes enzymes étudiées.

Il convient de rappeler que la force coagulante dépend de plusieurs facteurs clés, 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. Ces paramètres influencent de manière significative les performances coagulantes observées.

2.2.3. Dosage des protéines des extraits enzymatiques

Selon la méthode de Lowry, et en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec la BSA dans les mêmes conditions expérimentales, la teneur en protéines de chaque extrait enzymatique est :

La teneur en protéines de l'extrait clarifié de pepsine de poulet est estimée à 20,723 mg/mL. Cette valeur se rapproche de celle rapportée par **Siar (2014)** (20,10 mg/mL), tout en restant nettement inférieure à la valeur élevée de 147,3 mg/mL mentionnée par **Nouani *et al.* (2011)**, et supérieure à celle obtenue par **Adoui (2007)** (8,77 mg/mL).

La concentration en protéines de la ficine est évaluée à 20,10 mg/mL, un résultat comparable à celui rapporté par **Nouani (2009)** (22 mg/mL), bien qu'inférieur à la concentration très élevée de 150 mg/mL obtenue par **Devaraj (2008)**.

La concentration en protéines dans l'extrait de cardosine est estimée à 10,26 mg/mL, une valeur inférieure à celle rapportée par **Zikiou (2013)**, qui l'évalue à 26 mg/mL.

Enfin, la concentration en protéines de la présure est mesurée à 4,71 mg/mL, ce qui dépasse la valeur de 2,24 mg/mL rapportée par **Kherbouche-Belkacemi (2019)**.

Ces résultats révèlent que la pepsine de poulet et la ficine présentent des teneurs en protéines très proches, estimées respectivement à 20,723 mg/mL et 20,10 mg/mL, ce qui suggère une concentration protéique équivalente dans les deux extraits. En revanche, la cardosine affiche une teneur plus faible (10,26 mg/mL), tandis que la présure enregistre la concentration la plus basse (4,71 mg/mL), traduisant une moindre richesse en protéines (figure 31).

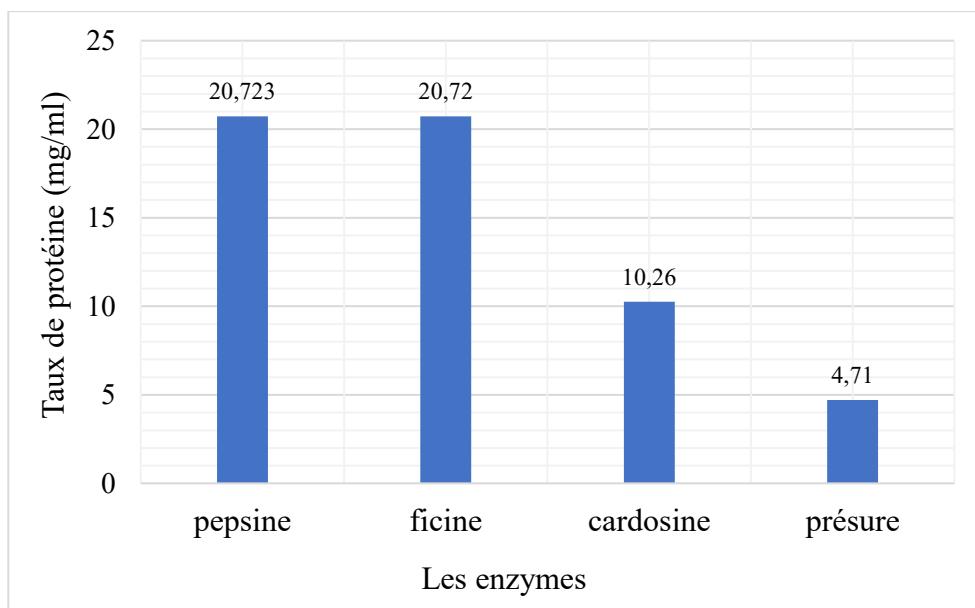


Figure 31 : Teneur en protéines (mg/ml) des extraits enzymatiques étudiés

Cela est probablement dû à la faible solubilité des protéines présentes dans l'extrait de cardosine et de la présure, ou à un rendement d'extraction moins efficace lié à la nature de ces sources enzymatiques.

2.2.4. Mesure de l'activité protéolytique

Selon les résultats obtenus, l'activité protéolytique de l'extrait brut de pepsine, exprimée par la quantité de tyrosine libérée, est estimée à 9,06 µg/mL·min. Cette valeur demeure nettement plus faible que celle rapportée par **Bentaila et Hamel (2024)**, qui obtiennent 134,3 µg/mL·min, ainsi que celle mentionnée par **Hafid (2021)**, évaluée à 52,1 µg/mL·min.

L'activité protéolytique de l'extrait brut de ficine est évaluée à $28,64 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$, une valeur bien inférieure à celles rapportées par **Siar (2014)** et **Fadıloğlu (2001)**, qui indiquent respectivement $469,7 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$ et $320 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$.

La **cardosine** présente une activité protéolytique de $2,02 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$, ce qui reste largement inférieur à la valeur rapportée par **Zikiou (2013)**, estimée à $22,34 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$.

Enfin, l'activité protéolytique de la présure est mesurée à $2,16 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$, une valeur supérieure à celle rapportée par **Kherbouche-Belkacemi (2019)**, évaluée à $0,2098 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$.

Ces résultats mettent en évidence des différences marquées entre les activités protéolytiques des enzymes testées. La ficine se distingue par l'activité la plus élevée ($28,64 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$), suivie de la pepsine de poulet ($9,06 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$). En revanche, la cardosine et la présure affichent des valeurs nettement plus faibles, respectivement $2,02$ et $2,16 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$. Ainsi, dans les conditions expérimentales appliquées, l'enzyme végétale ficine se révèle plus active sur le plan protéolytique que la pepsine, la cardosine et la présure (figure 32).

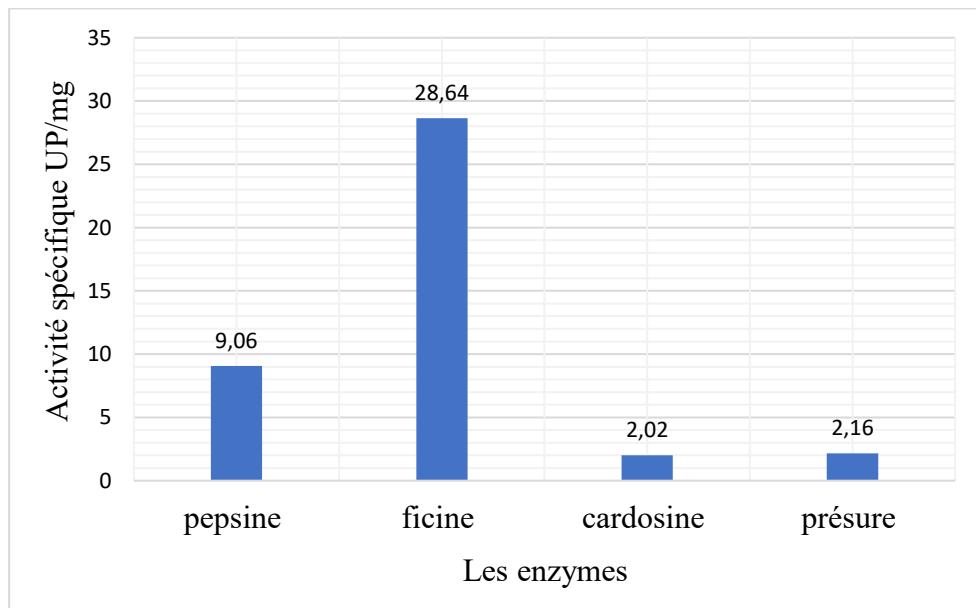


Figure 32 : Activité protéolytique ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{min}$) des différents extraits enzymatiques

Cela est probablement dû à la nature végétale de la ficine, connue pour sa forte activité protéolytique intrinsèque, ainsi qu'à sa capacité à hydrolyser un large éventail de liaisons peptidiques, contrairement aux autres enzymes testées dont l'activité est plus restreinte.

2.2.5. Mesure de l'activité spécifique

L'activité spécifique, exprimée en unités de coagulation par milligramme de protéine (UP/mg), correspond au rapport entre l'activité coagulante et la teneur en protéines de chaque extrait enzymatique.

L'extrait enzymatique de pepsine de poulet analysé a présenté une activité spécifique de 0,0159 UP/mg, une valeur relativement proche de celle rapportée par Bentaila et Hamel (2024), soit 0,068 UP/mg. Cependant, cette activité est restée nettement inférieure aux valeurs mentionnées par d'autres auteurs, notamment **Siar (2014)** avec 0,92 UP/mg, et **Nouani et ces collaborateurs. (2011)**, qui ont obtenu une valeur de 1,85 UP/mg.

Par ailleurs, l'activité spécifique de l'extrait brut de ficine est évaluée à 0,013 UP/mg, ce qui demeure largement inférieur aux valeurs rapportées par **Siar (2014)** et **Adoui (2007)**, qui ont respectivement obtenu 3,1 UP/mg et 2,5 UP/mg.

D'autre part, l'activité spécifique de l'extrait enzymatique de cardosine est estimée à 0,03 UP/mg, une valeur également inférieure à celle obtenue par **Zikiou (2013)**, qui est de 0,12 UP/mg.

Enfin, la présure est présente une activité spécifique de 0,53 UP/mg, une valeur nettement inférieure à celle rapportée par **Kherbouche-Belkacemi (2019)**, qui s'élevait à 12,59 UP/mg.

Les résultats montrent que l'activité spécifique la plus élevée est observée chez la présure microbienne (0,53 UP/mg), suivie par la cardosine (0,03 UP/mg). La pepsine de poulet présente une activité intermédiaire (0,0159 UP/mg), tandis que la ficine affiche la valeur la plus faible (0,013 UP/mg) (figure 33).

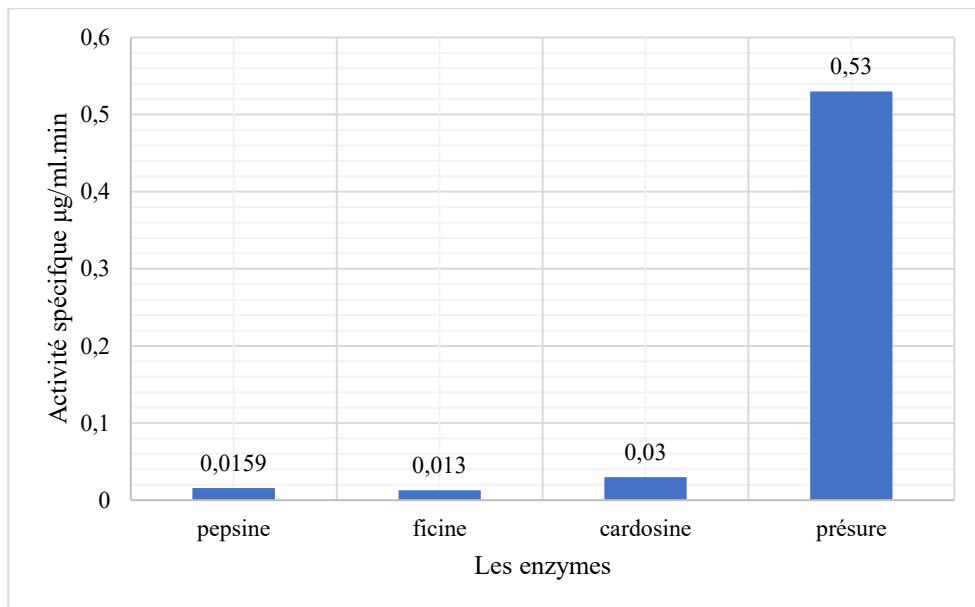


Figure 33 : Activité spécifique (UP/mg) des différentes enzymes coagulantes testées

Cela est probablement dû aux différences dans la composition des extraits bruts utilisés, notamment en termes de richesse en enzymes coagulantes actives. L'extrait de présure microbienne semble naturellement plus concentré en protéases spécifiques, tandis que les extraits de pepsine, de ficine et de cardosine contiennent probablement d'autres protéines non coagulantes qui diluent leur activité spécifique.

2.2.6 Détermination des conditions optimales de coagulation

Dans ce test, nous avons utilisé des dilutions enzymatiques sélectionnées de manière à obtenir un temps de flocculation compris entre 300 et 360 secondes. Ces dilutions ont été déterminées après plusieurs essais préliminaires, visant à identifier la concentration enzymatique adéquate pour chaque extrait. Nous n'avons donc pas utilisé les extraits bruts. Ce choix s'est appuyé sur les recommandations de **Green (1984)**, qui préconise d'ajuster les dilutions enzymatiques afin de standardiser le temps de flocculation entre 300 et 360 secondes (tableau 5). Cette approche permet un meilleur contrôle des conditions expérimentales et facilite la comparaison entre les différentes enzymes.

Tableau 5 : Dilutions optimales des enzymes pour un temps de flocculation ciblé entre 300 et 360 secondes

Enzymes	Dilution	Temps de flocculation en seconde
Pepsine	2 % (v/v)	300
Ficine	58,82 % (v/v)	342
Cardosine	0,129 % (v/v)	345
Présure	6,67 % (v/v)	355

2.2.6.1 Influence de la température

L'effet de la température du lait sur l'activité coagulante des extraits enzymatique est étudié et déterminé par la mesure du temps de flocculation à différentes températures d'incubation (de 30 à 65 °C), avec un intervalle de 5 °C et un pH de 6,6.

1/ Effet de la température sur l'activité coagulante de la pepsine de poulet

La variation du temps de flocculation du lait reconstituer par la pepsine en fonction de la température est présentée dans la figure 34.

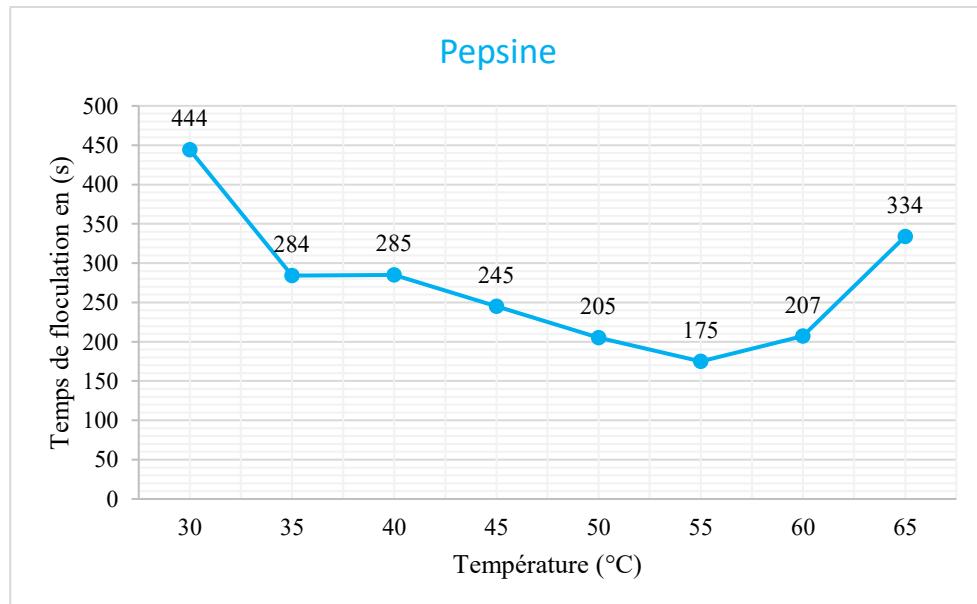


Figure 34 : Effet de la variation de la température sur la flocculation du lait par la pepsine.

