

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE CONSTANTINE 1



**INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET
DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES
I.N.A.T.A-A.**

N° d'ordre :

N° de série :

Thèse

en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Alimentaires

**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**

par : **Férial Aziza BENYAHIA ép. KRID**

présentée le : 19 décembre 2013

Jury composé de :

Président : M. BOUDJELLAL A.

Professeur (I.N.A.T.A-A., U. C.1)

Rapporteur : M. ZIDOUNE M. N.

Professeur (I.N.A.T.A-A., U. C.1)

Examinatrices :

M^{me} MECHAKRA A.

Professeur (F.S.N.V., U. C.1)

M^{elle} AMOURACHE L.

M.C.A. (I.N.A.T.A-A., U. C.1)

M^{me} DJEGHRI B.

Professeur (E.N.S.S.M.A.L., Alger)

M^{elle} LOUAILECHE H.

Professeur (F.S.N.V., U. A. M., Béjaïa)

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu le Clément Miséricordieux de m'avoir donnée le courage, la volonté et de m'avoir éclairée la voie pour aboutir à cette fin fructueuse.

Un grand merci à ma très chère mère et à mes très chers frères qui m'ont accompagnée le long de la réalisation de ce travail par leurs prières et leurs grands souhaits pour un bon et un joyeux couronnement. Permettez-moi de m'incliner devant vous pour exprimer mes profondes considérations.

Des remerciements distinctifs et particuliers s'adressent à mon très cher époux et à mes très chers fils qui ont bien su me supporter, me soutenir et m'aider jusqu'à la mise du point final. Trouvez ici mes sincères respects et ma profonde reconnaissance.

*Je tiens à témoigner toute ma gratitude et mes grands remerciements à mon enseignant et Directeur de thèse, Monsieur **ZIDOUNE M. N.**, Professeur à l'Université Constantine 1 et Chef de l'équipe Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires (T.E.P.A.) du Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.), pour m'avoir dirigée tout au long de la réalisation de ce travail, pour son esprit scientifique, ses précieux conseils, son écoute et ses discussions qui m'ont fait avancer sur le plan professionnel. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Monsieur **ATTIA H.** Professeur à l'École Nationale des Ingénieurs Sfax (E.N.I.S.)-Tunisie et Monsieur **OUALI A.** Directeur de recherche à l'INRA, Département Qualité des produits Animaux, Centre de Recherches Clermont Theix, France, pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires, me permettant ainsi d'accéder aux moyens techniques et scientifiques nécessaires à ma recherche.*

*Je suis également très sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur **BOUDJELLAL A.** Professeur à l'Université Constantine 1 et Directeur de L'I.N.A.T.A.A. en acceptant de participer à mon jury de thèse et d'en être le président.*

*Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Madame **MECHAKRA A.** Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine 1 de m'avoir honorée par sa participation au jury et du temps qu'elle a bien voulu consacrer à l'analyse critique de ce travail.*

*Je tiens à remercier vivement et à exprimer mon grand respect à Madame **AMOURACHE L.** Maître de Conférence A à l'I.N.A.T.A.A., Université Constantine 1 qui a honoré le jury par sa présence et qui a accepté de juger ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent également à Mme **DJEGHRI B.** Professeur à l'École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral, (E.N.S.S.M.A.L.) Alger, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de m'avoir honorée par sa participation au jury de cette thèse.*

*Je remercie sincèrement Mme **LOUAILECHE H.** Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira, (F.S.N.V., U A M) Béjaïa pour avoir accepté de juger ce travail. Qu'elle trouve ici mes sincères considérations.*

Mes chaleureux remerciements vont à ma chère amie Ouarda pour son aide, ses conseils et son amitié qui m'est plus que précieuse. Je tiens à exprimer toute ma sympathie à l'équipe de Transformation et Elaboration de Produits agro-Alimentaires (T.E.P.A.) principalement Leïla, Faïza et Halima, pour leurs précieuses aides auxquelles je leurs suis énormément reconnaissante. Mes remerciements amicaux sont déclarés pour Mira, Yasmine, Tedj el moulouk, Nora, Amel, Nouhed, Soulef, Fatiha,.....

Enfin, mes remerciements vont aussi à tous les enseignants et collègues de L'INATAA, au personnel technique et au personnel administratif pour leur participation de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Dédicaces

*A tous ceux qui me sont très chers,
je dédie ce travail.*

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	I
LISTE DES FIGURES.....	II
LISTE DES TABLEAUX.....	V
INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1-GENERALITES SUR LE LAIT.....	4
1-1- Définition	4
1-2- Composition.....	4
1-3- Constituants azotés.....	5
1-3-1-Eléments constitutifs des caséines.....	6
1-3-2- Caractères généraux des caséines	6
1-3-3-Micelle de caséine	7
1-3-4-Facteurs de stabilité de la micelle.....	8
2-COAGULATION ENZYMATIQUE DU LAIT	9
2-1- Phases de la coagulation.....	10
2-1-1-Phase primaire	10
2-1-2-Phase secondaire.....	11
2-1-3-Phase tertiaire	11
2-2-Facteurs de la coagulation.....	12
2-3-Evaluation de la coagulation.....	13
2-3-1-Activité coagulante et temps de coagulation	13
2-3-2-Techniques séparatives de fractionnement des protéines	14
2-4-Forces impliquées dans la formation du gel	18
2-5- Propriétés physico-chimiques et rhéologiques des gels.....	18
2-5-1-Conductivité	18
2-5-2-Turbidité	19
2-5-3-Synérèse.....	19
2-5-4-Viscosité et seuil d'écoulement	20
2-5-5-Viscoélasticité	22

2-5-6-Viscosité	23
2-5-7-Fermeté	24
2-6-Microstructure des gels	24
2-6-1-Intérêt de la microscopie électronique.....	24
2-6-2-Principales microscopies électroniques	25
3-ENZYMES COAGULANTES	27
3-1-La présure.....	27
3-2-Les succédanés de la présure	28
3-3-La pepsine aviaire	31
3-3-1-Anatomie du tractus digestif du poulet.....	31
3-3-2-Propriétés de la pepsine et du pepsinogène de poulet	32
3-4-Modes conservation	34
3-4-1-par lyophilisation	34
3-4-2-par séchage sous vide	35
3-4-3-principaux facteurs de stabilité des enzymes.....	35
4-SITUATION AVIAIRE ET LAITIERE EN ALGERIE.....	37
4-1-Situation aviaire	37
4-2-Situation laitière	39
 <i>MATERIEL ET METHODES</i>	
1-MATIERES PREMIERES.....	40
1-1-Les proventricules de poulet	40
1-2-Le lait.....	40
2-TECHNIQUES D'ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUES	40
2-1-Matière sèche.....	41
2-2-Cendres.....	41
2-3-Matière grasse.....	41
2-4-Protéines et matières azotées.....	41
2-4-1-Méthode colorimétrique selon Lowry <i>et al.</i> , (1951).....	41
2-4-2-Azote total.....	42
2-5-Acidité titrable.....	42

3-EXTRACTION DE LA PEPSINE.....	43
3-1-Le diagramme d'extraction adopté.....	43
3-2-L'expression du rendement de l'extraction.....	44
4-CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'EXTRAIT.....	44
4-1-Caractéristique de la présure commerciale.....	44
4-2-Evaluation de l'activité coagulante.....	44
4-2-1-Mesure du temps de floculation.....	44
4-2-2-Détermination des unités présure et de la force coagulante.....	45
4-3-Détermination de l'activité de l'aspartyl protéase.....	45
4-4-Caractérisation fine.....	46
4-4-1-Fractionnement par FPLC.....	46
4-4-2-Activités coagulante et protéolytique des fractions.....	47
4-4-3-Caractérisation par séparation électrophorétique.....	47
5-ETUDE DE LA COAGULATION.....	47
5-1-Confirmation des conditions optimales de coagulation.....	48
5-2-Suivi des caractéristiques physico-chimiques.....	48
5-2-1-Turbidité.....	49
5-2-2-Conductivité.....	49
5-3-Suivi des propriétés rhéologiques.....	49
5-3-1-Détermination des modules G' et G''	50
5-3-2-Détermination de la viscosité.....	50
5-3-3-Détermination du seuil d'écoulement.....	51
5-4-Appréciation du point de rupture des gels.....	51
5-5-Etude de la synérèse.....	52
5-6-Suivi de la protéolyse.....	52
5-6-1-par les fractions azotées libérées.....	52
5-6-2-par séparation électrophorétique.....	53
5-7-Identification des interactions impliquées dans les gels formés.....	53
5-8-Observation au MEB (Microscopie Electronique à Balayage).....	54

6-APPRECIATION DE L'APTITUDE A LA CONSERVATION DE.....	55
L'EXTRAIT BRUT	
6-1-Conservation par déshydratation.....	55
6-1-1-Sous vide partiel.....	56
6-1-2-Cryodessiccation.....	56
6-1-3-Entreposage des échantillons déshydratés.....	56
6-2-Estimation de l'activité coagulante résiduelle.....	61
6-3-Expression de l'activité coagulante résiduelle.....	57
7-ANALYSE STATISTIQUE.....	57
 RESULTATS ET DISCUSSION	
1-CARACTERISATION DES MATIERES PREMIERES.....	59
1-1Caractéristiques dimensionnelles des proventricules.....	59
1-2-Caractéristiques du lait.....	59
2-CARACTERISTIQUES DE L'EXTRAIT BRUT ET RENDEMENT DE	60
L'EXTRACTION	
2-1-Caractéristiques de l'extrait brut.....	60
2-2-Rendement de l'extraction.....	62
3-PURIFICATION PARTIELLE DE LA PEPSINE DE POULET PAR FPLC.....	65
3-1-Caractérisation en activités enzymatiques.....	65
3-2-Caractérisation des principales fractions après purification partielle.....	66
CONCLUSION.....	71
4-ETUDE DE LA COAGULATION.....	73
4-1-Confirmation des conditions optimales de coagulation.....	73
4-1-1-Température et temps optimum de floculation.....	73
4-1-2-pH et temps optimum de floculation.....	75
4-1-3- Concentration du calcium et temps optimum de floculation.....	76
4-2-Suivi des caractéristiques physico-chimiques.....	78
4-2-1-Turbidité.....	78
4-2-2-Conductivité.....	80

Sommaire

4-3-Suivi des propriétés rhéologiques.....	82
4-3-1-Viscosité.....	82
4-3-2-Seuils d'écoulements.....	85
4-3-3-Viscoélasticité.....	86
4-3-4-Force de rupture.....	88
4-4-Synérèse.....	89
4-5- Suivi de la protéolyse.....	91
4-5-1-par les fractions azotées libérées.....	91
4-5-2- par séparation électrophorétique.....	96
4-6-Identification des interactions impliquées dans les gels formés.....	99
4-7-Observation en microscopie électronique à balayage.....	104
5-APPRECIATION DE L'APTITUDE A LA CONSERVATION.....	107
5-1-Aptitude de la pepsine de poulet à la déshydratation par lyophilisation et séchage sous vide.....	107
5-2- Estimation de l'activité résiduelle de la pepsine de poulet à l'état déshydraté au cours du stockage.....	109
CONCLUSION.....	112
CONCLUSION GENERALE.....	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	119
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	
RESUMES	

***LISTE DES
ABREVIATIONS***

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : activité coagulante
AP : activité protéolytique
BSA : bovine serum albumin
CMP : caséinomacropeptide
Da, kDa : Dalton, kilo Dalton
DTT : Dithiothréitol
EBPP : Extrait brut de pepsine de poulet
EDTA : Ethylène Diamine Tétracétate
FAOSTAT : Statistiques données par la FAO « Food and Agricultural Organization »
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
GMP : glycomacropéptide
M.E.B. : Microscopie Electronique à Balayage
NCN : Non Casein Nitrogen
NPN : Non Protein Nitrogen
NTU : nephelometric turbidity unit
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONIL : Office National Interprofessionnel du Lait
ONS : Office National des Statistiques
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TCA : acide trichloracétique
Tris : trishydroxyméthylaminométhane
UP : Unité Présure
US : Unité Soxhlet

SYMBOLES

G' : module d'élasticité ou module de conservation
G'' : module de viscosité ou module de perte
Hz : hertz
S : Siemens, mS : milli Siemens, μ S : micro Siemens
 δ : angle de perte ou angle de déphasage de la contrainte par rapport à la déformation
 $\dot{\epsilon}$: vitesse de cisaillement ou vitesse de déformation
 η (nu) : viscosité absolue
 κ : kappa, κ -CN : kappa caséine
 μ (mu) : viscosité apparente ou dynamique
Pa.s : Pascal seconde
 τ : contrainte de déformation
 τ_c : seuil d'écoulement

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure d'une micelle de caséine stable (VIERLING, 1999).....	8
Figure 2 : Structure d'une sub-micelle caséique, (Tetra Pak Processing system, 1995).....	8
Figure 3 : Phases de coagulation enzymatique du lait, (ALAIS, 1984).....	10
Figure 4 : Hydrolyse de la caséine κ par la présure, (FOX <i>et al.</i> , 1994).....	11
Figure 5 : Evolution de l'hydrolyse de la caséine κ par la présure et de la viscosité.....	12
du lait au cours des différentes phases de sa coagulation (MAHAUT <i>et al.</i> , 2000)	
Figure 6 : Rhéogramme d'un liquide Newtonien (COUARRAZE et GROSSIORD, 1991).....	20
Figure 7 : Rhéogramme d'un corps de Bingham (COUARRAZE et GROSSIORD, 1991).....	21
Figure 8 : Présentation schématique du système cône plateau d'un rhéomètre.....	22
(COUARRAZE et GROSSIORD, 1991)	
Figure 9 : Rhéomètre à cylindres rotatifs (COUARRAZE et GROSSIORD, 1991).....	23
Figure 10 : Micrographe électronique par MEB d'une micelle de caséine.....	25
(DALGLEISH <i>et al.</i> , 2004)	
Figure 11 : (A) Appareil digestif du poulet ;(B) : Complexe stomacal du poulet ;	31
(C) Anatomie du complexe stomacal des Galliacées (LARBIER et LECLERCQ, 1992)	
Figure 12 : Structure tertiaire du pepsinogène de porc (RICHTER <i>et al.</i> , 1998).....	34
Figure 13 : Evolution de la production de viandes en Algérie (FAOSTAT, 2013).....	38
Figure 14 : Tendence de la production de poulet de chair en Algérie (FAOSTAT, 2013).....	38
Figure 15 : Proventricule de poulet : A : avant incision ; B : après incision.....	40
Figure 16 : Courbe d'étalonnage : A : des caséines, B : de la BSA, C : de la tyrosine.....	42
Figure 17 : Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet selon BOHAK (1970).....	43
Figure 18 : Préparation de l'extrait brut pour l'étude de l'aptitude à la conservation.....	58
Figure 19 : Profil d'éluion des fractions de l'extrait brut de pepsine après.....	67
purification partielle par FPLC sur colonne mono Q sépharose (20 à 50 mg de protéines).	
Figure 20 : Profil électrophorétique sur SDS-PAGE des étapes de préparation de.....	69
l'extrait brut à la purification partielle	

Figure 21 : Profil électrophorétique de la protéolyse du substrat de Berridge (1).....	70
(a : α_s -CN, b : β -CN, c : κ -CN, d : Para κ -CN) sur SDS-PAGE à 20 %	
Figure 22 : Effet de la variation de la température sur la floculation du lait par.....	73
la pepsine (\diamond) et par la présure (\blacksquare)	
Figure 23 : Effet de la variation du pH sur la floculation du lait par.....	75
la pepsine (\diamond) et par la présure (\blacksquare)	
Figure 24 : Effet de la variation de la concentration en CaCl_2 sur la floculation du lait.....	77
par la pepsine (\diamond) et par la présure (\blacksquare)	
Figure 25 : Evolution de la turbidité au cours de la coagulation par la pepsine (\diamond).....	78
et par la présure (\blacksquare)	
Figure 26 : Evolution de la conductivité du gel pepsine (\diamond) et du gel présure (\blacksquare).....	81
Figure 27 : Viscosité absolue du substrat de Berridge.....	82
Figure 28 : Variations de la viscosité apparente du substrat de Berridge après	83
coagulation par la pepsine (\diamond) et par la présure (\blacksquare)	
Figure 29 : Rhéogramme des seuils d'écoulement du gel pepsine (\diamond) et du gel présure (\blacksquare).....	85
Figure 30 : Propriétés viscoélastiques du gel pepsine et du gel présure.....	87
Figure 31 : Forces de rupture du gel pepsine (\diamond) et du gel présure (\blacksquare).....	88
Figure 32 : Profil de la synérèse du gel pepsine (\diamond) et du gel présure (\blacksquare).....	90
Figure 33 : Evolution de l'augmentation du NPN (Δ , \times), et du NCN (\diamond , \blacksquare).....	92
du gel pepsine et du gel présure respectivement	
Figure 34 : Urea-PAGE de la protéolyse des caséines bovines par la pepsine.....	97
(A1), ou par la présure (A2) à pH 6,6, 30°C.	
Figure 35 : SDS-PAGE de la protéolyse des caséines bovines par.....	99
la pepsine (B1), ou par la présure (B2) à pH 6,6, 30°C.	
Figure 36 : Effet de la concentration du SDS sur la solubilisation.....	100
des protéines du gel pepsine (\diamond) et du gel présure (\blacksquare)	
Figure 37 : Effet de la molarité de l'urée sur la solubilisation des protéines.....	101
du gel pepsine (\diamond) et du gel présure (\blacksquare)	

Figure 38 : Effet de la molarité de l'EDTA sur la solubilisation des protéines.....	102
du gel pepsine (◇) et du gel présure (■)	
Figure 39 : Micrographies de la structure interne des micelles de caséines.....	105
du gel pepsine et du gel présure par microscopie électronique à balayage	
Figure 40 : Expression de la tendance de l'activité coagulante résiduelle.....	110
de l'extrait brut de pepsine de poulet (EBPP) pendant le stockage	
Figure 41 : Expression de la tendance de l'activité coagulante résiduelle.....	110
de l'extrait brut de pepsine de poulet (EBPP) pendant le stockage	

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition générale du lait en g p. 100 mL (VIGNOLA, 2002).....	4
Tableau 2 : Composition moyenne en g L ⁻¹ et distribution des protéines..... dans le lait (ALAIS, 1984)	5
Tableau 3 : Composition moyenne de la micelle de caséine en g/100g (BRULE <i>et al.</i> , 1997).....	6
Tableau 4 : Gamme de séparation des molécules en fonction de la concentration..... en acrylamide (VOET et VOET, 2005)	15
Tableau 5 : Composition en acides aminés des pepsinogène..... et des pepsines de poulet (DONTA et VANVUNAKIS, 1970)	33
Tableau 6 : Concentrations des agents dissociants seuls et en combinaison (Lefebvre-Cases <i>et al.</i> 1998a).	54
Tableau 7 : Composition du substrat de Berridge.....	59
Tableau 8 : Activités enzymatiques de l'extrait brut de pepsine de poulet..... par comparaison à la présure	60
Tableau 9 : Caractéristiques de la pepsine de poulet obtenues selon le niveau..... de purification partielle	66
Tableau 10 : Caractéristiques des principales fractions séparées en activités enzymatiques.....	68
Tableau 11 : Effets individuels et combinés des agents chimiques dissociants sur la solubilisation des protéines du gel pepsine et du gel présure	103
Tableau 12 : Caractéristiques des extraits obtenus après déshydratation..... par lyophilisation et séchage sous vide en extrait sec total (g/100g) et en activité coagulante résiduelle (%)	108

INTRODUCTION

La production mondiale en fromage a augmenté d'un facteur annuel approximatif de 3,5 depuis 1996 jusqu'à l'an 2000 (FAO, 2012). De plus, la présure d'origine animale ne couvre qu'approximativement 30% de la production fromagère à l'échelle mondiale car la disponibilité des caillettes de veaux de lait devient limitée (FAO, 2012). Ce manque a suscité la recherche de succédanés de présure de différentes origines animale, végétale ou microbienne. Parmi les enzymes de remplacement d'origine végétale, la cardosine extraite du cardon (*Cynara cardunculus*), la ficine, du latex du figuier (*Ficus caricas*), la papaïne, des feuilles du papayer (*Carica papaya*), la broméline, des tiges d'ananas (*Ananas comasus*) et la calotropine, du *Calotropis procera* (AWORH et NAKAI, 1986 ; AWORH et MULLER, 1987 ; VIOQUE *et al.*, 2000, SOUSA et MALCATA, 2002). Les enzymes extraites de ces nombreuses espèces coagulent le lait cependant, leur activité protéolytique est assez intense par rapport à leur activité coagulante comparativement à la présure (CUVELIER 1993, RAMET, 1997a).

D'autre part, de multiples enzymes coagulantes d'origines bactérienne du genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et d'origine fongique issues des préparations de *Mucor* sont utilisées comme substituts de présure notamment au Japon et aux USA (RAMET, 1997a ; MANDY *et al.*, 2011).

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 (JARMUL *et al.*, 1982a,b ; MARTIN *et al.*, 1982 ; ANIFANTAKIS et KANDARAKIS, 1983 ; ALAIS, 1984 ; HAARD, 1992 ; CUVELIER 1993 ; RAMET, 1997a).

Un succédané de présure doit posséder une forte activité coagulante et une activité de protéolyse non spécifique modérée. Son choix est donc délicat car il doit présenter un certains nombres de propriétés physicochimiques et technologiques compatibles avec l'environnement fromager et une qualité alimentaire de produits finis (ALAIS, 1984, RAMET, 1987).

D'une manière plus générale, les protéases occupent une place prépondérante et dominante dans le marché des enzymes industrielles. Elles participent avec un taux avoisinant 65 % du total des enzymes utilisées dans le secteur agroalimentaire. En fromagerie, plus de 80 % des protéases concernent particulièrement les protéases à site aspartique utilisées seules ou en mélange avec la présure (CLAVERIE-MARTIN et VEGA-HERNÁNDEZ, 2007 ; LAW, 2009).

Introduction

L'Algérie utilise environ 1,5 tonne par an de présure ou de ses succédanés d'origine microbienne dans la préparation de fromages à coagulation enzymatique. Cette quantité coûte approximativement 102 000 \$, somme équivalente à 7,5 millions de DA (ONS, 2012). La production de fromage est passée en Algérie de 20 mille tonne en 2006 à 30 mille tonne en 2011 avec une consommation moyenne de 0,6 Kg/habitant/an en 2006 à 0,7 Kg/habitant/an en 2011 (ONS, 2012). D'autre part, la production du poulet de chair en Algérie est passée de 201000 en 2005 à 251000 tonnes en 2011 suivant les statistiques présentées par FAOSTAT, (2013). Selon les déclarations données par le ministère algérien de l'agriculture et du développement rural en 2010, une production allant de 600 000 à 700 000 tonnes est prévue en 2014. Aussi, et conformément à la même source d'information ministérielle, la moyenne annuelle de la production du lait cru, enregistrée entre 2004 et 2008, était de 1,9 milliard de litres avec une production prévisible de 3,2 milliard de litres à l'horizon 2014 (O.N.S., 2012).