Trois zones distinctes ont pu être identifiées en fonction de l'évolution du temps de flocculation et de l'activité coagulante. La première zone, située entre 30 °C et 35 °C, a montré des temps de flocculation relativement élevés (de 444 s à 284 s), traduisant une activité coagulante encore faible, allant de 0,23 à 0,30 UP. Dans la deuxième zone, correspondant à l'intervalle de température de 40 °C à 55 °C, une diminution progressive du temps de flocculation (de 285 s à 175 s) est observée, accompagnée d'une augmentation nette de l'activité coagulante, avec un pic de 0,57 UP enregistré à 55 °C. Enfin, dans la troisième zone, au-delà de 60 °C, le temps de flocculation a de nouveau augmenté (207 s à 60 °C et 334 s à 65 °C), ce qui s'est traduit par une baisse de l'activité enzymatique, tombant à 0,48 puis à 0,30 UP. Cette perte d'efficacité est probablement liée à une dénaturation thermique de la pepsine.

Dans nos conditions expérimentales, les résultats obtenus ont confirmé que l'activité enzymatique de la pepsine de poulet est fortement influencée par la température. Celle-ci est augmenté avec l'élévation thermique jusqu'à un seuil optimal de 55 °C, au-delà duquel une diminution progressive de l'activité est constatée. L'activité coagulante maximale est atteinte à 55 °C, avec un temps de flocculation de 175 s correspondant à 0,57 UP.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Aouissi et Brinet (2016)**, qui ont observé une activité optimale à 55 °C sur le substrat de Berridge. **Krid (2013)** a également indiqué un intervalle optimal situé entre 50 °C et 65 °C, soulignant une efficacité particulière de l'enzyme dans cette plage pour la coagulation du lait. Ces observations concordent avec celles de **Gordin et Rosenthal (1977)**, qui ont situé l'activité maximale entre 45 °C et 55 °C, ainsi qu'avec les travaux de **Cogan et ces collaborateurs (1982)**, qui ont rapporté une température optimale avoisinant 55 °C pour la pepsine de poulet. Cette efficacité pourrait être attribuée à un dépliement partiel de la structure tridimensionnelle du substrat, facilitant l'accès de l'enzyme à ses sites catalytiques et accélérant la phase enzymatique du processus coagulant.

Amari et Akil (2022) ont également confirmé une activité élevée de la pepsine entre 50 °C et 60 °C, suivie d'une chute marquée au-delà de 65 °C. Des données similaires ont été rapportées par **Adoui (2007)**, qui a signalé une inactivation progressive de l'enzyme à partir de cette température. Toutefois, **Bentaila et Hamel (2024)** ont estimé que la température optimale de coagulation se situe entre 45 °C et 50 °C, tandis que **Nouani et ces collaborateurs (2011)**, ont observé une inactivation totale de la pepsine dès 55 °C, indiquant une variabilité possible liée à la méthode ou à l'origine enzymatique.

2/ Influence de la température sur l'activité coagulante de la ficine

Les variations du temps de flocculation du lait reconstituer par la ficine en fonction de la température sont représentées dans la figure 35.

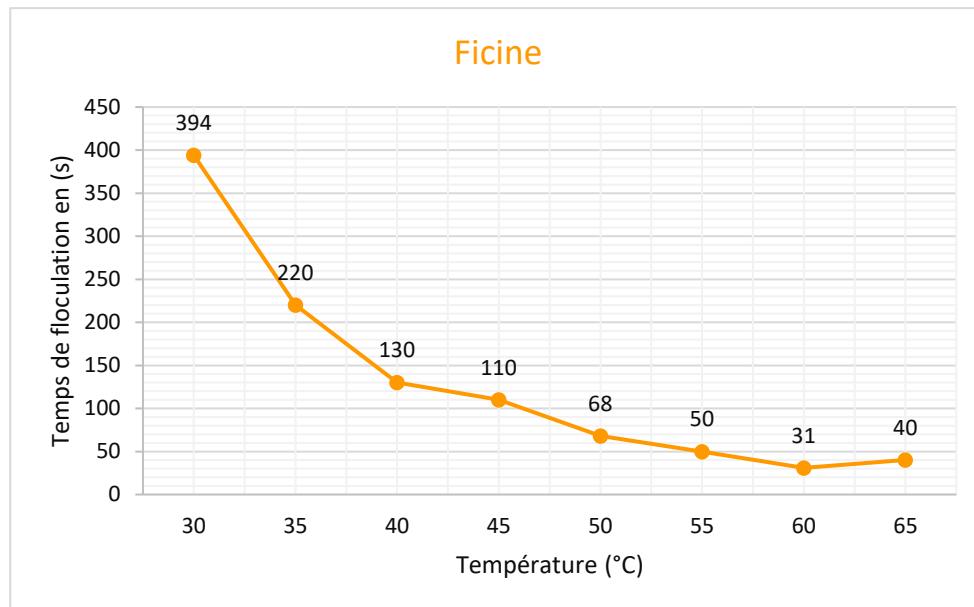


Figure 35 : Effet de la variation de la température sur la flocculation du lait par la ficine

Une nette diminution du temps de flocculation est observée entre 30 °C (394 s, soit 0,25 UP) et 60 °C (31 s, soit 3,23 UP), traduisant une augmentation progressive de l'activité coagulante de la ficine. L'activité maximale est atteinte à 60 °C. Au-delà de cette température, une légère augmentation du temps de flocculation est enregistrée à 65 °C (40 s, soit 2,5 UP), suggérant un début d'inactivation thermique de l'enzyme. Ces résultats ont mis en évidence une excellente efficacité coagulante de la ficine ainsi qu'une bonne stabilité thermique jusqu'à 60 °C.

Ces observations sont en accord avec celles rapportées par plusieurs auteurs. **Devaraj et ces collaborateurs (2008)**, ainsi que **Sugiura et Sasaki (1974)**, ont observé une activité enzymatique maximale de la ficine dans un intervalle de température compris entre 50 °C et 65 °C. Des résultats similaires ont également été rapportés par **Fadıloğlu (2001)** et **Gagaoua et ces collaborateurs (2014)**, qui ont situé l'optimum d'activité coagulante autour de 60 °C.

3/ Effet de la température sur l'activité coagulante de la cardosine

Les variations du temps de flocculation du lait reconstituer par la cardosine en fonction de la température sont présentées dans la figure 36.

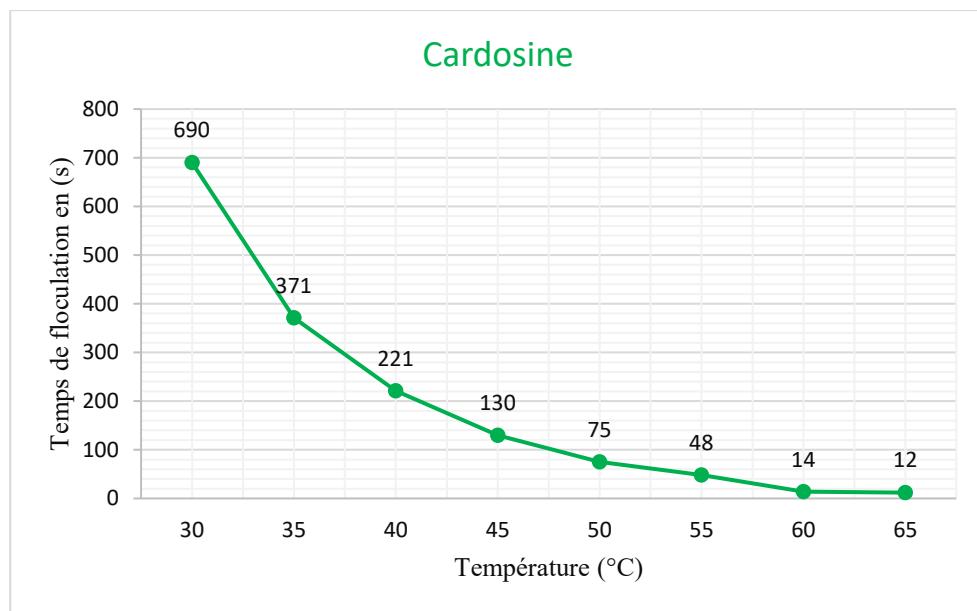


Figure 36 : Effet de la variation de la température sur la flocculation du lait par la cardosine.

La courbe obtenue est mise en évidence une amélioration progressive de l'activité coagulante de la cardosine avec l'élévation de la température. Le temps de flocculation a diminué de manière régulière, passant de 690 s à 30 °C (soit 0,14UP) à un minimum de 12 s à 65 °C (soit 8,33UP), traduisant ainsi une nette augmentation de l'efficacité enzymatique. Cette évolution continue, sans manifestation d'inactivation thermique, est suggéré que la cardosine conserve une grande stabilité et atteint son activité maximale à haute température.

Les résultats obtenus ont montré que l'activité coagulante de la cardosine est fortement influencée par la température, avec un optimum marqué à 65 °C. Ce résultat s'est révélé proche de celui rapporté par **Zikiou (2024)**, qui a observé une activité coagulante maximale à 60 °C pour l'extrait brut de fleurs de cardon. Ces observations sont également en accord avec les travaux de **Roseiro et ces collaborateurs (2003)**, **Sidrach et ces collaborateurs (2005)**, **Chazzarra et ces collaborateurs (2007)**, ainsi que **Claverie et Hernandez (2007)**, qui ont souligné que les protéases d'origine végétale présentent généralement une thermo stabilité élevée, avec des températures optimales d'activité nettement supérieures à celles des enzymes d'origine animale.

2/ Influence de la température sur l'activité coagulante de la présure

Les variations du temps de flocculation du lait reconstituer par la présure en fonction de la température sont présentées dans la figure 37.

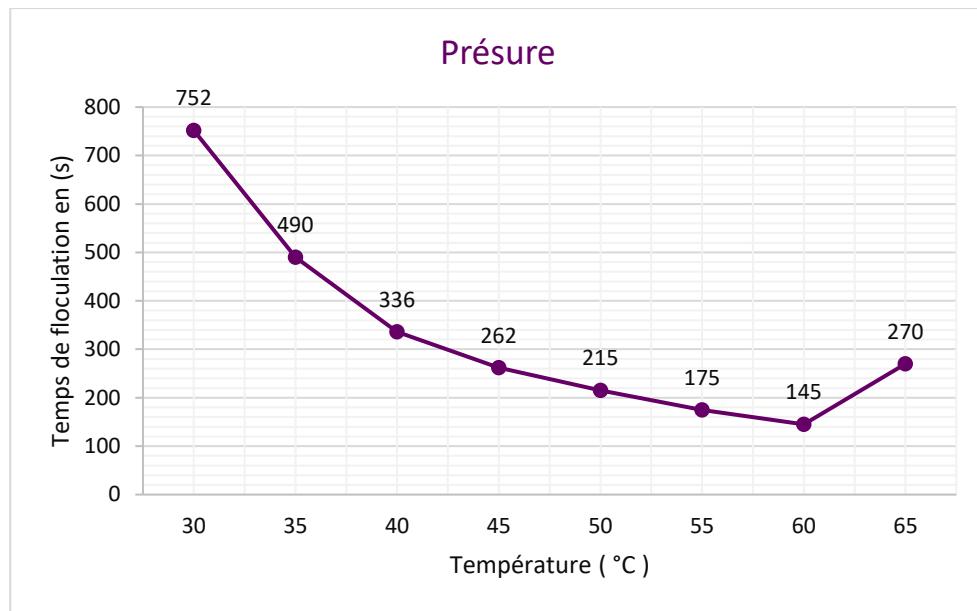


Figure 37 : Effet de la variation de la température sur la flocculation du lait par la présure.

Une diminution progressive du temps de flocculation est observée entre 30 °C (752 s, soit 0,13 UP) et 60 °C (145 s, soit 0,69 UP), indiquant une augmentation régulière de l'activité coagulante de la présure. Toutefois, à 65 °C, le temps de flocculation a de nouveau augmenté pour atteindre 270 s (soit 0,37 UP), traduisant une baisse notable de l'activité enzymatique, probablement liée à un début de dénaturation thermique.

Dans nos conditions expérimentales, la température optimale de la présure est déterminée à 60 °C, à laquelle l'enzyme est atteint sa meilleure performance. **Krid (2013)** a également indiqué un intervalle optimal de température situé entre 50 °C et 65 °C. La diminution d'activité enregistrée au-delà de cette plage est vrai semblablement due à une dénaturation partielle de l'enzyme, un phénomène bien documenté dans la littérature.

Selon **Lucey (2002)**, la température optimale de coagulation de la présure est d'environ 45 °C à pH 6,6, avec une augmentation du taux d'agrégation des micelles jusqu'à un seuil au-delà duquel l'enzyme perd progressivement sa stabilité. Par ailleurs, les travaux de **Gordin et Rosenthal (1977)** ont montré que l'activité coagulante maximale de la pepsine de poulet et de la présure est atteinte dans un intervalle compris entre 45 °C et 55 °C.

5/ Comparaison de l'effet de la température sur l'activité coagulante des enzymes

L'analyse comparative de l'effet de la température sur l'activité coagulante des quatre enzymes révèle des différences marquées en termes d'efficacité et de stabilité thermique (figure 38).

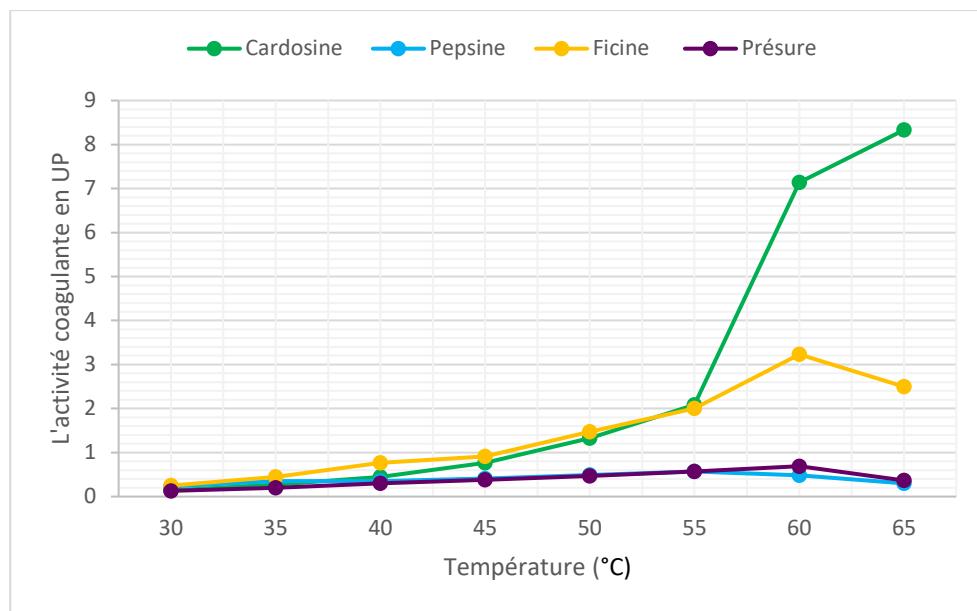


Figure 38 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de la pepsine, ficine, cardosine, présure.