Ces évolutions progressives et croissantes en productions aviaire, fromagère et laitière ainsi que l'importation continue et croissante des enzymes coagulantes, suggèrent à exploiter un des substituts de la présure bovine disponible en Algérie. Ceci est pour limiter la dépendance vis-à-vis des importations et pour mieux valoriser les pratiques et la biodiversité qu'offre notre patrimoine traditionnel. Il s'agit ici de la pepsine de poulet. Cette pepsine étant l'unique enzyme sécrétée par les glandes gastriques du proventricule -estomac chimique du poulet- (LARBIER et LECLERCQ, 1992), présente de nombreuses caractéristiques qui la rendent très attractive, notamment dans la préparation des fromages (BOHAK, 1969) :

- elle peut être extraite facilement à partir des proventricules qui sont disponibles en grandes quantités et non exploitables ;
- il est plus facile en industrie d'utiliser la pepsine de poulet que celle des porcs et des bovins, dans la mesure où elle est plus stable à des valeurs élevées de pH et elle n'est pas inhibée par son propre peptide d'activation ;
- elle ressemble plus étroitement à la chymosine que les autres pepsines animales par sa spécificité au substrat et par sa susceptibilité à des inhibiteurs variés ;
- il s'agit également d'une protéase bien disponible et dont les actions méritent d'être étendues à plusieurs secteurs de l'industrie agro-alimentaire, de l'industrie chimique, de l'industrie pharmaceutique, etc.

En 1973/74, 50 p. cent les fromages sous appellation «Edam, Cheddar et Kashkaval» étaient préparés en Israël à partir de pepsine de poulet et ont présenté des

résultats satisfaisants (GORDIN et ROSENTHAL, 1978 ; GORDIN et KOSIKOWSKI, 1979 ; STANLEY *et al.*, 1980, FINDLAY *et al.*, 1984 ; GREEN *et al.*, 1984, CUVELIER, 1993). Cette enzyme a été aussi employée dans la préparation d'un fromage égyptien appelé, « *Domiat* » (WAHBA et EL-ABBASSY, 1984).

En Algérie, la pepsine de poulet trouve son utilisation dans la préparation traditionnelle d'un fromage frais largement consommé dans le sud algérien, connu sous le nom de *Takammérit*.

De ce fait, la disponibilité du proventricule et probablement son coût dérisoire seraient des arguments valables pour proposer ce type de valorisation en Algérie. A ces facteurs économiques se greffe un facteur religieux, lié à l'utilisation ou à la consommation illicite des produits de provenance non contrôlée ou issus d'animaux non égorgés selon le rite islamique.

Dans ce cadre, et compte tenu de la dépendance algérienne en matière de protéases, du besoin croissant en agent coagulant, de l'important développement de l'aviculture en Algérie ainsi que des exigences religieuses quant au choix judicieux des substances entrant dans la composition de nos denrées alimentaires ; la présente étude aspire à la mise en valeur une des sources d'enzymes dont dispose notre pays. Il s'agit de la récupération de la pepsine de poulet de chair, un agent coagulant perdu jusqu'à nos jours et non exploité.

L'étude sera consacrée à la caractérisation de l'extrait brut de la pepsine de poulet sur les plans biochimiques et technologiques en comparaison à la présure, en vue de situer les possibilités de son utilisation en fromagerie. Cette étude comportera les principaux volets suivants :

- extraction et caractérisation de l'extrait brut de la pepsine de poulet à partir de proventricule en vue d'évaluer le rendement et d'estimer la force coagulante ;
- purification partielle de la pepsine de poulet par FPLC et caractérisation des fractions partiellement purifiées ;
- étude de l'aptitude de l'extrait de pepsine obtenu à la coagulation du lait par diverses comparaisons avec ce qui est connu pour la présure.
- comparaison des gels pepsines aux gels présure par : l'identification des interactions impliquées dans les gels formés ; l'observation de la structure des gels en microscopie électronique à balayage et l'appréciation de l'aptitude de l'extrait brut à la conservation.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1-GENERALITES SUR LE LAIT

1-1-Définition

Les différentes législations récentes et anciennes reprennent en général les dispositions établies par le premier Congrès International de la répression des fraudes alimentaires à Genève (1908). Le lait est le produit intégral de la traite complète et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Sont donc impropres à la consommation humaine des laits provenant d'animaux atteints de maladies, d'animaux mal nourris et les laits contenant du *colostrum*. Le lait doit être recueilli proprement, il ne doit être ni coloré, ni malodorant ; il ne doit pas contenir d'espèces microbiennes pathogènes (LECOQ, 1965).

Nous rappelons que la dénomination du lait sans spécifier le nom de l'espèce est relative au lait de vache.

1-2-Composition

Le lait est un produit d'origine biologique fortement altérable par voie microbienne et par voie enzymatique. C'est un milieu multiphasique : une phase aqueuse contenant essentiellement le lactose, les minéraux ; une phase dispersée de nature lipidique (globules gras) et une phase de nature protéique (micelles de caséines). Cette composition varie selon différents facteurs liés aux animaux. Les principaux étant la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison et l'âge (VIGNOLA, 2002). Ces éléments majeurs sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Composition générale du lait en g p. 100 mL (VIGNOLA, 2002).

Composants majeurs	Valeur moyenne
Eau	87,5
Matières grasses	3,7
Protéines	3,2
Glucides	4,6
Minéraux	0,9

1-3-Constituants azotés

Les matières azotées du lait sont composées principalement de caséines (tableau 2) qui sont des phosphoprotéines présentes dans la phase colloïdale sous forme de micelle de caséinate de calcium, unies à la chaîne latérale de la sérine (groupe phosphoséryl) (CAYOT et LORIENT, 1998). Les groupements acides des résidus glutamyl, aspartyl et phosphoséryl sont plus nombreux que les fractions $-NH_2$ de la lysine et des autres acides aminés basiques. Ceci, confère à la caséine entière un point isoélectrique de 4,6 avec une charge nette négative (MATHIEU, 1998).

Tableau 2 : Composition moyenne en g L⁻¹ et distribution des protéines dans le lait (ALAIS, 1984).

	Proportions moyennes	
	g par litre	relatives
Protides totaux	32	100
I-Protéines		
A-Caséine isoélectrique	25	78
a-caséine α s ₁	9,0	36
b-caséine α s ₂	2,5	10
c-caséine β	8,5	34
d-caséine κ	3,2	13
e-caséine $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$	1,75	7,0
B-Protéines du lactosérum	5,4	17
B-1-albumines		
a- β -lactoglobuline	2,7	50
b- α -lactalbumine	1,2	22
c-sérum-albumine	0,25	5
B-2-globulines immunes	0,65	12
B-3-protéoses-peptones	0,6	10
II-Substances azotées non protéiques	1,6	5

Les autres protéines du lait sont présentes dans la phase aqueuse et constituent les protéines du lactosérum qui sont les albumines, les globulines, les protéoses-peptones et les protéines mineures. Elles sont pour la plupart, des enzymes et des protéines de structures cellulaires libérées au cours du processus de sécrétion lactée. Le lait contient également des

molécules azotées non protéiques qui représentent environ 5% de l'azote total du lait. Ces molécules sont en particulier des nucléotides, des bases puriques, de l'urée et d'acide urique.

En fonction du pH, les protéines du lait peuvent être réparties en deux catégories ; les caséines (insolubles à pH 4,6) et les protéines du lactosérum (solubles à pH 4,6) (GUILLOU *et al.*, 1986, RIBADEAU DUMAS, 1991).

1-3-1-Eléments constitutifs des caséines

Les micelles de caséine sont constituées de 92% de protéines et de 8% de minéraux (tableau 3). Les quatre principales protéines contenues dans les micelles sont les caséines α_{s1} , α_{s2} , β , et κ . Il existe également une caséine γ qui provient de l'hydrolyse de la caséine β par la plasmine (SWAISGOOD, 1982, RIBADEAU DUMAS, 1991).

Tableau 3 : Composition moyenne de la micelle de caséine en g/100g (BRULE *et al.*, 1997).

Caséines	Composants salins
α_{s1}33	Calcium.....2,9
α_{s2}11	Magnésium.....0,2
β33	Phosphate inorganique.....4,3
κ11	Citrate.....0,5
γ4	
Total caséines.....92	Total composants salins.....8,0

1-3-2- Caractères généraux des caséines

Caséine α_s

Cette caséine, présente en quantité modeste (8 à 11%), possède 207 acides aminés. La fraction α s'est révélée hétérogène. L'ensemble des fractions α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} , α_{s5} et α_{s6} est maintenant nommé caséine α_{s2} . Le poids moléculaire est situé entre 24000 et 30000 Daltons. Elle est fortement sensible au calcium à toute température et est la plus hydrophile de toutes les caséines vu sa richesse en groupements phosphorylés et en résidus cationiques.

Caséine β

Elle est présente en quantité importante (25 – 35%), et possède 209 acides aminés, pour une masse molaire d'environ 24000 Daltons. Elle est sensible au Ca^{2+} à température ambiante. A basse température, en dessous de 10°C, elle reste soluble en présence de

calcium. C'est la plus hydrophobe des caséines. La molécule présente un caractère amphipolaire très marqué : partie N terminale très polaire (1/3 de la molécule) et partie C terminale hydrophobe comprenant les 2/3 restants de la molécule.

Caséine κ

Sa structure primaire comporte 169 résidus d'acide aminés, son poids moléculaire est de 19000 Daltons. Lors de l'hydrolyse de la liaison Phe 105- Met106 par la chymosine, il y a libération du caséinomacropeptide (CMP) ou s'il est fortement glycosylé, glycomacropéptide (GMP) et la para caséine κ . La fraction CMP ou GMP confère à cette protéine son caractère hydrophile et la para caséine κ son caractère très hydrophobe. Ceci explique la perte de la solubilité des micelles de caséines.

Caséine γ

La connaissance de la structure de la caséine β permet de montrer que la fraction γ est constituée de 3 fragments appelés γ_1 (20500 Daltons), γ_2 (11800 Daltons), γ_3 (11500 Daltons) qui proviennent de l'hydrolyse de la caséine β par la plasmine, une protéase endogène alcaline du lait.

1-3-3-Micelle de caséine

La micelle de caséine est une particule sphérique d'un diamètre moyen de 50 à 200 nm (figure 1) formée par l'association des caséines (α_{s1} , α_{s2} , β , κ), de quelques fragments peptidiques (caséines γ issus de la protéolyse de la caséine β par la plasmine) et de composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphore. La masse des micelles oscille entre $2 \cdot 10^8$ et $2 \cdot 10^9$ Daltons. Les associants qui constituent la micelle, sont appelées des submicelles. Elles étaient révélées, par microscope électronique après cryofracture, et sont d'environ 10 nm de diamètre. Leur masse moléculaire serait en moyenne de $3 \cdot 10^5$ Da. De nombreux modèles ont été proposés. Les uns accordent à la micelle une structure globale avec une répartition non uniforme des constituants ; d'autres retiennent l'idée d'une structure avec sous-unité ou submicelle. Ces submicelles s'agrègent entre elles principalement par des liaisons phosphocalciques et secondairement par le magnésium et le citrate (CAYOT et LORIENT, 1998 ; MAHAUT *et al.*, 2000).

Les submicelles à faible teneur en caséine κ sont localisées à l'intérieur de la micelle ; celles, riches en caséines κ sont présentes à l'extérieur. Les submicelles périphériques riches en caséines κ (figure 2) comporteraient des chaînes flexibles. Ces chaînes correspondant aux fragments COOH terminal des caséines κ auraient un rôle déterminant dans la stabilité des micelles (BRULE *et al.*, 1997 ; DALGLEISH, 1998 et DALGLEISH, 2007).

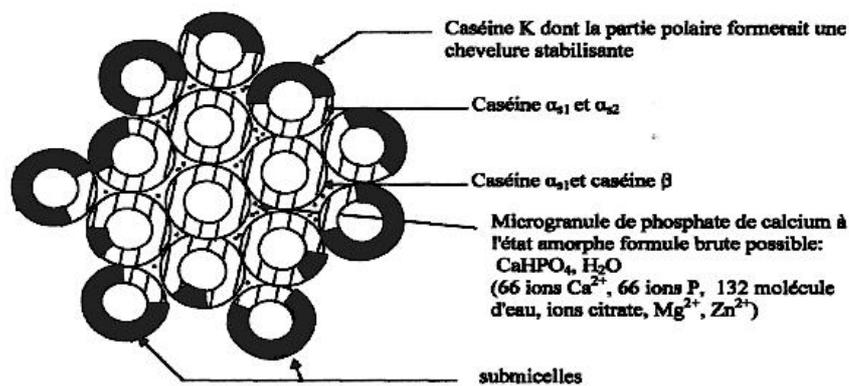


Figure 1 : Structure d'une micelle de caséine stable (VIERLING, 1999).

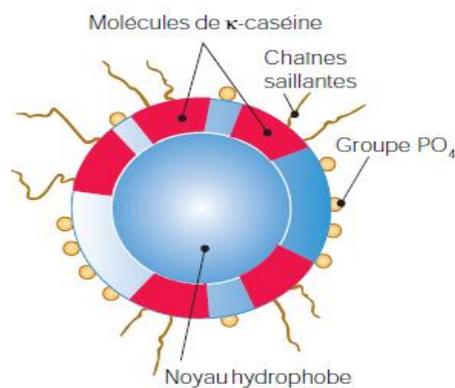


Figure 2 : Structure d'une sub-micelle caséinique (Tetra Pak Processing system, 1995).

1-3-4-Facteurs de stabilité de la micelle

Les micelles de caséines compte 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 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).

2-COAGULATION ENZYMATIQUE DU LAIT

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire. Un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne, présente la propriété de coaguler le complexe caséinique (DALGLEISH, 1997). La présure, (voir chapitre enzymes coagulantes) est l'enzyme coagulante la mieux connue et son mécanisme d'action est bien établi.

Le processus de coagulation est influencé par la température, l'acidité et la teneur en calcium. La coagulation, provoquée par la présure (figure 3), résulte d'un processus en trois phases (ALAIS, 1984 ; BRULE *et al.*, 1997, MAHAUT *et al.*, 2000 et LUCEY, 2002)

- phase primaire ou enzymatique,
- phase secondaire ou phase d'agrégation des micelles déstabilisées,
- phase tertiaire ou phase de développement du réseau par réticulation et formation de gel.

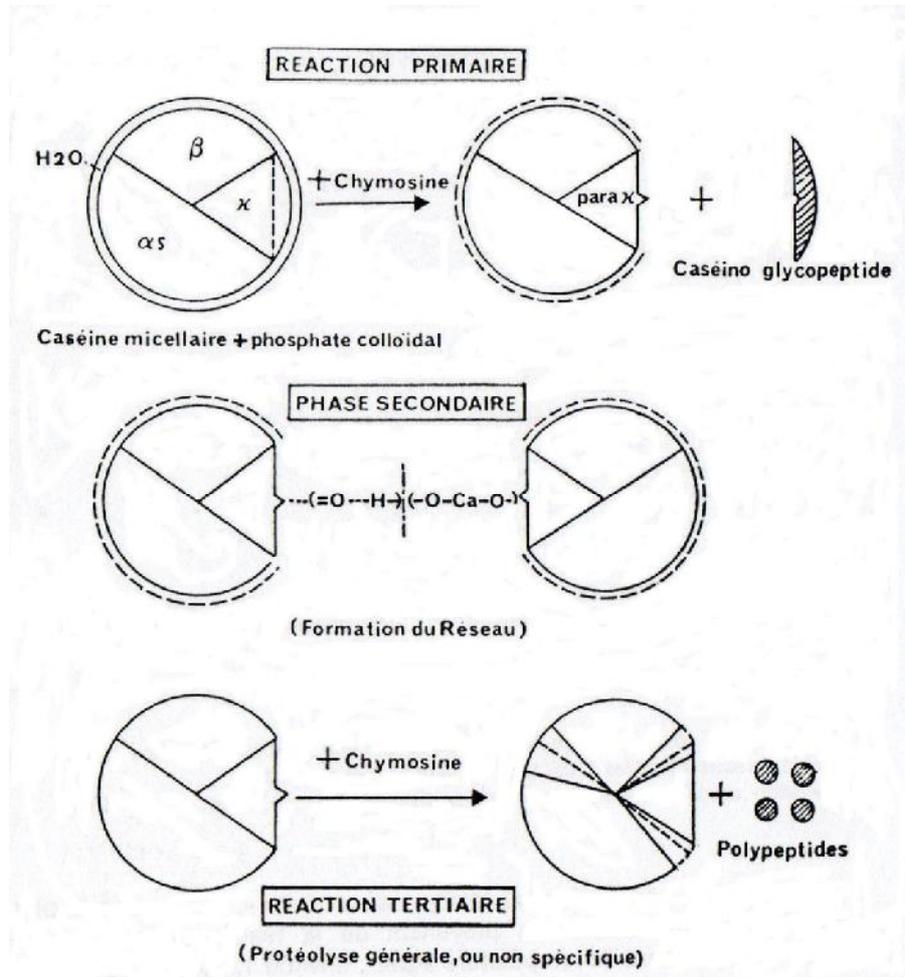


Figure 3 : Phases de coagulation enzymatique du lait, (ALAIS, 1984)

2-1-Phases de la coagulation

2-1-1-Phase primaire

La micelle est principalement constituée de caséine κ avec son segment C- terminal hydrophile libre qui s'étend dans la phase aqueuse du lait assurant la stabilité stérique et agissant comme une barrière contre l'association des micelles. Au cours de la phase enzymatique, la présure hydrolyse 80 à 90 % de la caséine κ au niveau de la liaison peptidique phénylalanine (105) et méthionine (106) à $pH = 6,6$. Cette action permet la libération de caséinomacropeptide fortement glycosylé et hydrophile (CMP, fragment 106-169) dans le lactosérum, l'autre partie reste associée aux autres caséines au sein des micelles, c'est la paracaséine κ (1-105) (figure 4). Ce taux d'hydrolyse correspond à 60 % du temps nécessaire pour obtenir une coagulation visible (figure 5). Ce temps est noté temps de floculation. Cette hydrolyse entraîne une réduction de la charge négative et des

répulsions stériques de telle sorte que les micelles de caséine deviennent susceptibles à l'agrégation.

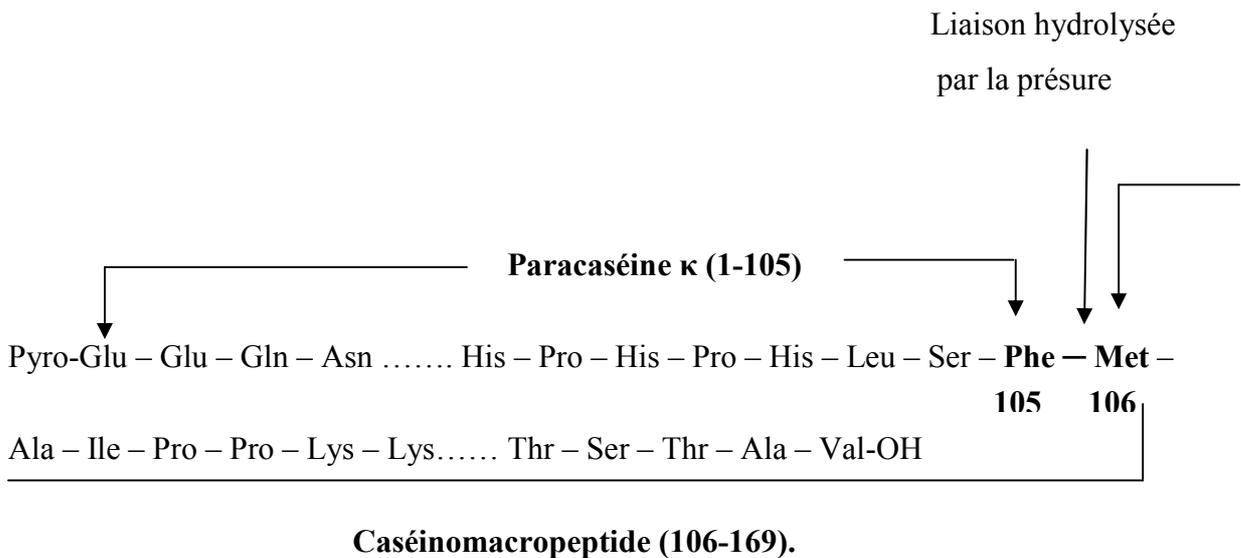


Figure 4 : Hydrolyse de la caséine κ par la présure, (FOX *et al.*, 1994).

2-1-2-Phase secondaire

Elle correspond à la phase physique, au cours de laquelle les micelles déstabilisées s'agrègent par des liaisons électrostatiques hydrophobes et salines pour former un gel emprisonnant le lactosérum. Le gel présure ainsi formé est fortement minéralisée, souple, cohésif, et imperméable.

2-1-3-Phase tertiaire

Les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut être des ponts disulfures entre les paracaséines. La présure peut également continuer son action au cours de l'affinage et représente ainsi une part importante de la dégradation des protéines. Les peptides libérés sont principalement de haut poids moléculaire. Dans les caillées, la présure attaque très rapidement la caséine α_{s1} en scindant les liaisons Phe23- Phe24, Phe24- Val 25. L'action de la présure à l'affinage sur la caséine β est beaucoup moins intense que sur la caséine α_s .

Les différentes phases de la coagulation du lait par la présure ainsi que l'évolution de sa viscosité sont présentées dans la figure 5.