L'effet de la température sur l'activité coagulante montre des différences notables entre les extraits enzymatiques étudiés. La cardosine présente une nette augmentation de son activité avec la température, atteignant un maximum à 65 °C avec un temps de flocculation très court de 12 s, correspondant à une activité de 8,33 UP. La ficine atteint son optimum à 60 °C, avec un temps de flocculation de 31 s, soit une activité coagulante de 3,23 UP. La pepsine montre une activité maximale à 55 °C, avec un temps de flocculation de 175 s, équivalant à 0,57 UP, avant de décroître à des températures plus élevées. Quant à la présure, son activité coagulante reste faible tout au long de la gamme de température, avec un maximum observé à 60 °C temps de flocculation de 145 s, soit 0,69 UP, ce qui indique une efficacité modérée dans ces conditions.

2.2.6.2 Influence du pH

L'effet du pH du lait (substrat de Berridge) sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques a été étudié en mesurant le temps de flocculation à différentes valeurs de pH. Le pH du lait est ajusté aux valeurs suivantes : 5,5 ; 6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5 et 8,0. La température d'incubation a été fixée à 30 °C.

1/ Influence du pH sur l'activité coagulante de la pepsine

Les variations du temps de flocculation du lait reconstitué par la pepsine en fonction du pH sont présentées dans la figure 39.

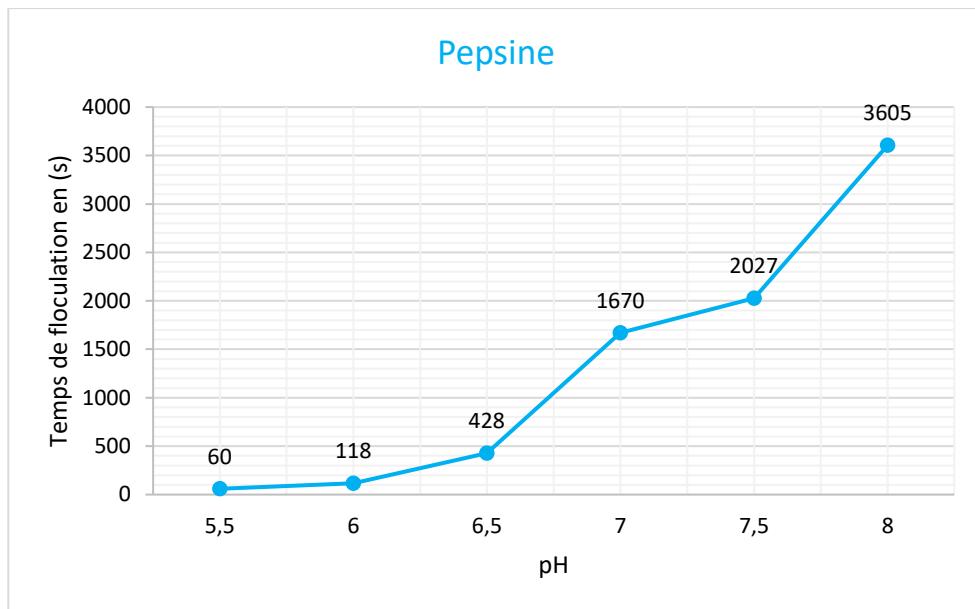


Figure 39 : Effet de la variation du pH sur la flocculation du lait par la pepsine

La courbe obtenue est montrée que l'activité coagulante de la pepsine de poulet a diminué fortement avec l'augmentation du pH. À pH 5,5, l'activité maximale est enregistrée avec un temps de flocculation de 60 s, correspondant à 1,66 UP. À mesure que le pH est augmenté, le temps de flocculation s'est allongé, atteignant 3605 s à pH 8,0, soit une activité très faible de 0,03 UP. Ces résultats ont confirmé que la pepsine est particulièrement active en milieu acide, mais qu'elle perd progressivement son efficacité à mesure que le milieu devient neutre ou basique.

Ces observations sont en accord avec les travaux de **Gordin et Rosenthal (1977)**, qui ont montré que la diminution du pH du substrat entraîne un raccourcissement significatif du temps de coagulation. **Bentaila et Hamel (2024)**, ont également rapporté une activité maximale de 0,77 UP à pH 5,5. De leur côté, **Aouissi et Brinat (2016)** ont trouvé un pH optimal de 5,8 pour l'activité coagulante de la pepsine de poulet. **Amari et Akil (2022)** ont observé une activité maximale de 40 UP à pH 5,0, suggérant que ce pH représente l'optimum pour la pepsine de volaille. **Adoui (2007)**, quant à lui, a souligné que la pepsine est d'autant plus active que le pH est bas.

Par ailleurs, **Gordin et Rosenthal (1978)**, ainsi que **El-Abbassy et Wahba (1988)**, ont également mis en évidence l'effet favorable d'un abaissement du pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine de poulet, renforçant ainsi nos observations expérimentales.

2/ Effet du pH sur l'activité coagulante de la ficine

Les variations du temps de flocculation du lait reconstituer par la ficine en fonction du pH sont présentées dans la figure 40.

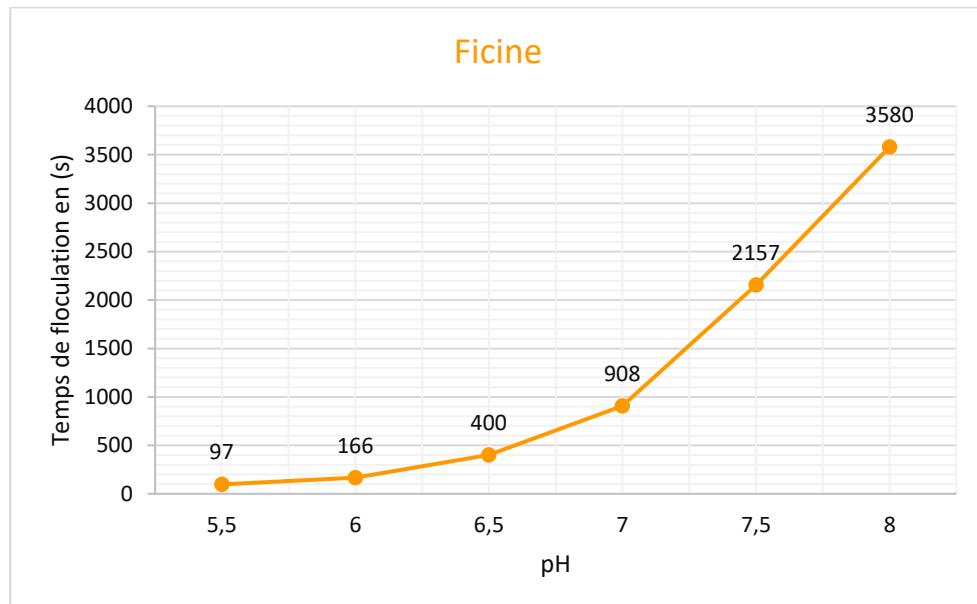


Figure 40 : Effet de la variation du pH sur la flocculation du lait par la ficine.

Lorsque le pH est augmenté de 5,5 à 8,0, le temps de flocculation s'est allongé de manière significative, traduisant une diminution progressive de l'activité coagulante de la ficine. Le temps de flocculation le plus court est observé à pH 5,5 (97 s), avec une activité maximale de 1,03 UP, indiquant que le pH optimal se situe à cette valeur. Au-delà de ce seuil, une baisse marquée de l'activité est constatée : 166 s à pH 6,0 (0,60 UP), 400 s à pH 6,5 (0,25 UP), jusqu'à 3580 s à pH 8,0, où l'activité coagulante est devenue très faible (0,03 UP).

Dans nos conditions expérimentales, l'optimum d'activité coagulante est atteint à pH 5,5. Ce résultat est en accord avec celui rapporté par **Bentaila et Hamel (2024)**, qui ont également observé un optimum à pH 5,5, avec une activité de 98,18 UP. D'autres auteurs, tels que **Fadıloğlu (2001)**, **Nouani et ces collaborateurs (2009)** et **Siar (2014)**, ont également estimé que le pH optimal pour l'activité coagulante de la ficine se situe autour de 5.

L'optimum observé à pH 5,5 suggère que la ficine est plus efficace en milieu légèrement acide. En effet, la baisse du pH favorise l'affinité de l'enzyme pour les micelles de caséine, ce qui accélère la vitesse de la réaction enzymatique (**Fadıloğlu, 2001**).

3/ Effet du pH sur l'activité coagulante de la cardosine

Les variations du temps de flocculation du lait reconstituer par la cardosine en fonction du pH sont présentées dans la figure 41.

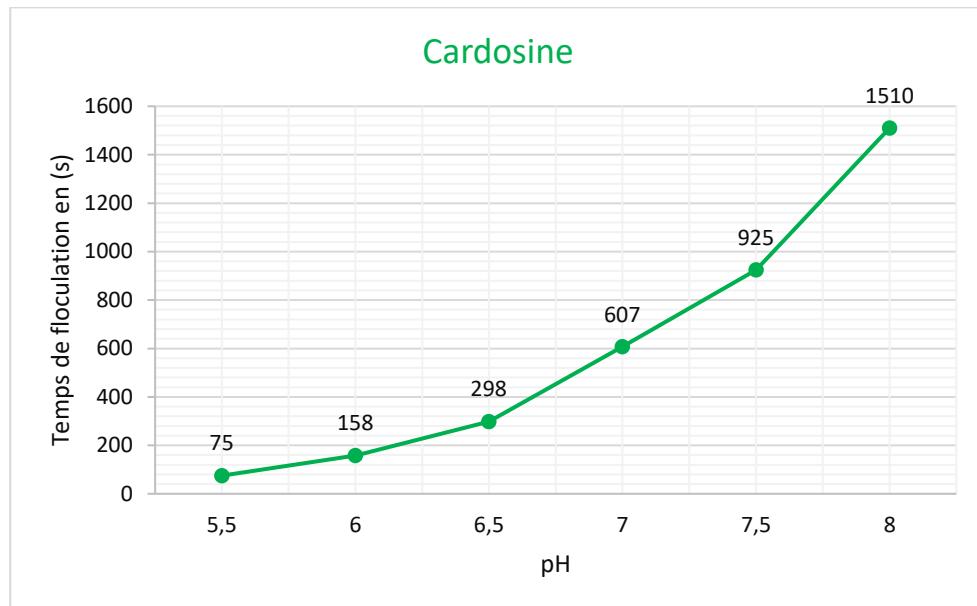


Figure 41 : Effet de la variation du pH sur la flocculation du lait par la cardosine.

L'analyse de la courbe est montrée une diminution nette de l'activité coagulante de la cardosine avec l'élévation du pH, traduisant une perte progressive d'efficacité enzymatique. En effet, le temps de flocculation est augmenté de manière régulière, passant de 75 s à pH 5,5 (soit 1,33 UP) à 1510 s à pH 8,0 (soit 0,06 UP). Le pH optimal est identifié à 5,5, valeur à laquelle l'activité coagulante est atteinte son maximum.

Ces résultats ont confirmé que la cardosine est plus active en milieu acide, avec un optimum clairement observé à pH 5,5. Ces observations sont très proches de celles rapportées par **Zikiou (2024)**, qui a mis en évidence une activité coagulante maximale de l'extrait brut de fleurs de cardon à pH 5. Par ailleurs, **Claverie et Hernandez (2007)**, ont montré que les enzymes d'origine végétale extraites du cardon conservent leur efficacité dans des milieux acides, notamment dans une plage de pH comprise entre 3 et 5.

4/Effet du pH sur l'activité coagulante de la présure

Les variations du temps de flocculation du substrat de Berridge par la présure en fonction du pH sont illustrées dans la figure 42.

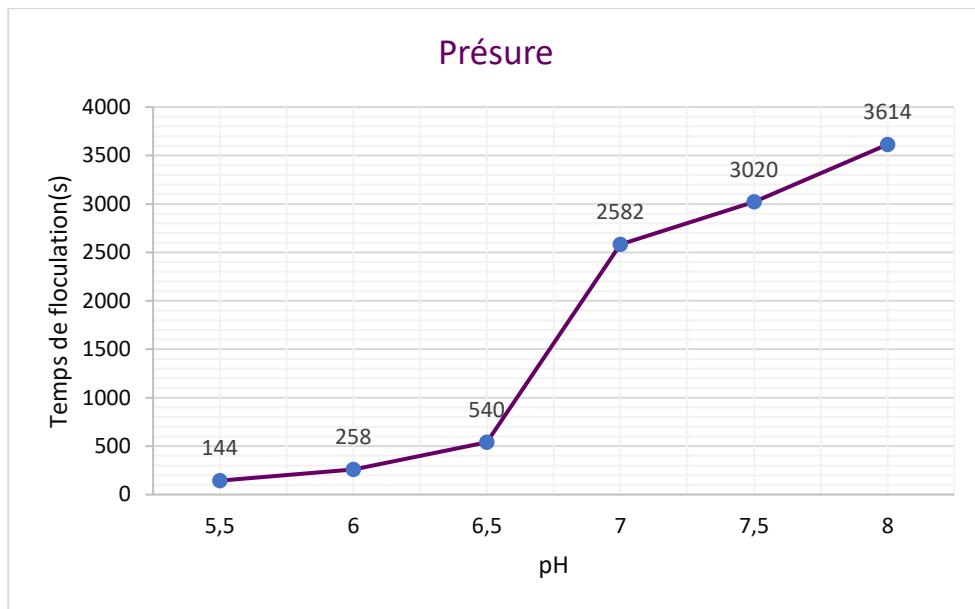


Figure 42 : Effet de la variation du pH sur la flocculation du lait par la présure.

L’activité coagulante de la présure est maximale en milieu acide, avec un temps de flocculation minimal enregistré à pH 5,5 (144 s, soit 0,69 UP). À mesure que le pH est augmenté, l’efficacité de l’enzyme est diminuée progressivement, atteignant un temps de flocculation de 3614 s à pH 8,0, ce qui correspond à une activité très faible de 0,03 UP.

Dans notre étude, l’extrait enzymatique de la présure est montré une activité coagulante optimale en milieu acide, ce qui est en parfait accord avec les résultats de **Kherbouche-Belkacemi (2019)**, qui a rapporté une efficacité maximale à pH 5,5, suivie d’une forte diminution au-delà de pH 7. En revanche, **Krid (2013)** a situé l’optimum de pH de la présure dans une plage légèrement plus élevée, entre 6,2 et 6,6.

Par ailleurs, plusieurs auteurs, tels que **Castillo et ces collaborateurs (2000)**, **Lucey (2002)** et **Mishra et ces collaborateurs (2005)**, ont indiqué que le pH optimal de l’action de la présure sur le lait se situe autour de 6,0, ce qui confirme que la présure est plus performante dans un environnement légèrement acide.

5/ Comparaison de l’effet du pH sur l’activité coagulante des enzymes

L’analyse comparative de l’effet du pH sur l’activité coagulante des quatre enzymes (la pepsine de poulet, la ficine, la cardosine et la présure) es révélé que leur efficacité dépend fortement de l’acidité du milieu. Pour l’ensemble des extraits testés, une activité coagulante maximale est observée en conditions acides, notamment autour de pH 5,0 à 5,5. Au-delà de cette zone, une diminution progressive de l’activité est enregistrée, accompagnée d’un allongement significatif des temps de flocculation (figure 43).

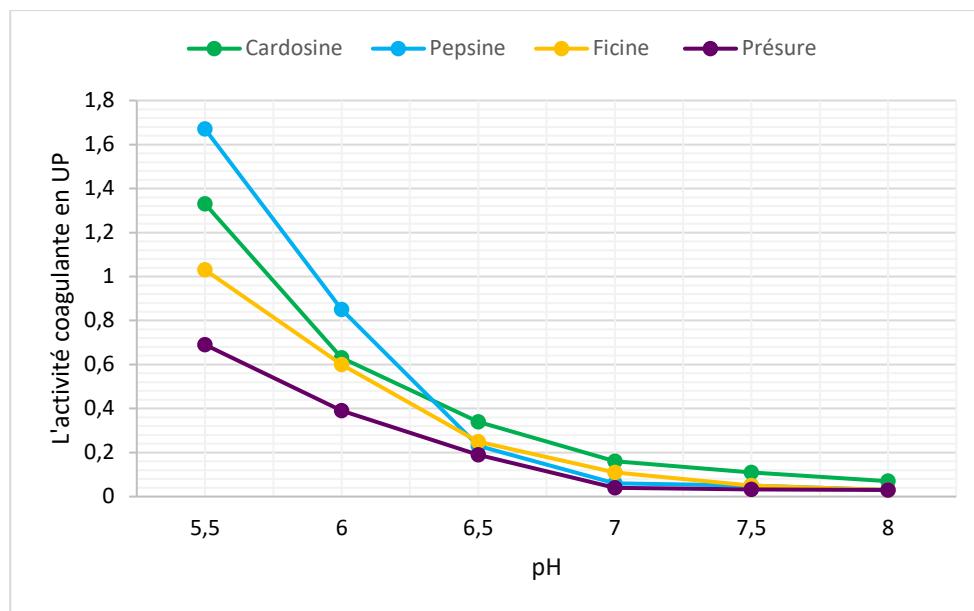


Figure 43 : Influence de la variation du pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine, ficine, cardosine, présure.

La pepsine, la cardosine, la ficine et la présure ont toutes présenté une activité optimale à pH 5,5 avec une activité coagulante respectivement (1,67UP), (1,33UP), (1,03UP) et (0,69UP) confirmant ses fortes affinités pour les milieux acides. Ces résultats confirment que les enzymes d'origine animale végétale (ficine, cardosine), la pepsine et la présure, partagent une sensibilité commune à l'alcalinité, bien que les enzymes végétales conservent parfois une activité résiduelle à des pH plus élevés.

Ainsi, il ressort que l'environnement acide est favorable à l'activité coagulante des quatre enzymes étudiées, ce qui souligne l'importance du contrôle du pH dans les applications technologiques de la coagulation enzymatique du lait.

2.2.6.3 Influence de la concentration en CaCl_2

L'effet de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques est étudié en mesurant le temps de flocculation du lait reconstituer à différentes concentrations en CaCl_2 (0,008 ; 0,01 ; 0,015 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 M). La température d'incubation est fixée à 30 °C et le pH à 6,6.

1/ Influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de la pepsine

Les variations du temps de flocculation du substrat de Berridge par la pepsine en fonction de la concentration en chlorure de calcium sont présentées dans la figure 44.

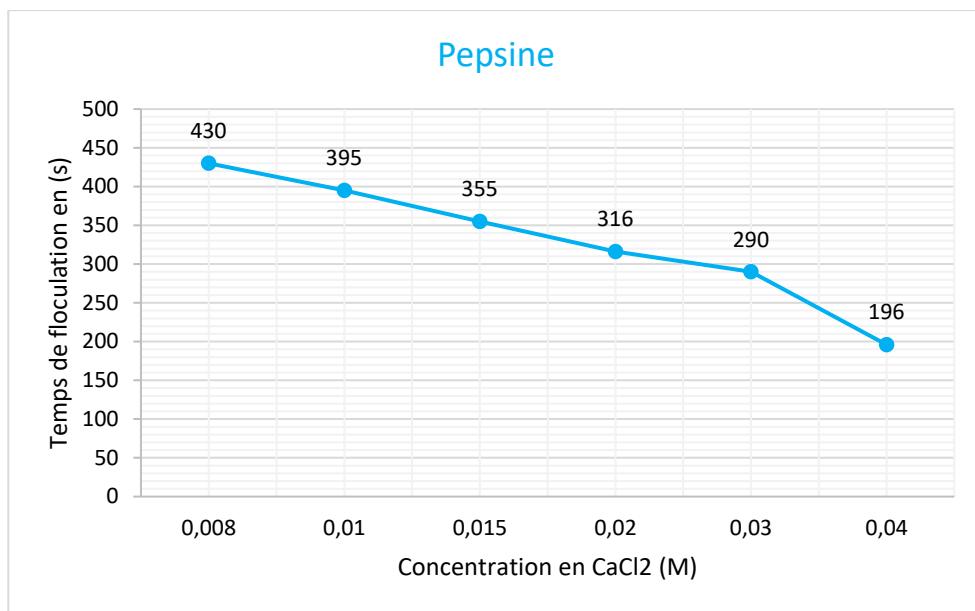


Figure 44 : Effet de la concentration en CaCl_2 sur le temps de flocculation du lait par la pepsine.

Une diminution progressive du temps de flocculation est observée avec l'augmentation de la concentration en CaCl_2 , passant de 430 s à 0,008 M (soit 0,23 UP) à 196 s à 0,04 M (soit 0,51 UP). Cette tendance a mis en évidence une amélioration constante de l'activité enzymatique, traduisant une meilleure efficacité de la pepsine en présence de calcium. En facilitant l'agrégation des micelles de caséine, le CaCl_2 a réduit le temps nécessaire à la formation du caillé. L'activité coagulante maximale est atteinte à 0,04 M, où le temps de flocculation le plus court (196 s) correspondait à une activité de 0,51 UP.

Ce comportement a également été observé par **Bentaila et Hamel (2024)**, qui ont mis en évidence une augmentation progressive de l'activité coagulante de la pepsine de poulet en fonction de la concentration en CaCl_2 , avec un optimum à 0,04 M. **Gordin et Rosenthal (1977)**, ont souligné que l'activité coagulante enzymatique dépend directement de la concentration en calcium, et que des teneurs élevées en CaCl_2 réduisent significativement le temps de coagulation tout en augmentant l'efficacité enzymatique. Il a été démontré que l'activité de la pepsine de poulet, tout comme celle de la présure, est fortement stimulée dans une plage de concentrations comprise entre 0,015 M et 0,025 M.

Cependant, à faibles concentrations, l'activité coagulante de la pepsine semble plus inhibée que celle de la présure. Cet effet pourrait être lié à une élévation locale du pH du substrat induite par le CaCl_2 . **Nöel et ces collaborateurs (1989)**, ont précisé que l'ajout

de CaCl_2 , même sans modification apparente du pH, n'influence pas directement l'hydrolyse enzymatique, mais qu'il accélère l'étape d'agrégation des micelles, intervenant ainsi dans la phase secondaire de la coagulation.

De nombreux auteurs (**Tarodo de la Fuente et Alais, 1975** ; **Gastaldi et al., 1994** ; **Lucey, 2002** ; **Nájera et al., 2002** ; **Lagaude et al., 2004**) ont confirmé que le calcium réduit le potentiel de surface des micelles, diminue les forces de répulsion électrostatique entre elles, et favorise la formation d'un gel ferme par l'établissement de ponts calciques entre les chaînes de caséines.

Toutefois, **Baumy et Brulé (1986)**, ainsi que **McMahon est ces collaborateurs (1984)**, ont signalé qu'un excès de calcium ($> 0,1 \text{ M}$) peut avoir un effet inhibiteur sur la coagulation, en saturant la surface des micelles, ce qui empêche la formation d'un réseau stable.

1/ Influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de la ficine

Les variations du temps de flocculation du lait reconstituer par la ficine en fonction de la concentration en CaCl_2 sont présentées dans la figure 45.

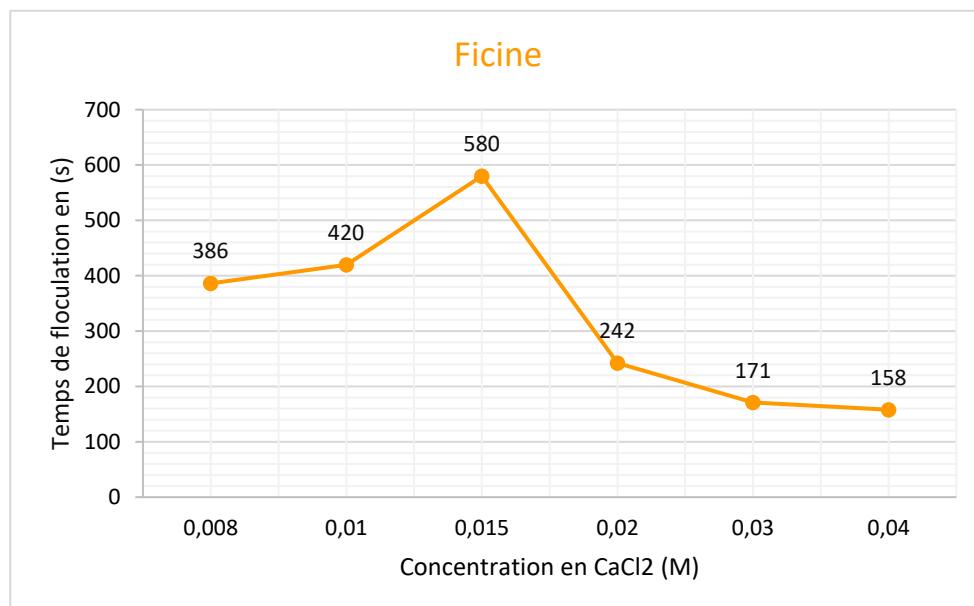


Figure 45 : Effet de la concentration en CaCl_2 sur le temps de flocculation du lait par la ficine.

Une augmentation du temps de flocculation est observée jusqu'à une concentration de $0,015 \text{ M}$ en CaCl_2 , atteignant 580 s (soit $0,17 \text{ UP}$), ce qui traduit une inhibition temporaire de l'activité enzymatique. Au-delà de cette concentration, le temps de flocculation est diminué nettement, et l'activité coagulante s'est progressivement améliorée pour atteindre $0,63 \text{ UP}$ à

0,04 M (158 s). Ces résultats suggèrent que de faibles concentrations de CaCl_2 ne permettent pas de stabiliser suffisamment les micelles de caséine, tandis qu'une concentration plus élevée ($\geq 0,02 \text{ M}$) favorise efficacement l'agrégation et accélère le processus de coagulation enzymatique par la ficine.

Cette tendance est en accord avec les observations de **Bentaila et Hamel (2024)**, qui ont mis en évidence une augmentation progressive de l'activité coagulante de la ficine avec la concentration en chlorure de calcium, atteignant un optimum de 143,15 UP à 0,04 M. Toutefois, cette valeur est supérieure à celle rapportée par **Nouani, Dako et ces collaborateurs (2009)**, qui ont estimé l'optimum à 0,02 M. **Kherbouche-Belkacemi (2019)** a également confirmé que l'ajout de CaCl_2 améliore l'activité coagulante de la ficine brute, avec une efficacité maximale observée à 0,05 M.

Par ailleurs, **Flüeler et Puhan (1978)**, ainsi que **Gastaldi et ces collaborateurs (1994)**, ont souligné que l'ajout de CaCl_2 induit une baisse du pH local, ce qui favorise l'agrégation des micelles de caséine et contribue à l'amélioration du processus de coagulation.

Dans nos conditions expérimentales, la concentration optimale de CaCl_2 pour l'activité coagulante de la ficine brute est identifiée à 0,04 M, correspondant à un temps de floculation réduit (158 s) et à une activité coagulante de 0,63 UP, traduisant un bon pouvoir coagulant dans ces conditions.

3/ Influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de la cardosine

Les variations du temps de floculation du lait reconstituer par la cardosine en fonction de la concentration en CaCl_2 sont représentées dans la figure 46.

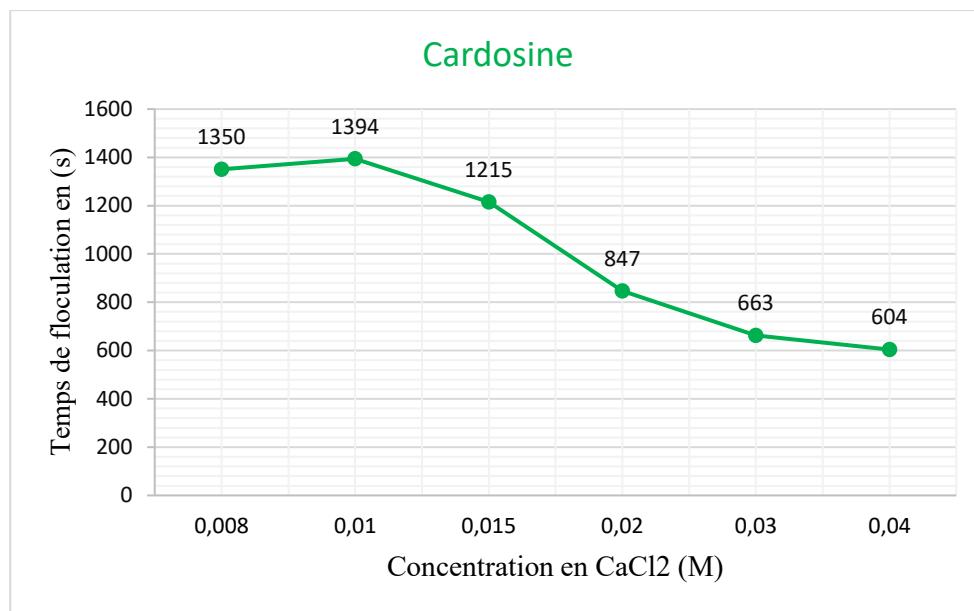


Figure 46 : Effet de la concentration en CaCl_2 sur le temps de flocculation du lait par la cardosine.

L'analyse des résultats est montrée une amélioration progressive de l'activité coagulante de la cardosine avec l'augmentation de la concentration en chlorure de calcium. Le temps de flocculation est diminué de 1350 s à 0,01 M (soit 0,07 UP) à 604 s à 0,04 M (soit 0,17 UP), traduisant une activité enzymatique plus élevée. L'activité la plus faible est observée aux concentrations comprises entre 0,008 M et 0,015 M, où les temps de flocculation sont restés supérieurs à 1200 s, indiquant une faible efficacité coagulante.