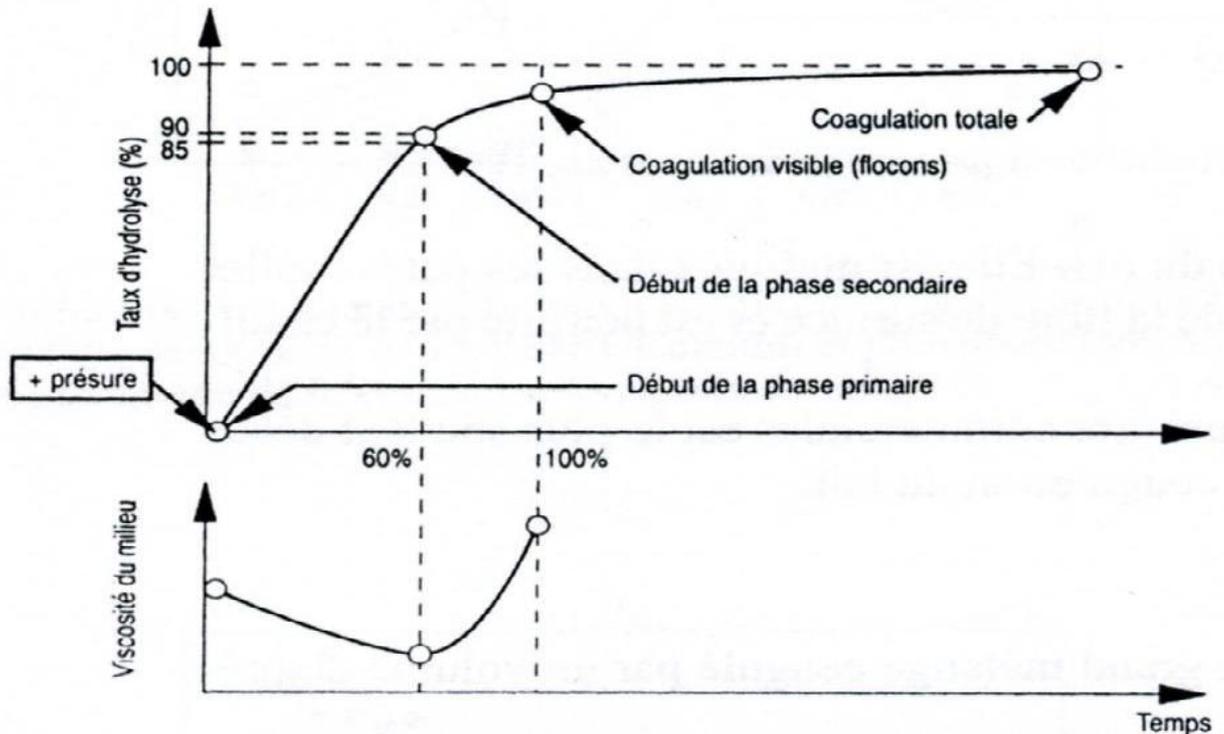


Figure 5 : Evolution de l'hydrolyse de la caséine κ par la présure et de la viscosité du lait au cours des différentes phases de sa coagulation (MAHAUT *et al.*, 2000).

2-2-Facteurs de la coagulation

De Nombreux facteurs sont susceptibles de modifier la coagulation du lait et les caractéristiques physiques des coagulums. Ces facteurs sont principalement liés à la concentration en enzyme, à la température, au pH, à la teneur en calcium, à la teneur en caséines et à la dimension des micelles (MAHAUT *et al.*, 2000, LI et DALGLEISH, 2006).

Concentration en enzyme : la concentration en enzyme est inversement proportionnelle au temps de coagulation. Cependant, elle est proportionnelle à la vitesse d'hydrolyse de la caséine κ (phase enzymatique) et à la vitesse d'agrégation des micelles (phase physique).

Température : la température optimale d'activité de la chymosine et de la pepsine est de 40-42°C. A cet intervalle de température, le temps de floculation est minimal, puis augmente aux températures plus élevées et devient nul à 65°C où la présure est inactivée. On note que le temps de raffermissement du gel diminue avec l'élévation de la température.

pH : en passant de pH 6,7 à 5,6, la vitesse de coagulation est accrue. Ceci résulte d'un accroissement de la vitesse d'hydrolyse et par suite une augmentation de la vitesse de raffermissement du gel. La fermeté est significativement importante de pH 6,6 à pH 6,0 due à une plus grande disponibilité du calcium ionisé. Au-dessous de pH 6,0, la caséine se déminéralise et la désagrégation de la structure micellaire est accentuée jusqu'à devenir totale à pH 5,2. Il en résulte un affaiblissement du réseau.

Teneur en calcium : la réticulation du gel lors de la coagulation du lait par la présure, impliquant des liaisons phosphocalciques, est particulièrement influencée par la teneur et la nature du calcium présent. L'addition du CaCl_2 entraîne une augmentation du calcium ionisé et du calcium colloïdal ayant pour conséquence un temps de coagulation plus court et une fermeté du gel plus élevée.

Teneur 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 des caséines.

Dimension des micelles : la relation entre les dimensions des micelles et le temps de coagulation est proportionnelle. Pour les micelles de faible diamètre, riches en caséine κ , la vitesse d'hydrolyse est plus rapide.

2-3-Evaluation de la coagulation

2-3-1-Activité coagulante et temps de coagulation

2-3-1-1-Temps de coagulation : le temps de coagulation correspondant au temps entre l'addition d'enzyme coagulante et le début de tranchage du gel (RAMET, 1997b).

2-3-1-2-Temps de prise : le temps de prise ou durée de prise est le temps qui s'écoule entre l'emprésurage et le début de la floculation, c'est-à-dire, gélification apparente du lait (LUQUET et BOUDIER, 1981 ; MAHAUT *et al.*, 2000).

2-3-1-3-Activité coagulante : l'activité coagulante est définie par l'unité présure (UP). Selon Berridge, cette unité correspond à la quantité d'enzyme contenue dans 1 centimètre cube, qui peut coaguler 10 centimètres cubes de substrat standard en 100 secondes à 30°C (ALAIS, 1984).

2-3-1-4-Force coagulante : les méthodes anciennes et les plus répandues ont été proposées par Soxhlet et Berridge. L'unité Soxhlet correspond au nombre d'unité de poids ou de volume de lait qui peuvent être coagulés par une unité de poids ou de volume de préparation coagulante en 40 min et à 35°C (ALAIS, 1984 ; RAMET, 1997b).

2-3-2-Techniques séparatives de fractionnement des protéines

2-3-2-1-Fractions azotées

Les précipitations fractionnées sont basées sur la précipitation des caséines à leur point isoélectrique et l'utilisation d'agents défécants tels que l'acide trichloracétique. Lorsqu'on amène une solution protéique à pH 4,6, les caséines intactes et les caséines peu dégradées précipitent. On retrouve dans la solution, des peptides de haut poids moléculaire, des peptides courts et des acides aminés libres. L'addition d'acide trichloracétique à la concentration finale de 12 % entraîne la défécation de nouveaux peptides et ne laisse en solution que les petits peptides et les acides aminés. Ces derniers issus des différentes fractions collectées dans le surnageant, sont généralement quantifiés après minéralisation de l'azote selon la technique de Kjeldahl. Les molécules azotées non protéiques représentent environ 5% de l'azote total du lait, (ALAIS, 1984). On appelle en général azote soluble la fraction azotée correspondant aux produits non précipitables à pH 4,6 et azote non protéique la fraction soluble dans l'acide trichloracétique à 12% de concentration finale (CHOISY *et al.*, 1997).

2-3-2-2-Protéolyse vue par électrophorèse

SDS-PAGE

La « Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis » (SDS-PAGE) est une technique de séparation d'un mélange de molécules sous conditions dénaturantes selon leurs poids moléculaire. Le polyacrylamide est un gel finement réticulé, constitué d'acrylamide qui polymérise en donnant des chaînes linéaires, et du bis acrylamide qui forme des ponts entre les chaînes. Un réseau, dont les mailles sont de taille variable en fonction des proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide est obtenu et se comporte ainsi comme un tamis moléculaire (tableau 4). Le Sodium dodécylsulfate (SDS), détergent anionique défait la structure spatiale et se fixe sur les protéines (1,4 g de SDS par gramme de protéine), en leur conférant une charge globale négative et la séparation est alors uniquement fonction de la masse molaire.

Tableau 4 : Gamme de séparation des molécules en fonction de la concentration en acrylamide (VOET et VOET, 2005).

Acrylamide (%)	Gamme de séparation en KDa
7,5	45-400
10	22-300
12	13-200
15	2,5-100

Aussi le β -mercaptoéthanol contribue à la dénaturation des protéines en réduisant tous les ponts disulfures. En fonction des différents paramètres (masse, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration soumise à un champ électrique va être variable. Ceci permet la séparation des bandes électrophorétiques de molécules individuelles et la détermination de la masse moléculaire des protéines inconnues suite à la comparaison de leur mobilité à celle des protéines de masses moléculaires connue (marqueurs de taille) (VOET et VOET, 2005).

Selon la technique de LAEMMLI (1970), la SDS-PAGE est réalisée sur un gel de séparation (12 % T, 5,6% C) et un gel de concentration (7,5% T, 5,6 % C), préparés à partir de solution de 30% d'acrylamide et de 0,8% de bisacrylamide. Le tampon de gel de concentration est composé de 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) et celui du gel de séparation de 1,5 M tris HCl, 0,8 % SDS, (pH 8,8). Dix (10) μ L de chaque échantillon à étudier sont déposés dans les puits de gel polyacrylamide. La séparation des protéines est conduite à 90 V pendant 10 minutes puis maintenue constante à 120 dans un tampon de migration constitué de 0,025 M Tris HCl, 0,192 M glycine, 0,1% SDS, (pH 8,3). Après migration, les bandes sur gel sont colorées par la solution de coloration (bleu de Coomassie R-250 (0,025%), acide acétique (10 %), alcool (30%) et eau (60%). La solution pour la fixation des bandes et pour la décoloration du gel est constituée d'acide acétique, d'alcool et d'eau (5%, 30%, 65%) respectivement.

UREA-PAGE

C'est une technique de séparation des protéines en conditions dénaturantes utilisée pour montrer en l'occurrence le niveau de l'hydrolyse des caséines en leurs sous unités. Cette technique fait intervenir à la fois la charge et le poids moléculaire. L'urée agent

dénaturant des protéines, coupe les liaisons hydrogènes et entraîne un dépliement des protéines qui pourraient alors s'agencer en une structure de plus grande taille des différentes molécules protéiques à séparer, sans modifier la charge. Les molécules ainsi dénaturées vont migrer à travers les mailles du gel de polyacrylamide permettant ainsi la séparation de molécules plus ou moins massives (UPADHYAY *et al.*, 2004).

Selon KALIT *et al.* (2005), l'urea-PAGE utilise un gel de séparation (12 % T, 3,8% C) et un gel de concentration (5,7% T ; 3,8 % C), préparés à partir de 40% acrylamide et 1,6% bisacrylamide. Le tampon de gel de séparation est composé de 380 mM tris HCl, 4,5 M urée, (pH 8,9) et celui du gel de concentration de 60 mM tris HCl et 8 M urée, (pH 7,6). Dix (10) µL de chaque échantillon sont déposés dans les puits de gel polyacrylamide. La migration étant 95 v pendant 15 minutes puis maintenue à 110 v un tampon de migration contenant 0,025 M Tris HCl, 0,192 M glycine, (pH 8,3). Après migration, les bandes sur gel sont colorées par la solution de coloration composée de bleu de Coomassie R-250, acide acétique, alcool, eau à des concentrations respectives de 0,025%, 10 %, 30% et 60%. Une solution constituée d'acide acétique, d'alcool et d'eau à 5%, 30% et 65% respectivement sert à la fixation des bandes et à la décoloration du gel.

L'urea-PAGE est une technique essentiellement utilisée pour suivre la protéolyse des caséines vu sa sensibilité et son pouvoir de résolution particulièrement adaptés à leur séparation. En effet, à forte concentration, l'urée agit spécifiquement sur les liaisons hydrogènes et déstabilise les interactions hydrophobes. Cependant, le sodium dodécyl sulfate (SDS)-PAGE, est moins convenable pour l'étude de la protéolyse des caséines, car elle détermine uniquement leur taille après hydrolyse.