Ces résultats ont mis en évidence que la cardosine devient nettement plus active à partir d'une concentration de 0,02 M, et que la concentration optimale en CaCl_2 , dans les conditions expérimentales de cette étude, a été atteinte à 0,04 M.

Ce comportement diffère de celui rapporté par **Zikiou (2024)**, qui a constaté une activité coagulante maximale de l'extrait brut de fleurs de cardon à une concentration plus faible, soit 0,02 M de CaCl_2 . Cette différence pourrait être liée à des variations dans les conditions d'extraction, de substrat ou de température appliquées dans les deux études.

4/ Influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de la présure

Les variations du temps de flocculation du lait reconstituer par la présure en fonction de la concentration en CaCl_2 sont illustrées dans la figure 47.

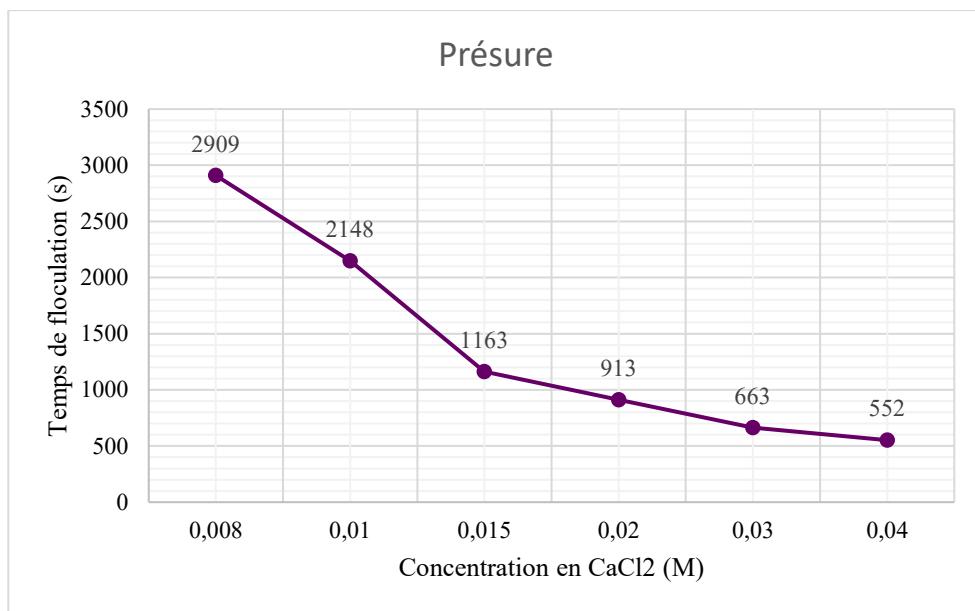


Figure 47 : Effet de la concentration en CaCl_2 sur le temps de floculation du lait par la présure.

L’augmentation progressive de la concentration en chlorure de calcium est entraînée une diminution marquée du temps de floculation, passant de 2909 s à 0,008 M (soit 0,03 UP) à 552 s à 0,04 M (soit 0,18 UP). Cette évolution est traduite une amélioration progressive de l’activité coagulante de la présure, le CaCl_2 joue un rôle essentiel dans l’agrégation des micelles de caséine. L’activité enzymatique est atteinte son maximum à 0,04 M, avec un temps de floculation minimal et une unité présure maximale, traduisant une efficacité optimale dans ces conditions expérimentales.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Kherbouche-Belkacemi (2019)**, qui a observé une augmentation significative de l’activité coagulante de la présure en fonction de la concentration en CaCl_2 . Plusieurs auteurs (**Balcones et al., 1996** ; **Montilla et al., 1995** ; **Storry et al., 1983** ; **Tervala et al., 1986**), ont également montré que l’addition d’ions Ca^{2+} réduit le temps de coagulation du lait présuré.

Selon **Gordin et Rosenthal (1977)**, l’activité coagulante enzymatique dépend directement de la concentration en chlorure de calcium. À des concentrations élevées, le CaCl_2 réduit efficacement le temps de coagulation et renforce l’activité enzymatique. Il a été démontré que l’activité de la présure, tout comme celle de la pepsine de poulet, est fortement accrue à des concentrations comprises entre 0,015 M et 0,025 M. Toutefois, à faibles concentrations, l’activité coagulante de la pepsine est plus inhibée que celle de la présure, un effet qui pourrait être lié à une élévation locale du pH du substrat induite par le CaCl_2 .

5/ Comparaison de l'effet du CaCl₂ sur l'activité coagulante des enzymes

L'analyse comparative de l'effet du CaCl₂ sur l'activité coagulante des enzymes pepsine, ficine, cardosine et présure est révélé que l'augmentation de la concentration en calcium améliore globalement l'efficacité coagulante de l'ensemble des extraits enzymatiques. Pour toutes les enzymes testées, une diminution progressive du temps de flocculation est observée entre 0,008 M et 0,04 M, traduisant une amélioration de leur activité (figure 48).

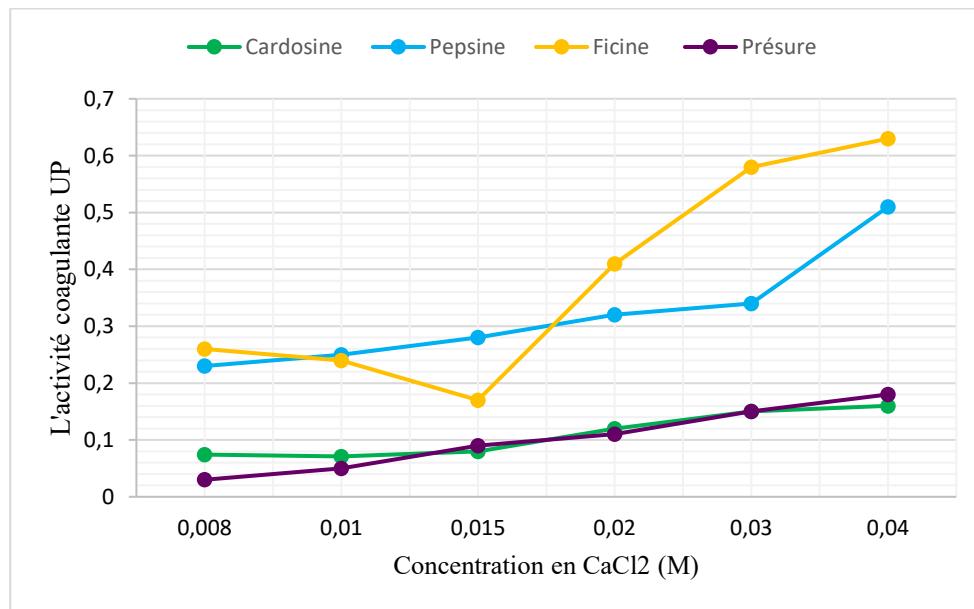


Figure 48 : Influence de la variation de concentration en CaCl₂ du lait sur l'activité coagulante de la pepsine, ficine, cardosine, présure.

L'augmentation de la concentration en CaCl₂ entraîne une élévation progressive de l'activité coagulante pour les quatre enzymes étudiées. La ficine montre la réponse la plus marquée, passant de 0,26 à 0,63 UP, traduisant une forte sensibilité au calcium. La pepsine suit une tendance croissante modérée (de 0,23 à 0,51 UP), avec un saut notable à 0,04 M. En comparaison, la présure et la cardosine présentent des activités plus faibles mais stables, atteignant respectivement 0,18 UP et 0,16 UP à la concentration maximale. Ces résultats soulignent l'effet activateur du CaCl₂ sur le pouvoir coagulant, particulièrement pour la ficine.

Dans notre étude, l'effet activateur du chlorure de calcium sur l'activité coagulante est clairement visible pour l'ensemble des enzymes, avec une réponse particulièrement marquée chez la ficine, qui atteint les niveaux d'activité les plus élevés. La pepsine montre également une bonne réactivité au calcium, tandis que la cardosine et la présure affichent une progression plus modérée mais constante. Ces résultats confirment le rôle crucial du CaCl₂

dans la stabilisation des micelles de caséine et l'activation des systèmes enzymatiques coagulants.

Conclusion :

Dans le cadre de la recherche de substituts enzymatiques à la présure commerciale pour des applications industrielles, cette étude s'est intéressée à l'évaluation du pouvoir coagulant de plusieurs enzymes d'origines diverses végétale (ficine et cardosine) et animale (pepsine de poulet).

L'objectif de cette étude est d'analyser les propriétés des trois agents coagulants extraits comparativement à la présure de référence. Pour ce faire, notre démarche méthodologique s'est articulée autour de deux étapes principales. La première a consisté en la collecte des matières premières riches en systèmes enzymatiques d'intérêt, suivie de l'extraction des enzymes coagulantes. La seconde étape a porté sur la caractérisation des extraits enzymatiques à travers la mesure de l'activité et de la force coagulante, la teneur en protéines, l'activité protéolytique, ainsi que la détermination des conditions optimales d'activité (pH, température et concentration en CaCl_2).

L'étude a permis de mettre en évidence les caractéristiques des enzymes analysées, à savoir :

L'extrait clarifié de pepsine avec une activité coagulante de 6,7 UP, un temps de flocculation d'environ 15 secondes et une force coagulante de 1/12000 UAC. La teneur en protéines est de 20,723 mg/ml, avec une activité protéolytique estimée à 9,06 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$.

L'extrait de ficine présente une activité coagulante élevée de 50 UP, un temps de flocculation très court d'environ 2 secondes, et une force coagulante équivalente à 1/12000 UAC. Sa teneur en protéines est de 20,72 mg/ml, et son activité protéolytique atteint 28,64 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$.

L'extrait de cardosine affiche une activité coagulante faible de 0,39 UP, un temps de flocculation long de 254 secondes et une force coagulante de 1/94,49 UAC. La teneur en protéines est de 10,26 mg/ml et son activité protéolytique est estimée à 2,02 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$.

La présure montre une activité coagulante modérée de 2,5 UP, un temps de flocculation de 40 secondes et une force coagulante de 1/600 UAC. Elle a une faible teneur en protéines (4,71 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mais une activité protéolytique de 2,16 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$.

Les résultats obtenus sur l'impact des variations de température, de pH et de la concentration en CaCl_2 sur la coagulation enzymatique sont très intéressants. En effet, le pH optimal de coagulation s'est avéré acide pour l'ensemble des enzymes testées est estimé à 5,5.

Concernant la température optimale de coagulation, des différences notables ont été observées : la coagulation induite par la pepsine atteint son maximum à 55 °C, tandis que celle de la présure et la ficine est optimale à 60 °C. Pour la cardosine, l'optimum est plus élevé est d'environ 65 °C. En ce qui concerne la concentration en chlorure de calcium (CaCl₂), l'ensemble des enzymes présentent un optimum commun, fixé à 0,04 M.

Pour conclure, les résultats obtenus sont particulièrement encourageants, car ils démontrent la possibilité de produire des extraits enzymatiques à partir de matières premières locales, encore peu exploitées, pouvant constituer une alternative viable à la présure commerciale dans l'industrie fromagère. Cette perspective reste conditionnée à l'adaptation des protocoles expérimentaux à une échelle semi-industrielle voire industrielle.

Dans le cadre des perspectives, il serait pertinent d'enrichir ce travail par des recherches complémentaires, notamment en explorant :

- L'optimisation des conditions d'extraction en vue d'améliorer le rendement.
- L'analyse des différents facteurs pouvant influencer le processus d'extraction enzymatique, afin d'en améliorer la qualité et l'efficacité.
- La purification des enzymes extraites, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles applications potentielles.
- L'utiliser de ces extraits enzymatiques dans la fabrication de différents types de fromages.

Les références bibliographiques

A

- Adoui F. (2007).** Extraction d'enzyme coagulant le lait à partir des proventricules de poulet. Mémoire Magister. Université Mentouri Constantine. 64p.
- Adoui, F., Boudefa, M., Bouguemra, B., & Boughellout, H. (2022).** Formulation de préparations fromagères à tartiner à base de cheddar et d'emmental. Revue des AFNOR. 1986. Contrôle de qualité des produits laitiers. Recueil de normes Françaises. Paris. Sciences et de la Technologie, 40, 63–69.
- Akar, B., & Fadiloglu, S. (1999).** Teleme production by purified ficin. *Journal of Food Quality*, 22, 671–680.
- Alais, C. (1974).** Science du lait : principes des techniques laitières. 3^e éd., 807p.
- Alais, C. (1984).** Science du Lait : Principes des Techniques Laitières. SEPAIC.
- Alamargot, J. (1982).** Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaires. Éditions du Point Vétérinaire.
- Amari, Rachida, & Akil, Wafa. (2022).** Extraction, caractérisation et immobilisation de la pepsine de volaille. Université A. Mira, Béjaïa.
- Amimour, M. (2019).** Essais d'optimisation des procédés de fabrication des fromages traditionnels de qualité (jben et klila). Thèse de doctorat, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis.
- 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. Lien source
- Anifantakis, E. M., & Kandarakis, J. G. (1983).** Use of bovine pepsin in the manufacture of Feta cheese from sheeps' milk. *Lait*, 63(632), 416–417.
- 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 Letters*, 88, 87–90.
- Archontoulis, S., Struik, P., Vos, J., & Danalatos, N. (2010).** Phenological growth stages of *Cynara cardunculus*: codification and description according to the BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 156, 253–270.
- Aouissi, Loubna Ilham & Brinet, Hanane. (2016).** Extraction de la pepsine à partir des proventricules des volailles et aptitude à la coagulation du lait. Mémoire Master, Université 8 Mai 1945 Guelma.

Azarkan, M., Matagn, A., Wattiez, R., Bolle, L., Vandenameele, J., & Baeyens-Volant, D. (2011). Selective and reversible thiol-pegylation, an effective... [Titre incomplet à compléter selon source originale].

Azzi, R. (2013). Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar.

B

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, 1993–1996.

Bayer, E., Buttler, K. P., & Finkinzeller, X. (1990). Guide de la flore méditerranéenne : Caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces. Éd. Neuchâtel, Suisse, 287p.

Beaudryet, M., Sylvie, C., & Julie, L. (2006). Biologie de l'allaitement : Le sein, le lait, le geste. Presses de l'Université du Québec, 570p.

Belitz, H. D., & Grosch, W. (1987). *Food Chemistry*. Springer-Verlag, 992p.

Ben Amira, A., Bauwens, J., De Pauw, E., Besbes, S., Attia, H., Francis, F., et al. (2017). Identification of proteins from wild cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.) by a proteomic approach. *Journal of Chemical Biology*, 10, 25–33.

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.

Bentaila, W., & Hamel, S. (2024). Évaluation, extraction et caractérisation des deux protéases : la pepsine du poulet et la ficine de figuier et leurs utilisations dans la coagulation du lait. Université Frères Mentouri Constantine 1.

Berridge, N. J. (1955). Purification and assay of rennin. In G.E. Perlmann & L. Lorand (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 2, pp. 69–77. Academic Press Inc., New York.

Bohak, Z. (1969). Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 4638–4642.

Bohak, Z. (1970). Chicken pepsinogen and chicken pepsin. In G.E. Perlmann & L. Lorand (Eds.), *Methods in Enzymology: Proteolytic Enzymes*, Vol. 19, pp. 347–358. Academic Press Inc., New York.

Boughellout, H. (2007). Coagulation du lait par la pepsine du poulet. Mémoire Magister, Université Mentouri Constantine, 69p.

Brulé, G. (1996). Adaptation des laits aux contraintes technologiques. In : CREAL. Quel(s) lait(s) pour demain ? ARILAIT-RECHERCHE, Paris, pp. 39–46.

Brulé, G., Lenoir, J., & Remeuf, F. (1997). La micelle de caséine et la coagulation du lait. In A. Eck & J.C. Gillis (Eds.), *Le Fromage* (3e éd., pp. 7–41). Lavoisier Tec & Doc, Paris, 891p.

C

Castillo, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., & Lopez, M.B. (2000). Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: Effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, 10, 551–562.

Cayot, P., & Lorient, D. (1998). Structures et techno-fonctions des protéines du lait. Paris : Tec & Doc, Lavoisier, 363 p.

Cecchinato, A., Penasa, M., Cipolat-Gotet, C., De Marchi, M., & Bittante, G. (2012). Short communication: Factors affecting coagulation properties of Mediterranean buffalo milk. *Journal of Dairy Science*, 95, 1709–1713.

Chaker, S. (1997). Figue/Figuier. In *Encyclopédie berbère*, IV (A164), pp. 472–533.

Chazarra, S., Sidrach, L., Lopez-Molina, D., & Rodriguez-Lopez, J.N. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17, 1393–1400.

Chawla, A., Kaur, R., & Sharma, A.K. (2012). *Ficus carica* L.; A review on its pharmacognostic, phytochemical and pharmacological aspects. *International Journal of Pharmaceutical and Phyto-pharmacological Research*, 1(4), 215–232.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L., & Lorient, D. (1985). Protéines alimentaires : Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle et modifications chimiques. Paris : Tec & Doc, Lavoisier, pp. 20–35.

Claverie-Martín, F., & Vega-Hernández, M.C. (2007). Aspartic proteases used in cheese making. In *Industrial Enzymes* (pp. 207–219). Springer.

Cogan, U., Kopelman, I.J., & Schab, R. (1982). Combined temperature and concentration effects on the clotting rate of chicken pepsin. *Journal of Dairy Science*, 65, 1130–1134.

Creamer, L.K. (2002). Casein nomenclature, structure and association properties. In *Encyclopedia of Dairy Science* (pp. 1895–1902). Elsevier Science Publishers.

D

Dahmoune, F., & Gouissem, C. (2018). Caractérisation organoleptique et rhéologique d'un fromage à pâte molle fabriqué à partir du lait de vache coagulé avec l'enzyme du Ficus carica L. Université Akli Mohand Oulhadj – Bouira.

Dahou, A., Medjahed, M., Aissaoui, C., & Homrani, A. (2021). Approche préliminaire sur la fromageabilité des laits collectés au niveau d'une fromagerie industrielle. *Revue Algérienne des Sciences*, 6(1), 34–39. <http://univ-eltarf.dz/fr/> – ISSN : 2661-7064.

Dalgleish, D.G. (1997). The enzymatic coagulation of milk. In P.F. Fox (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins* (pp. 579–619). Blackie and Son Ltd.

Dalgleish, D.G. (1998). Casein micelles as colloids: Surface, structure and stabilities. *Journal of Dairy Science*, 81, 3013–3018.

Dalgleish, D.G. (2007). The casein micelle and its reactivity. *Lait*, 87, 385–387.

Dalgleish, D.G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 449–467.

Dalgleish, D.G., & Holt, C. (1988). A geometrical model to describe the initial aggregation of partly renneted casein micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*.

Debry, G. (2001). Lait, nutrition et santé. Paris: Techniques et documentation Lavoisier, 544p.

De Kruif, C.G., Huppertz, T., Urban, V.S., & Petukhov, A.V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171, 36–52.

Devaraj, K., Gowda, L.R., & Prakash, V. (2008). An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry*, 69, 647–655.

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.

Di Pierro, G., O'Keeffe, 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.

Donta, S.T., & Van Vunakis, H. (1970). Chicken pepsinogens and pepsins: Their isolation and properties. *Biochemistry*, 9, 2791–2797.

Duarte, A.S., Pereira, A.O., Cabrita, A., Moir, A.J., Pires, E., & Barros, M.M. (2005). The characterisation of the collagenolytic activity of cardosin A demonstrates its potential application for extracellular matrix degradative processes. *Current Drug Discovery Technologies*, 2, 37–44.

Duarte, P., Figueiredo, R., Pereira, S., & Pissarra, J. (2006). Structural characterization of the stigma-style complex of *Cynara cardunculus* (Asteraceae) and immunolocalization of cardosins A and B during floral development. *Botany*, 84, 737–749.

E

Eck, A. (1990). El queso. Éd. Omega, Barcelone, Espagne.

Eck, A., & Gillis, J.-C. (1997). Le Fromage : de la science à l'assurance-qualité.

El-Abbassy, F. M., & Wahba, A. (1986). Milk clotting and proteolytic activities of chicken pepsin. *Journal of Dairy Science*, 69(5), 1204–1208.

El Khaloui, M. (2010). Valorisation de la figue au Maroc. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA. Transfert de Technologie en Agriculture*, 186, 1–4.

Espiard, E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Éd. Tec & Doc, France, pp. 259–265.

F

Fadıloğlu, S. (2001). Immobilization and characterization of ficin. *Food/Nahrung*, 45(2), 143–146.

Farkye, N. Y. (2004). Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 91–98.

Faro, C., Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Pissarra, J., Frazão, C., Costa, J., Lin, X.-L., Tang, J., & Pires, E. (1998). Structural and functional aspects of cardosins. In *Aspartic Proteinases* (pp. 423–433). Springer.

Faro, C.J., Veríssimo, P.C., Lin, Y., Tang, J., & Pires, E.V. (1995). In Takahashi, K. (Ed.), *Aspartic Proteinases: Structure, Function, Biology and Biomedical Implications*. New York: Plenum Press, pp. 373–377.

Feijoo-Siota, L., & Villa, T. G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1066–1088.

Fernandez-Lahore, H., Auday, R., Fraile, E., & Machalinski, C. (1998). Purification and characterisation of an acido proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. *Journal of Peptide Research*, 53, 599–605.

Fox, P.F. (1989). The milk protein system. In *Developments in Dairy Chemistry: Functional Milk Proteins* (pp. 1–53). Elsevier Science Publishers.

Fox, P.F., Singh, T.K., & McSweeney, P.L.H. (1994). Proteolysis in cheese during ripening. The Royal Society of Chemistry, 150, 1–31.

Fredot, E. (2005). Connaissance des aliments : bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Éd. Tec & Doc Lavoisier, 424p.

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.

Gastaldi, E., Pellegrini, O., Lagaude, A., & De La Fuente, B. T. (1994). Functions of added calcium in acid milk coagulation. *Journal of Food Science*, 59, 310–320.

Gaucheron, F., Famelart, M.H., Mariette, F., Raulot, K., Michel, F., & Legraet, Y. (1997). Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chemistry*, 59, 439–447.

Gonzalez-Rabade, N., Badillo-Corona, J.A., Aranda-Barradas, J.S., & Oliver-Salvador, M.D.C. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro: A review. *Biotechnology Advances*, 29, 983–996.

Gominho, J., Lourenço, A., Curt, M., Fernández, J., & Pereira, H. (2009). Characterization of hairs and pappi from *Cynara cardunculus* capitula and their suitability for paper production. *Industrial Crops and Products*, 29, 116–125.

Gordin, S., & Rosenthal, I. (1977). Efficacy of chicken pepsin as a milk-clotting enzyme. *Journal of Food Protection*, 41(9), 684–688.

Gordin, S., Rosenthal, I., Bernstein, S., Navrot, C., Balaban, N., & Frank, M. (1978). Chicken pepsin as a substitute for calf rennet in cheese production. XX International Dairy Congress, E, 441–442.

Green, M.L., & Llewellyn, 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.

Green, M.L., Valler, M.J., & Kay, J. (1984). Assessment of the suitability for cheddar cheese-making of purified and commercial chicken pepsin preparations. *Journal of Dairy Research*, 51, 331–340.

Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., & Wiczk, W. (2007). Cysteine proteases. In *Industrial Enzymes* (pp. 181–195). Springer.

H

Haard, N.F. (1992). Proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(1), 17–31.

Haesslein, D., & Oreiller, S. (2008). Fraîche ou séchée, la figue est dévoilée. HEDS Genève – Filière Nutrition et Diététique, 1–4.

Hafid, K. (2021). Attendrissement artificiel des viandes : le cas de l'utilisation de la pepsine du proventricule de poulet et de cystéines protéases de plantes purifiées par le système de répartition triphasique. Doctorat en Sciences, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Hashim, P., Ridzwan, M.M., & Bakar, J. (2014). Isolation and characterization of collagen from chicken feet. International Journal of Bioengineering and Life Sciences, 8, 250–254.

Hashem, A.M. (2000). Optimization of milk clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. Bioresource Technology, 70, 203–207.

Hsieh, J.F., & Pan, P.H. (2012). Proteomic profiling of the coagulation of milk proteins induced by chymosin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 2039–2045.

Huppertz, T., Upadhyay, V.K., Kelly, A.L., & Tamime, A.Y. (2006). Constituents and properties of milk from different species. In Brined Cheeses (pp. 1–42). 86. Jain, T., Dubey, D., Jain, V., & Dashora, K. (2011). Regulatory Status of Traditional Medicines in Different Countries: An Overview. Research Journal of Pharmacy and Technology, 4(7), 1007–1015.

J

James, M. N. (2012). Aspartic proteinases: retroviral and cellular enzymes (Vol. 436). Springer Science & Business Media.

Janhøj, T., & Qvist, K. (2010). The formation of cheese curd. In Technology of cheesemaking, pp. 130–165. Wiley Online Library.

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. Lait, 62(612), 75–86.

Jean, B. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier.

Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P., & Brulé, G. (2008). Les produits laitiers. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, 185 p.

Jeantet, R., Croguennec, T., Garric, G., & Brulé, G. (2017). Initiation à la technologie laitière. Editions Tec & Doc, Lavoisier.

Jeddi, L. (2009). Valorisation des figues de Taounate : Potentiel. Mode et stratégies proposées. Thèse pour l'avancement de grade, Ingénieur d'Etat, p. 29.

Joseph, J., & Raj, S. J. (2011). Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn: An overview. Research, 3, 08–12.

K

Kailasapathy, K. (2015). Chemical composition, physical, and functional properties of milk and milk ingredients. In *Dairy Processing and Quality Assurance*, pp. 77–105.

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.

Keenan, T. W., & Patton, S. (1995). The milk lipid globule membrane. In R. G. Jensen (Ed.), *Handbook of Milk Composition* (pp. 5–50). Academic Press.

Keim, S., & Hinrichs, J. (2003). Rheological characteristics of milk protein gels – Influence of stabilising bonds. 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure.

Kersten, A. (1937). Le lait, pp. 918–927.

Kim, J. S., Kim, Y. O., Ryu, H. J., Kwak, Y. S., Lee, J. Y., & Kang, H. (2003). Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant and Cell Physiology*, 44, 412–414.

Kortt, A. A., Hamilton, S., Webb, E. C., & Zerner, B. (1974). Ficins (E.C. 3.4.22.3). Purification and characterization of the enzymic components of the latex of *Ficus glabrata*. *Biochemistry*, 13, 2023–2028.

Krid, F. A. (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. Université des Frères Mentouri Constantine 1, I.N.A.T.A-A.

L

Lagaude, A., Fernandez, L., Cuq, J.L. & Marchesseau, S. (2004). Characterization of curd formation during the rennet coagulation of milk by an optical microscopic method. *International Dairy Journal*, 14, 1033–1039.

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, 195–213.

Lansky, E. & Paavilainen, H. (2011). *Figs: The genus Ficus.* Traditional herbal medicines for modern times. Taylor and Francis, New York.

Larbier, M., & Leclercq, B. (1992). Nutrition et alimentation des volailles. Ed. INRA, Paris, 355 p.

Lefebvre-Cases, E., Gastaldi, E., Vidal, V., Marchessau, S., Lagaude, A., Cuq, J.-L., & De La Fuente, B. T. (1998). Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. (Référence incomplète, à vérifier)

Leulmi, I. (2016). Hydrolyse enzymatique des caséines bovines par la Ficin et les cardosines en vue d'obtenir des peptides antimicrobiens.

Lenoir, J., Remeuf, F., & Schneid, N. (1997). L'aptitude du lait à la coagulation par la présure. In *Le Fromage*, 3ème édition, Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp. 229–256.

Levieux, D. (1999). Le colostrum, un lait particulièrement riche en nombreux composants : peut-on en déceler la présence dans les livraisons de lait de vache ? *Le Lait*, 79, 465–488.

Li, J., & Dalgleish, D. (2006). Mixed coagulation of milk: gel formation and mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4687–4695.

Li, Y., Du, W., Dai, L., & Liu, D. (2015). Kinetic study on free lipase NS81006-catalyzed biodiesel production from soybean oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 121, 22327.

Lim, T. K. (2012). Edible medicinal and non-medicinal plants: *Ficus carica*. Moraceae. Volume 3, Fruits. Springer Sciences Media B.V, pp. 362–376.

Lim, T. K. (2015). Edible medicinal and non-medicinal plants. Springer, New York.

Liu, Y., Zhang, Y., Guo, H., Wu, W., Dong, P., & Liang, X. (2016). Accelerated digestion of nucleic acids by pepsin from the stomach of chicken. *British Poultry Science*, 57, 674–681.

Lowe, G. (1976). The cysteine proteinases. *Tetrahedron*, 32, 291–302.

Lovisi, P., Jolivet, P., Jagic, F., Dalgleish, D., & Chardot, T. (2003). A protein kinase is located in the micellar fraction of fresh pasteurized skimmed farm milk. *Journal of Dairy Science*, 86, 1147–1156.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.

Lucey, J. A. (2003). CHEESE: Rennet coagulation of milk. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed.).

Luquet, M. (1985). Lait et produits laitiers. Vache, brebis, chèvre. 1. Les laits. De la mamelle à la laiterie. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 884 p.

M

Mahaut, M., Jeantet, R., & Brulé, G. (2000). Les produits industriels laitiers. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, pp. 26–40.

Mahaut, M., Jeantet, R., & Brulé, G. (2003). Initiation à la technologie fromagère. Paris, Tec & Doc Lavoisier, 194 p.

Mahaut, M., Jeantet, R., & Brulé, G. (2003). Initiation à la technologie fromagère. Technique et Documentation, Lavoisier, France, pp. 24–102.

Marchin, S., Putaux, J. L., Pignon, F., & Léonil, J. (2007). Effects of environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo-transmission electron microscopy and small-angle X-ray scattering/ultrasmall-angle X-ray scattering. *Journal of Chemical Physics*, 126, 045101–045110.