Les peptides séparés par SDS ou urea-PAGE peuvent être isolés par coupure des bandes, suivie par une digestion à la trypsine dans le gel puis injection des peptides obtenus dans un système HPLC capillaire couplé à un spectromètre de masse. Le spectromètre mesure la masse (m/z) du peptide et le fragmente aux liens peptidiques. Cette fragmentation génère un spectre MS/MS qui est une représentation de la séquence du peptide. L'interrogation d'une banque de protéines par la suite à l'aide de logiciel spécifique permet de trouver la séquence du peptide et donc de la protéine par comparaison de la fragmentation théorique des séquences de la banque de données avec celle obtenue expérimentalement (McSWEENEY *et al.*, 1994 ; PAVIA *et al.*, 2000, UPADHYAY *et al.*, 2004).

La coagulation du lait par la chymosine ou par la pepsine est due à une protéolyse limitée de la caséine κ . Cette activité spécifique est suivie d'une action de protéolyse générale beaucoup plus lente. Une hydrolyse poussée de la caséine α_{S1} par la chymosine conduit à la coupure de plus de 25 liaisons, une hydrolyse préférentielle étant observée au niveau des liaisons contenant le groupement carboxyl d'une phénylalanine ou d'une leucine. La liaison Phe 23-Phe24 est beaucoup plus sensible que les autres. Le produit de dégradation obtenu Phe 24 –Trp 199, appelé $\alpha_{S1}I$, présente une mobilité électrophorétique légèrement supérieure à celle de la caséine α_{S1} . La production de $\alpha_{S1}I$ est observée quelles que soient les conditions d'hydrolyse utilisées. Cependant, d'autres coupures (Leu169, Gly170, Leu149-Phe150, Phe28-Pro29) sont influencées par le pH, la force ionique ou la présence d'urée dans le milieu réactionnel. La chymosine hydrolyse séquentiellement la caséine β et conduit à l'apparition successive de produits de mobilité électrophorétique croissante βI , βII βIII . Les liaisons Leu192-Tyr193 et Ala189-Phe190 sont les plus sensibles (apparition de la bande βI , correspondant aux produits Arg1-Leu192 et Arg1-Ala189) ; puis viennent les coupures 163-164, 165-166, 166-167 (apparition de la bande βII) et 139-140 (apparition de la bande III) (CHOISY *et al.*, 1997).

2-3-2-3-Evaluation par FPLC

Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) est une forme de chromatographie phase liquide employée pour séparer ou purifier des protéines et d'autres polymères de mélanges complexes. Cette séparation commence par échanges d'ions sur résines (phase stationnaire) composées d'agarose avec le changement de la surface du ligand qui dépend de la molécule à purifier (mono Q échangeuses d'anions -ion échangé Cl^- ou mono S échangeuse de cations -ion échangé H^+) puis par élution sélective des composés séparés en fonction du gradient en NaCl (tampon d'élution). La sélectivité dans les interactions ioniques dirige l'exclusion des molécules non retenues puis l'élution des autres protéines (VON JAGOW et SCHÄGGER, 1994 ; SHEEHAN, 1996).

Le but de purifier des protéines par FPLC est pour donner des quantités de molécules suffisamment pures et dans un état biologiquement actif pour convenir à leur future utilisation. La qualité de la purification dépend du type et du taux de la protéine à purifiée, de la sélectivité de la résine et de son efficacité de séparation. Pour une analyse structurale (RMN ou cristallographie par rayon X), l'ensemble des impuretés des particules peut être écarté par SDS-PAGE par exemple suivi de FPLC. La sélectivité dans les

interactions ioniques indépendante du gradient de pH et du gradient de NaCl dirige l'exclusion des molécules non retenues puis l'élution des autres protéines (GHOSAL et SRIVASTAVA, 2009).

2-4-Forces impliquées dans la formation du gel

Les protéines du lait sont unies entre elles par des interactions non covalentes (interactions hydrophobes, interactions électrostatiques et liaisons hydrogène). L'étude de la nature des interactions entre ces protéines impliquées dans le processus de coagulation acide ou enzymatique est basée sur la dissociation de leurs gels dans de différentes solutions de dissociation spécifiques. Ainsi, l'urée, dénature les protéines par rupture des liaisons hydrogènes intramoléculaire des polypeptides qui stabilisent la structure secondaire des protéines (LEFEBVRE-CASES *et al.*, 2001). L'urée peut aussi affaiblir les interactions hydrophobes. Les détergents sont une classe de molécules dont la propriété est de permettre la rupture de liaisons hydrophiles ou hydrophobes. Ils agissent principalement sur les groupes chargés et les groupes non polaires des chaînes latérales des protéines en créant des répulsions électrostatiques intramoléculaires. Cette classe regroupe les détergents anioniques comme le SDS (sodium dodécyl sulfate) et les détergents cationiques comme le CTAB (cétyltriméthylammonium bromide), le Triton X 100 (un alkylphénol), le carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, et le sodium déoxycholate (TSYRLOV *et al.*, 1976 ; CALABRESI *et al.*, 2007). L'éthylène diamine tétra-acétate (EDTA) est souvent l'agent chélateur du calcium, utilisé pour obtenir un lait réduit en calcium dans une solution colloïdale de phosphate de calcium, (LEFEBVRE-CASES *et al.*, 1998a, LEFEBVRE-CASES *et al.*, 1998b).

2-5-Propriétés physico-chimiques et rhéologiques des gels

2-5-1-Conductivité

La conductivité électrique dans le lait est liée aux anions et aux cations dont les plus importants sont Na^+ , K^+ , Ca^{++} et Cl^- . Ainsi, la cinétique de la transition du lait au gel après action d'une enzyme coagulante peut être suivie par conductimétrie. Au moment de la coagulation, une indisponibilité des ions calcium et phosphate se produit engendrant ainsi une diminution de la mobilité des charges suscitées. Ceci se traduit par une chute de la conductivité (TSOULI *et al.*, 1975 ; NIELEN *et al.*, 1992).

2-5-2-Turbidité

La mesure de la turbidité est l'une des méthodes physiques utilisée pour suivre la coagulation du lait. Elle est basée sur la réflexion d'un rayonnement incident monochromatique dans le proche infrarouge. Le rayonnement incident transmis dans le lait, est réfléchi par les éléments en suspension dans le fluide porteur. L'augmentation de la turbidité est l'une des indicateurs de l'agrégation des particules de caséines qui mène à la coagulation. Ainsi, la diffusion de la lumière par les micelles de caséines non dissoutes conduit à une élévation de la turbidité (BANON et HARDY, 1992 ; LEHNER *et al.*, 1999).

2-5-3-Synérèse

Le temps de floculation est le temps écoulé depuis l'emprésurage jusqu'à l'apparition des premiers flocons. Ceux-ci se soudent, pour former le gel qui, peu à peu acquiert une certaine fermeté. L'égouttage du coagulum est le résultat d'une interaction progressive et continue entre les caséines du lait. Les caillés initiaux sont plus ou moins perméables et plus ou moins contractiles. Ces deux données permettent de déterminer la synérèse qui rappelle la contraction spontanée du grain sous l'action de la présure, de l'acidité, de la chaleur et l'exsudation qui définit l'égouttage du sérum par la porosité du caillé. L'égouttage commence dès la coagulation du lait, durant la phase primaire par départ du pôle hydrophile de la caséine κ puis lors des phases secondaire et tertiaire par l'établissement de liaisons sur les sites actifs démasqués par la phase primaire ou la protéolyse générale (ponts calciques, ponts disulfures, liaisons hydrophobes). Ces paramètres contribueront à l'effet de synérèse, où la plus grande partie des éléments solubles du lait (lactose, sels minéraux) et quelques fractions insolubles mineures (azote, matière grasse) sont en effet expulsées du gel conjointement à l'eau (LENOIR *et al.*, 1997).

Le mécanisme de la synérèse résulte de deux propriétés différentes du gel :

- un pouvoir de contraction de la trame protéique formée par les micelles de caséine lors de la coagulation, qui se traduit par une compaction du gel ;

- une aptitude du gel à évacuer le lactosérum interstitiel qui est fonction de la porosité et de la perméabilité.

En cours de coagulation et au début de synérèse, des liaisons de faible énergie (hydrogène, électrostatiques) apparaissent. Elles sont responsables de la cohésion du gel mais n'ont pas d'effet marqué sur l'égouttage. Après, des liaisons cationiques notamment

calciques puis des ponts disulfures, s'établissent et renforcent la cohésion de la trame protéique. Le gel obtenu par voie enzymatique dominante « exemple gel présure » présente une forte porosité définie par le volume relatif des vacuoles interstitielles, mais sa perméabilité est faible. Ses propriétés rhéologiques évoluent à la suite de la libération par la protéolyse de sites réactionnels favorables à l'établissement de liaisons nouvelles responsables du pouvoir de contraction (PEARSE et MACKINLAY 1989 ; YUN *et al.*, 1995 ; RAMET, 1997b)

2-5-4- Viscosité et seuil d'écoulement

La viscosité du lait est influencée par la concentration de protéines et son taux de lipides. Le lait en cours de gélification est considéré comme un système viscoélastique. A son pH initial, le lait se comporte en tant qu'un liquide Newtonien puis évolue en état de gel où les propriétés élastiques apparaissent. Entre les deux phases, existe une discontinuité correspondant au changement d'état de lait appelé point de gélification.

Deux différents régimes en rhéologie sont observés : régime permanent et régime harmonique. En régime permanent, la substance étudiée est soumise à un mouvement laminaire de cisaillement indépendant du temps : les différentes couches s'écoulent sans que la vitesse et la contrainte de cisaillement ne subissent aucune modification au cours du temps. Ce régime regroupe fluides Newtonien et fluide non Newtonien.

Un fluide est dit Newtonien si sa viscosité est indépendante de la contrainte de cisaillement appliquée, le fluide est dit parfait ou linéaire. Dans ces conditions, le rhéogramme est une droite passant par l'origine de pente égale à la viscosité (figure 6).

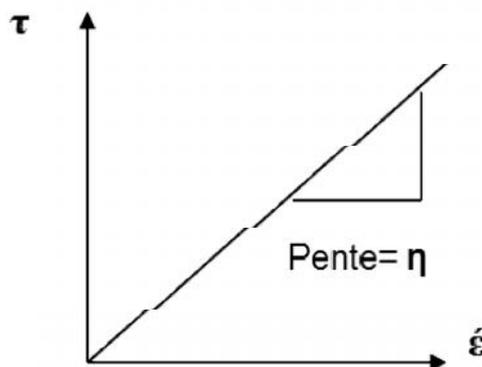


Figure 6 : Rhéogramme d'un liquide Newtonien
(COUARRAZE ET GROSSIORD, 1991).

Un fluide est dit non Newtonien ou non linéaire si sa viscosité dépend de la contrainte de cisaillement appliquée. Il peut être selon COUARAZE ET GROSSIORD, (1991) et ROUDOT, (2002) :

-rhéofluidifiant où ses molécules structurales s'alignent progressivement dans le sens de l'écoulement au fur et à mesure que la vitesse de cisaillement augmente, favorisant ainsi l'écoulement des différentes couches de liquide. C'est le cas du sang, des polymères liquides à longue chaîne et des jus de fruits.