Martin, P., Collin, J. C., Carnot, P., Ribadeau-Dumas, B., & Mocquot, C. (1982). Méthode d'analyse quantitative des extraits de présure et de pepsine bovine. In *Utilisation des enzymes en technologie alimentaire*, Versailles, 5–7 mai. Ed. Dupuy P., Lavoisier Tec & Doc, pp. 287–292.

Mathieu, J. (1997). Initiation à la physicochimie du lait. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 220 p.

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.

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*, 19, 663–675.

Mekhaneg, B. (2002). Variation de la composition du lait en fonction de la race et de l'alimentation. Thèse de doctorat en sciences alimentaires, École Nationale Supérieure Agronomique El Harrach, Algérie. Lien vers source

Michael Eskin, N. A. (1990). Biochemistry of food. 2nd edition. Academic Press.

Mishra, R., Govindasamy-Lucey, S., & Lucey, J. A. (2005). Rheological properties of rennet-induced gels during the coagulation and cutting process: impact of processing conditions. *Journal of Texture Studies*, 36, 190–212.

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, 1908–1911.

Moussa, Yassemine. (2021). Évaluation de la coagulation des laits par des enzymes extraits d'origine animale et végétale. Master en Sciences, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Faculté des Sciences de la Vie.

N

Nair, I. C., & Jayachandran, K. (2019). Aspartic proteases in food industry. In *Green Bioprocesses* (pp. 15–30). Springer.

Nájera, A. I., De Renobales, M., & Barron, L. J. R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl_2 and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, 80(3), 345–352.

Nassar, A., & Newbury, H. (1987). Ficin production by callus cultures of *Ficus carica*. *Journal of Plant Physiology*, 131, 171–179.

Noël, Y., Lehembre, N., Dulac, A., & Clavaud, M. C. (1989). Comparaison des cinétiques de coagulation enzymatique et mixte du lait. *Influence du calcium. Le Lait*, 69(6), 479–490.

Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet, S., Bellal, 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. *Journal of Food Technology*, 7, 20–29.

O

Ouanezar, M., Guyomarc'h, F., & Bouchoux, A. (2012). AFM imaging of milk casein micelles: evidence for structural rearrangement upon acidification. *Langmuir*, 28, 4915–4919.

Oukabli, A. (2003). Le figuier, un patrimoine génétique diversifié à exploiter. Unité de Recherche sur l'Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto-génétiques, INRA, Centre Régional de Meknès, N° 106.

P

Paez de Leon, L., Pinzon, G., & Otaiza Vasquez, E. (1995). Purification and assay of chicken pepsin. *Acta Científica Venezolana*, 46(4), 237–241.

Park, H., Yamanaka, N., Mikkonen, A., Kusakabe, I., & Kobayashi, H. (2000). Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(4), 845–848.

Payne, T. C. (2009). Enzymes in meat systems. In R. Tarté (Ed.), *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications* (Chap. 8), pp. 245–270. Springer.

Pereira, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6), 619–627.

Polaina, J., & MacCabe, A. P. (2007). Industrial enzymes: Structure, function and applications. Springer, New York.

Q

Quézel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1170

R

Raj, S. J., & Joseph, B. J. (2011). Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn—an overview. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 3(1), 8–12.

Ramalho-Santos, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E., & Faro, C. J. (1997). Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 203, 204–212.

Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Faro, C., & Pires, E. (1996). Action on bovine α s1-casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1297, 83–89.

Ramet, J.-P. (1997). L'égouttage du coagulum. In : Eck A. & Gillis J.-C. (Eds.), *Le Fromage*, 3^e éd., Tec & Doc Lavoisier, pp. 42–60.

Rani, K., Rana, R., & Datt, S. (2012). Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences*, 2, 12–18.

Ribadeau-Dumas, B. (1981). Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. *Le Lait*, 400, 17–32.

Ribadeau-Dumas, B. (1991). Physicochimie et biochimie des protéines du lait. Données récentes. *Le Lait*, 71, 133–139.

Robbins, B. H. (1930). A proteolytic enzyme in fycin, the anthelmintic principle of leche de higueron. *Journal of Biological Chemistry*, 87, 273–278.

Romain, J., Thomas, C., Mahaut, M., Schuck, P., & Brulé, G. (2008). Les produits laitiers. Éditions Tec & Doc, Lavoisier.

Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants: the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2), 76–85.

Rottenberg, A., & Zohary, D. (1996). The wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43(3), 165–174.

S

Sarmento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C. S., Samyn, R. V. B., Sergeant, K., Debysier, G., ... & Domingues, M. R. M. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230(3), 429–439.

Schmidt, D. G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In: Fox P. F. (Ed.), *Developments in Dairy Chemistry*, Vol. 1, Applied Science Publishers, pp. 61–86.

Scott, R. (1981). *Cheesemaking Practice*. Applied Science Publishers, London, pp. 44–165.

Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, 94, 5–16.

Sidrach, L., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., & Rodriguez-Lopez, J. N. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66, 41–49.

Siar, E. H., & Zidoune, M. N. (2014). Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait (Mémoire de doctorat). Université Frères Mentouri Constantine 1.

Siar, E. H., Zaak, H., Kornecki, J. F., Zidoune, M. N., Barbosa, O., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose: Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 58, 98–104.

Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *Journal of Dairy Science*, 88, 1947–1954.

Singleton, A., & Buttle, D. J. (2013). Ficain. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Elsevier, pp. 1877–1879.

Sonnante, G., Pignone, D., & Hammer, K. (2007). The domestication of artichoke and cardoon: from Roman times to the genomic age. *Annals of Botany*, 100, 1095–1100.

Starr, F., Starr, K., & Loope, L. (2003). *Ficus carica* (Edible Fig), Moraceae. Haleakala Field Station, Maui, Hawaii, 1–6.

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.

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.

Swaisgood, H. E. (1982). Chemistry of milk proteins. In: Fox P. F. (Ed.), *Developments in Dairy Chemistry*, Vol. 1 – Proteins, Applied Science Publishers, London, pp. 1–60.

T

Tarté, R. (2009). Ingredients in meat products: properties, functionality and applications. Springer.

Tervala, H.-L., Antila, V., & Syväjärvi, J. (1986). Factors affecting the renneting properties of milk.

Thomas, C., Romain, J., & Brulé, G. (2008). Fondements physicochimiques de la technologie laitière. Lavoisier, p. 144.

Tonelli, N., & Gallouin, F. (2013). Des fruits et des graines comestibles du monde entier. Lavoisier.

Tsouli, J. (1974). Étude comparée de l'activité enzymatique de trois variétés d'artichauts du genre *Cynara cardunculus* L. sur la coagulation du lait. *Le Lait*, 537, 415–421.

Tunick, M. H. (2008). Whey protein production and utilization: a brief history. In: *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, pp. 1–13.

V

Van Oort, M., & Whitehurst, R. J. (2010). Enzymes in food technology. Wiley-Blackwell.

Veisseyre, R. (1975). Technologie du lait (3^e éd.). La Maison Rustique, Paris, 713 p.

Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A. J. G., Lin, Y., Tang, J., & Pires, E. (1996). Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry*, 235, 762–768.

Veríssimo, P., Esteves, C., Faro, C., & Pires, E. (1995). The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin- and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*, 17, 621–626.

Vignola, C. (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. Fondation de technologie laitière du Québec, pp. 1, 12, 14, 15.

Vidaud, J. (1987). [Fig. Production on decrease]. Infos CTIFL.

W

Wiklund, A. (1992). The genus *Cynara* L. (Asteraceae–Cardueae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 109, 75–123.

Walstra, P., & Jenness, R. (1984). Dairy chemistry and physics. John Wiley & Sons.

Walstra, P. (1999). Dairy technology: principles of milk properties and processes. CRC Press.

Waugh, D. F., Creamer, L. K., Slattery, C. W., & Dresdner, G. W. (1970). Core polymers of casein micelles. *Biochemistry*, 9(4), 786–795188. Zare, H., Moosavi-Movahedi, A. A., Salami, M., Morteza, M., Saboury, A., & Sheibani, N. (2013). Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry*, 87, 16–22.

Z

Ziane, F., Gagaoua, M., & Nait Rabah, S. (2014). Some endemic Algerian plant proteases as milk-clotting enzymes and meat tenderizers: an overview. In : Deuxièmes journées scientifiques de l'agro-alimentaire JSAA, Sousse, Tunisie, Affiche n°88, p. 159.

Zikiou, A. (2013). La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de cardon. Mémoire de Magister, Université Mentouri, Constantine, Algérie.

Zikiou, A. (2024). Valorisation de fleurs de cardon algérien : caractérisation, action coagulante sur le lait et fabrication de fromage. Doctorat en science, Université Mentouri, Constantine, Algérie.

Résumé

Ce travail de recherche s'inscrit dans une démarche scientifique articulée autour de deux axes complémentaires. D'une part, il vise l'étude approfondie de certaines propriétés physico-chimiques du lait utilisé comme substrat de coagulation. D'autre part, il s'intéresse à la collecte et à l'extraction de systèmes enzymatiques issus de diverses sources biologiques présentant un intérêt technologique potentiel.

Les sources enzymatiques explorées comprennent les proventricules de poulet, riches en pepsine (protéase d'origine animale), le latex de figuier (*Ficus carica*) contenant la ficine, les fleurs de chardon (*Cynara cardunculus*) fournissant la cardosine et la présure. L'objectif poursuivi est l'identification d'une alternative locale à la présure commerciale importée, largement utilisée dans la fabrication fromagère.

La caractérisation des extraits enzymatiques a été réalisée par la détermination de l'activité coagulante et de la force de coagulation, évaluées à partir du temps de flocculation du lait. Les essais ont été effectués sur du lait reconstitué, en faisant varier certains paramètres physico-chimiques clés, notamment le pH, la température et la concentration en CaCl_2 .

Les résultats expérimentaux indiquent que la ficine présente l'activité coagulante la plus élevée (50 UP) ainsi qu'une forte activité protéolytique ($28,64 \mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$), bien que sa force coagulante reste modérée (1/12000 US). La présure se distingue par une activité spécifique remarquable (0,53 UP/mg) et une force coagulante relativement élevée (1/600 US), malgré une activité coagulante modérée (2,5 UP) et une faible activité protéolytique ($2,16 \mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$). La pepsine de poulet montre des caractéristiques intermédiaires, avec une activité coagulante de 6,7 UP, une activité spécifique de 0,0159 UP/mg et une concentration protéique importante (20,723 mg/ml). En revanche, la cardosine affiche les performances les plus faibles, avec une activité coagulante de 0,39 UP, une force de coagulation très basse (1/94,49 US) et une activité protéolytique réduite ($2,02 \mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$).

Mots-clés : Extraction enzymatique, coagulation du lait, pepsine, ficine, cardosine, présure, lait reconstitué, force coagulante, activité coagulante, activité protéolytique.

Abstract

This research is part of a dual, complementary approach. Firstly, it focuses on assessing specific physicochemical properties of milk used as a coagulation substrate. Simultaneously, it involves the collection and extraction of enzymatic systems from various biological sources with potential technological interest.

These sources include chicken proventriculi, which are rich in pepsin (an animal-derived protease), fig tree latex (*Ficus carica*), which contains ficin, thistle flowers (*Cynara cardunculus*), which provide cardosin, and rennet. The objective of this extraction process is to identify a potential local alternative to imported commercial rennet, widely used in cheese manufacturing.

The enzymatic extracts were characterized by evaluating their milk-clotting activity and clotting strength, based on milk flocculation time measurements under controlled conditions. Experiments were conducted on reconstituted milk, with the variation of key physicochemical parameters such as pH, temperature, and CaCl_2 concentration.

The experimental data revealed that ficin exhibited the highest milk-clotting activity (50 UP) and a strong proteolytic capacity (28.64 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$), despite a moderate clotting strength (1/12000 US). In contrast, rennet showed the highest specific activity (0.53 UP/mg) and a relatively high clotting strength (1/600 US), though its overall milk-clotting activity was moderate (2.5 UP), and its proteolytic activity was low (2.16 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$). Chicken pepsin presented intermediate characteristics, with a clotting activity of 6.7 UP, a specific activity of 0.0159 UP/mg, and a high protein content (20.723 mg/ml). Cardosin demonstrated the lowest performance across all parameters, with a clotting activity of 0.39 UP, a low clotting strength (1/94.49 US), and reduced proteolytic activity (2.02 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$).

Keywords: Enzyme extraction, milk coagulation, pepsin, ficin, cardosin, rennet, reconstituted milk, clotting strength, clotting activity, proteolytic activity.

الملخص

يندرج هذا العمل البحثي ضمن مقاربة علمية ذات بُعدين متكاملين. يتمثل البُعد الأول في دراسة بعض الخصائص الفيزيائية والكيميائية للحليب المستخدم كركيزة للتخثر، أما البُعد الثاني فيتمثل في جمع واستخلاص أنظمة إنزيمية من مصادر بيولوجية مختلفة يُحتمل أن تكون ذات أهمية تكنولوجية.

تشمل هذه المصادر البيولوجية كلاً من الحوافل الغذية للدجاج، الغنية بالبيبيسين (وهو إنزيم من أصل حيواني)، ولاتكس شجرة التين (*Ficus carica*) الذي يحتوي على الفيسين، وأزهار الخرشوف (*Cynara cardunculus*) التي توفر الكاردوzin، بالإضافة إلى المنفحة. ويهدف هذا العمل إلى البحث عن بديل محلي محتمل للمنفحة التجارية المستوردة، والتي تُسْتَعمل على نطاق واسع في صناعة الأجبان.

تمت عملية التوصيف للسوائل الإنزيمية المستخلصة من خلال تحديد النشاط التخثري وقوّة التخثر، وقد تم تقييم هذه المعايير عبر قياس زمن التجلط للحليب. أجريت الاختبارات على حليب معد التركيب، مع تغيير بعض العوامل الفيزيائية-الكيميائية مثل درجة الحموضة(pH) ، ودرجة الحرارة، وتركيز CaCl_2 .

أظهرت النتائج أن الفيسين يمتلك أعلى نشاط تخثري 50 وحدة تخثر (UP) - ونشاطاً بروتينياً مرتفعاً (28,64 ميكروغرام/مل دقيقة)، رغم أن قوته التخثريّة تبقى متوسطة (1/12000) وحدة قوّة (US) - أما المنفحة، فقد تميزت بأعلى نشاط نوعي (0,53 UP/mg) وقوّة تخثر معتبرة (1/600 US) ، رغم أن نشاطها التخثري كان معتدلاً (2,5 UP) ونشاطها البروتيني ضعيفاً (2,16 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$) من جهة أخرى، أظهرت البيبيسين المستخلصة من دجاج خصائص متوسطة، بنشاط تخثري قدره UP6,7 ، ونشاط نوعي UP0,0159 ، وتركيز بروتيني جيد (20,723 mg/ml). أما الكاردوzin، فقد سجل أضعف أداء، بنشاط تخثري بلغ فقط UP0,39 ، وقوّة تخثر ضعيفة جدًا (1/94,49 US) ، ونشاط بروتيني منخفض (2,02 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$).

الكلمات المفتاحية: استخلاص الإنزيمات، تخثر الحليب، البيبيسين، الفيسين، الكاردوzin، المنفحة، الحليب المعد تركيبه، قوّة التخثر، النشاط التخثري، النشاط البروتيني.