-rhéoépaississant caractérisé par l'augmentation de sa viscosité suite à l'augmentation de la contrainte de cisaillement. Ceci entraîne un gonflement du liquide dont ses particules étaient enrobées préalablement par une pellicule de solvant qui joue le rôle de lubrifiant. C'est le cas de certains amidons dans l'eau.

-plastique (corps de Bingham ou corps de Casson) où le gel à étudier est cassé par exemple à l'aide d'une baguette pleine en verre, homogénéisé manuellement puis une goutte est déposée entre cône d'une inclinaison inférieure à 5° et un plan de diamètre de 30 à 50 mm. Une vitesse de cisaillement est appliquée pendant un temps donné, puis la réponse est obtenue sur l'écran du système de mesure sous forme d'un rhéogramme (figure 7) où la contrainte τ (Pa) est fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\epsilon}$ (1/s). Le point d'intersection de la droite du graphe avec l'axe des ordonnées détermine le seuil d'écoulement τ_c exprimé en (Pa). Au dessous de ce seuil, l'écoulement n'est pas possible. Autrement dit, lorsqu'ils sont soumis à une contrainte très faible, leur viscosité est tellement forte qu'ils ne peuvent pas s'écouler. Leur viscosité diminue ensuite si une contrainte supérieure au seuil est appliquée (ZOON *et al.*, 1988, O'CALLAGHAN *et al.*, 2000 ; VLIET *et al.*, 2004).

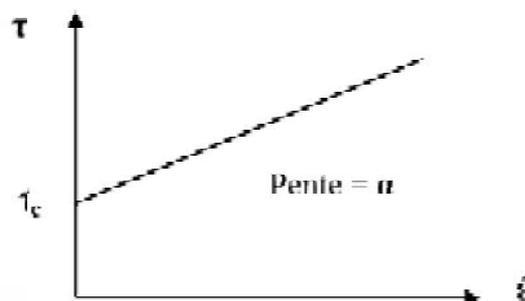


Figure 7 : Rhéogramme d'un corps de Bingham (COUARAZE et GROSSIORD 1991).

Ces produits peuvent être modélisés par la loi de Bingham. Leur rhéogramme est alors linéaire $\tau = \alpha \dot{\epsilon} + \tau_c$ avec τ : contrainte de cisaillement ; $\dot{\epsilon}$: dérivée par rapport au temps de la déformation ; τ_c : Seuil d'écoulement ; α : viscosité plastique.

2-5-5-Viscoélasticité

Le régime harmonique aussi dit sinusoïdal détermine le comportement viscoélastique des corps aussi bien solide que liquide. Les mesures rhéologiques dynamiques en régime sinusoïdal appliquées sont non destructives. Elles sont conduites dans un intervalle de linéarité de la viscoélasticité du gel où la déformation est très faible ($\leq 1\%$). Un balayage de contrainte τ [0-100] est effectué à une fréquence constante pour déterminer l'intervalle de linéarité de la viscoélasticité (G' , G''), puis un balayage de fréquence [0-10] Hz pour une contrainte constante est appliquée pour étudier le comportement viscoélastique du gel. L'étude de la viscoélasticité dans le domaine de faible déformation est pour éviter toute destruction de la matrice du gel (ZHOU et MULVANEY, 1998, KUDRYASHOV *et al.*, 2000).

Dans un rhéomètre à cône/plateau, (un cône d'angle Ψ très faible $<5^\circ$) (figure 8), l'échantillon est soumis à des mouvements laminaires de cisaillement d'amplitude, variant sinusoïdalement dans le temps à une fréquence angulaire (ω) déterminée. Un capteur de force permet la mesure du couple G' (module élastique ou module de conservation) qui est une mesure de l'énergie stockée pendant un cycle d'oscillation et G'' (module de viscosité ou module de perte) qui est une mesure de l'énergie dissipée par cycle d'oscillation transmis par l'échantillon ainsi que l'angle de perte (déphasage) δ entre la déformation appliquée et la contrainte. Ces informations sont recueillies et données sous forme d'un rhéogramme qui traduit et interprète le comportement viscoélastique du gel et l'angle de perte δ en fonction de la fréquence (Hz) sous les conditions opératoires (LUCEY *et al.*, 1997, LUCEY *et al.*, 2000, PHADUNGATH, 2005).

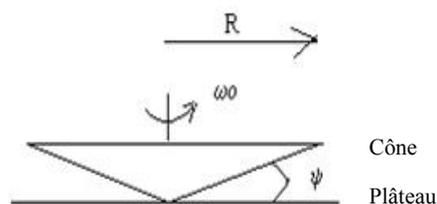


Figure 8 : Présentation schématique du système cône plateau d'un rhéomètre (COUARAZE et GROSSIORD, 1991).

2-5-6-Viscosité

La viscosité apparente du lait après addition d'une enzyme coagulante est soumise à une mesure rhéologique en régime permanent suite à l'application d'une vitesse de cisaillement permettant de suivre l'évolution et la formation du gel. Ceci est effectué dans un rhéomètre rotatif cylindrique où la substance à étudier est emprisonnée entre deux cylindres co-axiaux de rayon r_1 et r_2 (figure 9). Le mouvement laminaire de cisaillement est obtenu en communiquant à l'un des cylindres un mouvement de rotation uniforme, l'autre cylindre demeurant immobile. La substance se décompose en couches animées de vitesses angulaires différentes. Par suite du mouvement des couches les unes par rapport aux autres, il apparaît en tout point de l'échantillon une vitesse de frottement entre les différentes couches de l'échantillon traduisant ainsi l'évolution de la viscosité apparente de l'état sol (lait) à l'état gel. (COUARAZE et GROSSIORD, 1991 ; GROSSIORD et QUEMADA 2002 ; KLANDAR *et al.*, 2004).

La viscosité dynamique d'un fluide η exprimée en Pascal secondes (Pas) définit l'état d'un fluide dont les molécules sont freinées dans leur déplacement par des interactions ou des associations moléculaires plus ou moins intenses. Elle exprime la résistance à l'écoulement lamellaire uniforme et le frottement interne qui résulte du glissement d'une couche de fluide sur une autre sans transfert de matière. La viscosité implique l'existence de l'écoulement lamellaire dans lequel le glissement d'une couche du liquide sur l'autre s'effectue sans transfert de matière. La viscosité est liée aux interactions de Van der Waals existant au sein des fluides (LUCEY et SINGH, 1997).

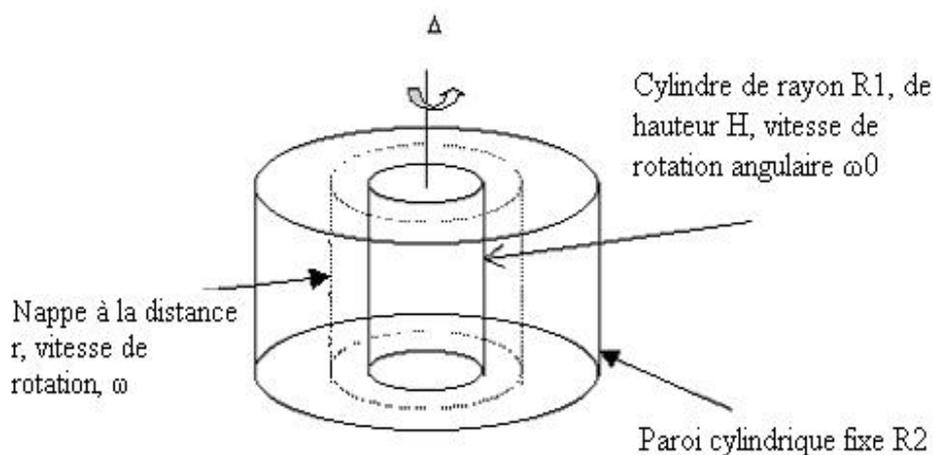


Figure 9 : Rhéomètre à cylindres rotatifs (COUARAZE et GROSSIORD, 1991).

2-5-7-Fermeté

La fermeté est définie comme la force maximale supportée par un corps en général, viscoélastique. Au-delà, on assiste à la rupture du réseau du corps à analyser et le résultat est caractérisé par le point de rupture ou le seuil de rupture. Le principe de la mesure étant d'obtenir un résultat dépendant à la fois de la compression et du cisaillement (ROUDOT, 2002). La compression uniaxiale effectuée au moyen d'un texturomètre, est un test rhéologique très utilisé sur les gels en vue de déterminer leur point rupture exprimé conventionnellement en Newton (N) ou en Kilogramme force (Kgf). Cette force est appliquée au moyen d'une sonde cylindrique où le diamètre est généralement supérieur à celui de l'échantillon testé. La sonde est enfoncée dans l'échantillon causant ainsi la déformation ou la rupture du produit par fragilisation des forces responsables de la cohésion du gel. En effet, l'échantillon est comprimé avec une force comprise entre 60 et 90 % de son poids. L'enregistreur trace la courbe des déformations de l'échantillon en fonction du temps où le maximum de la force exprimée en Newton (N) ou en Kilogramme force (Kgf) détermine le point de rupture du gel (SALVADOR et FISZMAN 1998, ROSENTHAL, 1999).

2-6-Microstructure des gels

2-6-1-Intérêt de la microscopie électronique

La microscopie électronique utilise un faisceau de particules d'électrons pour illuminer un échantillon et en créer une image très agrandie. La microscopie électronique a un plus grand pouvoir de résolution que la microscopie optique qui utilisent des rayonnements électromagnétiques et peuvent obtenir des grossissements beaucoup plus élevés allant jusqu'à 2 millions de fois, alors que la meilleure microscopie optique est limitée à grossissement de 2000 fois. Les deux types de microscopies électronique et optique ont une résolution (pouvoir séparateur du microscope) limite, imposée par la longueur d'onde du rayonnement qu'ils utilisent. La résolution et le grossissement plus grands de la microscopie électronique sont dus au fait que la longueur d'onde d'un électron (longueur d'onde de « DE BROGLIE ») est beaucoup plus petite que celle d'un photon de lumière visible. La microscopie électronique utilise des lentilles électrostatiques et électromagnétiques pour former l'image en contrôlant le faisceau d'électrons et le faire converger sur un plan particulier par rapport à l'échantillon. Ce mode est similaire à la façon où la microscopie optique utilise des lentilles en verre pour converger la lumière sur ou au travers de l'échantillon pour former une image (PAQUETON et RUSTE, 2006).

2-6-2-Principales microscopies électroniques

Il existe deux types de microscopies électroniques :

- **à transmission** : ils ne permettent d'observer que des échantillons d'épaisseur suffisamment faible pour être transparents aux électrons (quelques dizaines de nanomètres).
- **à réflexion** : opère à la surface d'objets massifs.

Ces microscopies sont dites à balayage lorsque l'image est obtenue point par point (6 à 10 nm). Il existe principalement la microscopie électronique à balayage, la microscopie électronique en transmission, la microscopie électronique à transmission à balayage et la microscopie électronique en transmission.

2-6-2-1-Microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour *Scanning Electron Microscopy*)

Elle est basée sur le principe des interactions électrons-matière, capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon. Un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémettent des électrons secondaires rétrodiffusés. Ces derniers sont analysés par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface. La figure 10 illustre la microstructure de micelle de caséine vue par microscopie électronique à balayage.