Annexe 1

Préparation des solutions

1/ Solution de macération (NaCl + NaHCO3) :

Volume total : 300 ml (pour 100 g de proventricules).

Quantités :

NaCl : 9 g (3 g pour 100 ml \times 3).

NaHCO3 : 2,1 g (0,7 g pour 100 ml \times 3).

Préparation : Peser 9 g de NaCl et 2,1 g de NaHCO3 à l'aide de la balance de précision. Dissoudre les produits dans 300 ml d'eau distillée dans un flacon de 500 ml sous agitation. Vérifier le pH avec le pH-mètre. Il devrait être proche de 8,52. Si nécessaire, ajuster avec du NaOH 1 N ou HCl 3 N.

2/ Solution d'activation (HCl 3 N) :

Volume nécessaire : Environ 10-20 ml (à ajuster selon le pH).

Préparation : Diluer de l'acide chlorhydrique concentré (environ 12 N) pour obtenir une solution 3 N. Pour préparer 100 ml de HCl 3 N : Ajouter 25 ml de HCl concentré (12 N) dans 75 ml d'eau distillée.

3/ Solution de neutralisation (NaOH 1 N) :

Volume nécessaire : Environ 10-20 ml (à ajuster selon le pH).

Préparation : Dissoudre 4 g de NaOH dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir une solution 1 N.

4/ Tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 5

- Dissoudre 8,2 g d'acétate de sodium trihydraté ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) dans environ 800 ml d'eau distillée.
- Ajuster le pH à 5 à l'aide de l'acide acétique glacial ($\approx 1-2$ mL selon la précision).
- Compléter à 1 L avec de l'eau distillée et Conserver à 4 °C.

5/ Solution d'acide borique à 0,2 % (m/v)

Dissoudre 0,2 g d'acide borique (H_3BO_3) dans 100 mL d'eau distillée.

6/ Préparation d'une solution de NaOH 0,1 N

- Pesa 0,4 g de NaOH avec une balance analytique.
- Dissoudre dans environ 50–80 mL d'eau distillée dans un bêcher
- Verser la solution dans une fiole jaugée de 100 mL Compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- Agiter doucement pour homogénéiser.

7/ Préparation d'une solution d'HCl 0,1 N (acide chlorhydrique)

- Dans une fiole jaugée de 100 mL, mettre 50 mL d'eau distillée.
- Ajouter très lentement 0,83 mL d'HCl concentré avec une pipette graduée.
- Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée et agiter pour bien homogénéiser

8/ Préparation de la solution de phénolphtaléine à 1 %

Préparation de Phénolphtaléine Dissolve 1 gramme de phénolphtaléine dans 100 millilitres d'alcool éthylique à 96 %.

Annexe 2

L'activité protéolytique– Green and Stackpoole (1975)

1/ Préparation du tampon phosphate 0.1 M, pH 7 (250 mL)

Dissoudre 1.42 g de Na_2HPO_4 (phosphate disodique) et 0.54 g de NaH_2PO_4 (phosphate monosodique) dans 250 mL d'eau distillée. Vérifier le pH = 7.00 (ajuster si nécessaire avec NaOH ou HCl).

2/ Préparation de la solution de caséine

Peser 1 g de caséine, ajouter dans 50 mL du tampon phosphate préparé, chauffer légèrement (30–37 °C) avec agitation pour bien dissoudre (la caséine est peu soluble). Laisser refroidir avant usage.

3/ Préparation de 100 mL de TCA 5 %

- Peser 5 g de TCA (acide trichloracétique).
- Dissoudre dans environ 80 mL d'eau distillée.
- Compléter jusqu'à 100 ml et conserver au frais, à l'abri de la lumière.

4/ Solution A (base alcaline du réactif de Lowry)

Pour solution de 250 ml, Dissoudre : 1 g de NaOH plus 5 g de Na_2CO_3 (carbonate de sodium) dans 250 ml de l'eau distillée.

5/ Solution B (réactif cuivré)

Pour solution de 10 ml, Dissoudre : 0.1 g de tartrate sodium-potassium (sel de Seignette) et 0.032 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 10 mL d'eau distillée. Préparer fraîchement, conserver à l'abri de la lumière.

6/ Solution C (réactif complet de Lowry)

Préparation immédiate avant usage : Mélanger 100 mL de solution A avec 2 mL de solution B.

7/ Préparation du réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1:2)

Mélanger un volume égal de réactif commercial de Folin-Ciocalteu (2 N) avec de l'eau distillée. Exemple : 10 mL de réactif + 10 mL d'eau distillée.

Ce mélange doit être préparé juste avant utilisation.

2. Dosage de l'activité protéolytique (méthode à la tyrosine)

1/ Étapes du protocole expérimental

1. Mélanger 1 mL de substrat (caséine) avec 1 mL d'extrait enzymatique.
2. Incuber le mélange à 35°C pendant 20 minutes au bain-marie (phase d'hydrolyse enzymatique).
3. Ajouter 5 mL de TCA à 5 % pour précipiter les protéines non hydrolysées.
4. Laisser reposer 15 minutes à température ambiante.
5. Centrifuger le mélange.
6. Prélever 0,5 mL de surnageant, contenant les peptides et acides aminés solubles.

2/ Réaction colorimétrique

1. Ajouter 2,5 mL de solution C (préparée ci-dessous) au surnageant.
2. Incuber 10 minutes à 35°C.
3. Ajouter ensuite 250 µL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1:2).
4. Incuber à nouveau 20 minutes à 35°C jusqu'à formation d'une coloration bleue.
5. Mesurer l'absorbance à 660 nm.
6. Déterminer la concentration en tyrosine par comparaison avec la courbe d'étalonnage.

3/ 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	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Folin- Ciocalteu dilué 1/2 (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

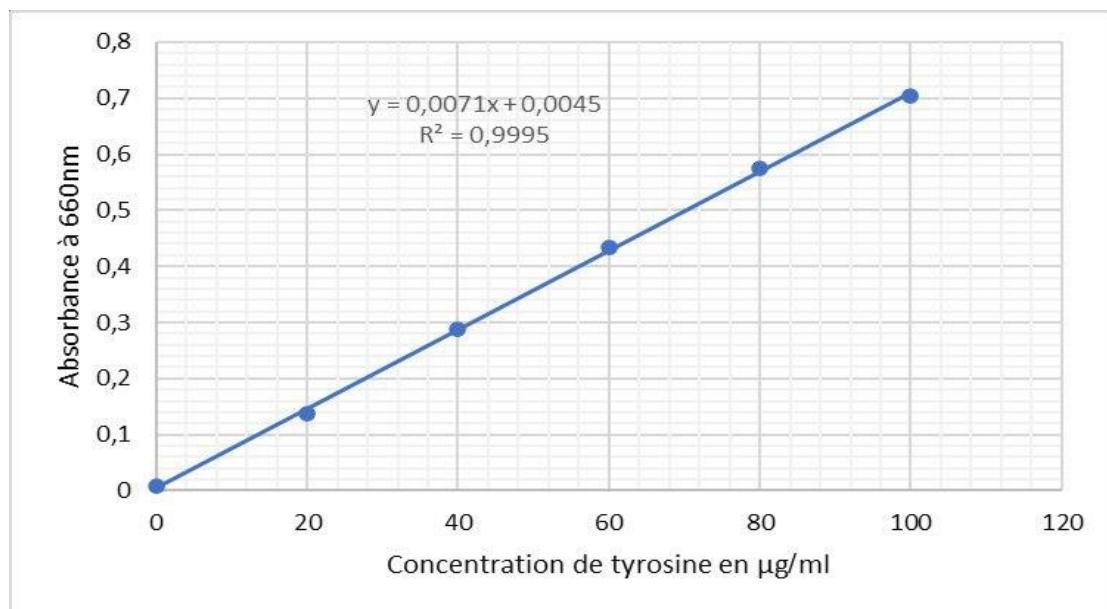


Figure 49 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine

Annexe 3

Dosage des Protéines – Méthode de Lowry (1951)

1) Préparation des Solutions

- Solution A :

5g Na₂CO + 100 ml Eau distillée

- Solution B :

0.5 g Cu SO₄, 5 H₂O + 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 Ciocalteu

- 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 BSA (µg/ml)	0	25	50	75	100	150	200
Volume de BSA (ml)	0	0,125	0,250	0,375	0,500	0,750	1,000
Volume d'eau distillé (ml)	1	0,875	0,750	0,625	0,500	0,250	0,000

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

Évaluation des résultats expérimentaux

Pour interpréter les données obtenues, on trace une courbe d'étalonnage en plaçant les concentrations connues de BSA sur l'axe des abscisses (x) et les absorbances mesurées (DO) à 750 nm sur l'axe des ordonnées (y).

Cette courbe permet d'établir une relation entre la concentration en protéines et l'absorbance. Une fois la DO de l'échantillon inconnu mesurée, il suffit de la reporter sur l'axe des ordonnées. On trace alors une ligne horizontale jusqu'à rencontrer la courbe, puis une ligne verticale vers l'axe des abscisses. Le point d'intersection indique la concentration en protéines de l'échantillon, exprimée en $\mu\text{g/ml}$

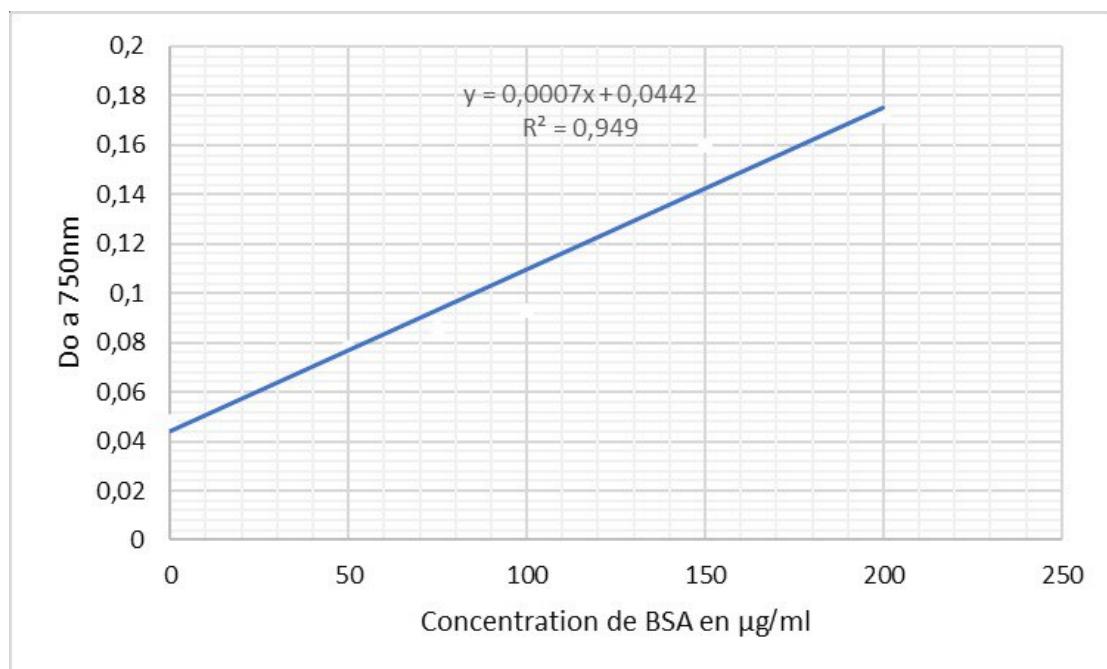


Figure 50 : Courbe d'étalonnage de la BSA

Annexe 4

Préparation des dilutions (v/v) dans un volume final de 20 mL :

Nous avons préparé différentes dilutions de la solution enzymatique dans un volume final de 20 mL, selon les rapports souhaités (v/v), en respectant les proportions exactes entre enzyme et solvant.

Dilution	Pourcentage (v /v)
1/50	2% (v/v)
1/1,7	58,82% (v/v)
1/775	0,129% (v/v)
1/15	6,67% (v/v)

1. Dilution 1/50 (2 % v/v) :

Préparée en ajoutant 0,4 mL de solution enzymatique à 19,6 mL de solvant.

2. Dilution 1/1,7 (58,82 % v/v) :

Réalisée en ajoutant 11,76 mL de solution enzymatique à 8,24 mL de solvant.

3. Dilution 1/775 (0,129 % v/v) :

Obtenue en ajoutant 0,0258 mL (ou 25,8 μ L) de solution enzymatique à 19,9742 mL de solvant.

4. Dilution 1/15 (6,67 % v/v) :

Réalisée en ajoutant 1,33 mL de solution enzymatique à 18,67 mL de solvant.

Thème : Extraction et caractérisation d'enzymes protéolytiques**Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie****Résumé**

Ce travail de recherche s'inscrit dans une démarche scientifique articulée autour de deux axes complémentaires. D'une part, il vise l'étude approfondie de certaines propriétés physico-chimiques du lait utilisé comme substrat de coagulation. D'autre part, il s'intéresse à la collecte et à l'extraction de systèmes enzymatiques issus de diverses sources biologiques présentant un intérêt technologique potentiel.

Les sources enzymatiques explorées comprennent les proventricules de poulet, riches en pepsine (protéase d'origine animale), le latex de figuier (*Ficus carica*) contenant la ficine, les fleurs de chardon (*Cynara cardunculus*) fournissant la cardosine et la présure. L'objectif poursuivi est l'identification d'une alternative locale à la présure commerciale importée, largement utilisée dans la fabrication fromagère.

La caractérisation des extraits enzymatiques a été réalisée par la détermination de l'activité coagulante et de la force de coagulation, évaluées à partir du temps de flocculation du lait. Les essais ont été effectués sur du lait reconstitué, en faisant varier certains paramètres physico-chimiques clés, notamment le pH, la température et la concentration en CaCl_2 .

Les résultats expérimentaux indiquent que la ficine présente l'activité coagulante la plus élevée (50 UP) ainsi qu'une forte activité protéolytique ($28,64 \mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$), bien que sa force coagulante reste modérée (1/12000 US). La présure se distingue par une activité spécifique remarquable (0,53 UP/mg) et une force coagulante relativement élevée (1/600 US), malgré une activité coagulante modérée (2,5 UP) et une faible activité protéolytique ($2,16 \mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$). La pepsine de poulet montre des caractéristiques intermédiaires, avec une activité coagulante de 6,7 UP, une activité spécifique de 0,0159 UP/mg et une concentration protéique importante (20,723 mg/ml). En revanche, la cardosine affiche les performances les plus faibles, avec une activité coagulante de 0,39 UP, une force de coagulation très basse (1/94,49 US) et une activité protéolytique réduite ($2,02 \mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$).

Mots-clés : Extraction enzymatique, coagulation du lait, pepsine, ficine, cardosine, présure, lait reconstitué, force coagulante, activité coagulante, activité protéolytique

Laboratoires de recherche : laboratoire de Biochimie (U Constantine 1 Frères Mentouri).

Président : **M KHEDARA A. (Maître de Conférences A à l'UFM Constantine).**

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

Examinateur(s) : **Mme KHELALFA KH. (Maître de Conférences A à l'UFM Constantine).**