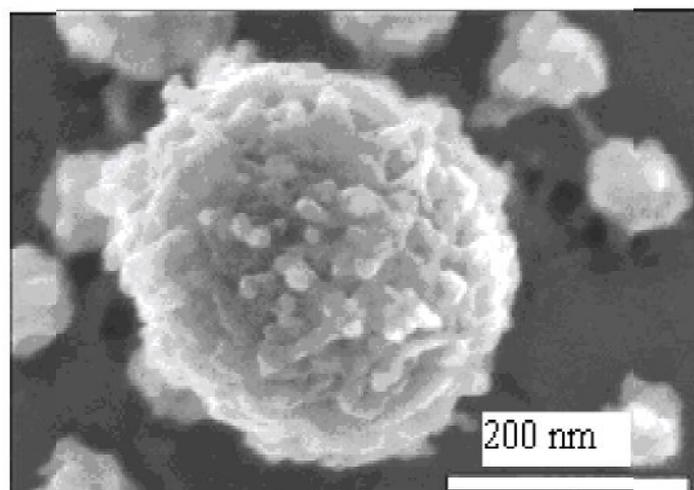


Figure 10 : Micrographe électronique par MEB d'une micelle de caséine (DALGLEISH *et al.*, 2004).

La microscopie électronique à balayage très utilisée car elle est rapide et non destructive si la surface de l'échantillon est conductrice. Si cette surface n'est pas suffisamment conductrice alors il est nécessaire de métalliser l'échantillon en le recouvrant d'un film de 30 nm d'or environ. Cette métallisation permet l'évacuation des charges créées par le bombardement électronique. Cette microscopie est employée dans des domaines allant de la biologie aux sciences des matériaux. Elle permet de visualiser la surface de structures massives et même l'observation dans les profondeurs d'un relief, l'échantillon apparaissant en volume. C'est ainsi que la structure et l'évolution de gels, de mousses ou d'émulsions sont dévoilées. La résolution se situe entre 0,4 nanomètre et 20 nanomètres (FAERBER, 2004, PAQUETON ET RUSTE, 2006).

2-6-2-2-Microscopie électronique en transmission (MET ou TEM pour *Transmission Electron Microscopy*).

Le principe repose sur la transmission d'un faisceau d'électrons d'une longueur d'onde de 1 picomètre (10^{-12} m) à travers un échantillon très mince (de 10 à 100 50 nm) observé en transparence et suivant la direction de l'amincissement. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution est de l'ordre de 0,3 nm. Les applications de la microscopie électronique couvrent un très vaste domaine, de l'observation d'échantillons biologiques, comme le noyau des cellules à l'analyse d'échantillons industriels dans la métallurgie ou l'industrie des semi-conducteurs (MURPHY, 2001, SKOOG *et al.*, 2003).

2-6-2-3-Microscopie électronique en transmission à balayage (STEM *scanning transmission electron microscopy*).

Cette technique consiste à focaliser le faisceau électronique en une sonde électronique aussi petite que possible (de l'ordre d'une fraction de nanomètre) et à donner à cette sonde un mouvement de balayage qui explore l'échantillon point par point. Elle est similaire à celle utilisée en microscopie électronique à balayage, sauf qu'ici le volume d'interaction est beaucoup plus petit, étant donné que l'échantillon est mince. Il est possible de dresser une cartographie chimique de l'échantillon, soit en analysant les rayons X émis par les atomes sous l'effet des électrons, soit en effectuant des études spectrales des pertes d'énergie. La résolution de cette technique est de l'ordre de 0,8 Ångström. Elle est appliquée en cristallographie et en métallographie (GOODHEW *et al.*, 1998, SKOOG *et al.*, 2003).

2-6-2-4-Microscopie à réflexion

La microscopie en réflexion permet d'examiner des objets opaques, ou trop épais pour la transmission. Dans le microscope électronique par réflexion, comme dans le microscope électronique en transmission, un faisceau d'électrons est incident sur une surface mais, au lieu d'utiliser la transmission (MET) ou des électrons secondaires (SEM), c'est le faisceau réfléchi d'électrons dispersés par élasticité qui est détecté. Cette technique est généralement associée à la Reflection High Energy Electron Diffraction (RHEED) et à la réflexion à haute énergie du spectre de perte (RHELs) (AYACHE *et al.*, 2007).

3-ENZYMES COAGULANTES

3-1-La présure

La dénomination présure est réservée à l'extrait soit liquide ou pâteux, soit pulvérisé ou comprimé après dessiccation provenant de la macération de caillettes de jeunes ruminants non sevrés. Les enzymes gastriques ainsi extraites appartiennent à la catégorie des endopeptidases actives à pH acide appelées protéases à aspartate ou encore protéases acides.

La présure contient essentiellement deux protéases, l'une majeure constituée de chymosine (EC 3.4.23.3) et l'autre mineure constituée de pepsine bovine appelée pepsine A ou pepsine-II (EC 3.4.23.1). La présure contient aussi une autre protéase synthétisée au niveau de la caillette en faible quantité ayant des propriétés intermédiaire entre la chymosine et la pepsine. Elle est appelée gastricine (EC 3.4.23.4) ou encore pepsine B ou pepsine-I. L'extrait des caillettes est donc un mélange des trois enzymes précédentes. Les présures commercialisées en France contiennent au moins 520 mg L⁻¹ de chymosine active et un rapport chymosine/pepsine A supérieur à 1,38 (ALAIS, 1984, CHOISY *et al.*, 1997).

L'extraction de la présure nécessite la préparation des caillettes qui doivent être collectées, nettoyées, séchées puis conservées. Au moment de leur utilisation, elles doivent être découpées en fines lanières puis macérées dans une solution de chlorure de sodium (10%) et de benzoate de sodium (1%). Après 24 h de macération, la solution est ajustée avec de l'acide benzoïque au pH 4,3 pour activer l'enzyme à une température allant de 20 à 25 C°. Les macérations trop longues provoquent le passage en solution d'une plus grande quantité de protéines et l'enrichissement en germes microbiens. Afin d'éliminer les protéines inactives et les mucilages en suspension par une défécation, le bouillon est additionné de phosphate trisodique. Cette opération élimine aussi une partie des

microorganismes ce qui est important dans un milieu souvent très chargé en germes. Le bouillon est laissé ensuite au repos pendant deux heures, puis le pH est remonté par l'hydroxyde de sodium jusqu'à pH 5,5-5,6. La défécation et le réajustement de pH doivent se faire sous une forte agitation. Le jus brut est alors filtré et est en général de couleur « jaune-or ». Un (1) gramme de la solution de présure (après macération de la caillette et filtration) peut coaguler de 2 à 4 litres de lait. Dans 1 kg de l'extrait de présure, il y a environ 0,7 grammes d'enzymes actives, le reste est de l'eau et du sel et parfois du sodium benzoate (E211) utilisé comme conservateur à des proportions de 0,5 % - 1 % (ALAIS, 1984).

Ainsi, la présure est principalement caractérisée en technologie fromagère par sa force. Celle-ci est définie d'après Soxhlet comme étant le nombre de volume de lait frais de mélange, coagulé par un volume de présure en 40 minutes à 35°C. A titre d'exemple, un litre d'extrait de présure de force de 1/10000 est obtenu à partir de 1,5 à 2 caillettes de veau de 60g. Pour assurer la conservation de ce produit, l'addition de chlorure de sodium à raison de 16 à 18 % (m/v) est autorisée. Pratiquement, 1 kg de fromage affiné contient environ 0,0003 grammes de présure (VEISSEYRE, 1979, ALAIS, 1984).

La présure commerciale liquide a habituellement une force de 3.10^3 à 10^5 . En poudre, elle est de 10^5 à $1,5 10^5$ et à l'état cristallisé, elle atteint 10^7 (MAHAUT *et al.*, 2000).

3-2-Les succédanés de la présure

La coagulation du lait est une étape importante pour la préparation du fromage. L'ancien coagulant utilisé en fromagerie est la présure (CUVELIER, 1993). Cependant, et à la suite d'une pénurie mondiale croissante, de nombreuses recherches ont été développées pour sélectionner des succédanés utilisables industriellement d'origines diverses : microbiennes (HASHEM, 2000, YOSHIMASU *et al.*, 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2004; ALAM *et al.*, 2005), végétales (ROA *et al.*, 1999; BARROS *et al.*, 2001 ; LAMAS *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2003) et animales (RAMPILLI *et al.*, 2005; EL-BELTAGY *et al.*, 2004).

Les végétaux ont été les premiers objets de recherche en vue d'isoler les enzymes coagulantes. Celles-ci sont extraites par macération, de divers organes de plantes supérieures. Parmi les espèces européennes, on peut citer le gaillet (*Gallium verum*) et le

cardon (*Cynara cardunculus*) qui ont été et sont encore utilisés dans des fabrications de fromages fermiers. En effet, les fleurs séchées de *Cynara cardunculus* ont été employées avec succès pendant des centaines d'années notamment en Portugal et en Espagne dans la préparation de certaines variétés de fromages traditionnels tels que *Serra da Estrela*, *La Serena*, *Guía* et *Los Pedroches* (MACEDO *et al.*, 1993, VIOQUE *et al.*, 2000, SOUSA et MALCATA, 2002).

D'autres enzymes coagulantes ont été extraites à partir de plantes tropicales. Les plus connues sont les ficines, extraites du latex du figuier (*Ficus caricas*), la papaïne, extraite des feuilles du papayer (*Carica papaya*), et la broméline, extraite des tiges d'ananas (*Ananas comasus*). La calotropine enzyme extraite de la plante *Calotropis procera* est utilisée comme agent coagulant par les éleveurs « peulh », en particulier au Bénin et au Nigéria dans la fabrication d'un fromage traditionnel appelé « Wagashi » (AWORH et NAKAI, 1986 ; AWORH et MULLER, 1987). Les sucs de ces nombreuses espèces coagulent le lait mais les enzymes que l'on extrait ont une activité protéolytique assez intense par rapport à leur activité coagulante. Ces résultats se traduisent par certains inconvénients technologiques, marqués principalement par la baisse dans le rendement fromager et l'apparition de goût amer dans le produit fini (CUVELIER 1993, RAMET, 1997a).

D'autre part, de multiples enzymes d'origine bactérienne et fongique ont été étudiées en tant que substituts de présure. Pour les bactéries, c'est les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* qui ont été plus particulièrement explorés. Leur aptitude à la fromagerie est meilleure que celle des enzymes d'origine végétale. Néanmoins, les enzymes d'origine fongique ont donné encore des résultats meilleurs souvent comparables et parfois supérieurs à ceux obtenus avec la présure. Plusieurs préparations sont déjà commercialisées sur le marché international notamment au USA et au Japon. Ces préparations *Mucor* proviennent de trois genres de moisissures : *Endothia parasitica* (Ep) ; *Mucor pusillus* (Mp) et *Mucor miehei* (Mm) (RAMET, 1997a).

A côté des succédanés de présure d'origine végétale et microbienne, existe 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 différente espèce animale, principalement bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire. Ces différentes pepsines sont parfois utilisées en mélange avec la présure à des proportions

variables qui dépendent du type de fromage à préparer (ALAIS, 1984, RAMET, 1997a). Précisons, que les pepsines scindent les liaisons peptidiques des acides aminés à noyaux aromatiques et des acides aminés hydrophobes. Leurs sites actifs comportent deux aspartates ayant des réactivités chimiques différentes (CUVELIER 1993 ; RAMET, 1997a, KAMOUN *et al.*, 2003).

En outre, des recherches ont montré que la muqueuse gastrique de certains mammifères marins étudiés type phoque (*Phoca vitulina*), requin (*Carcharhinus leucas*) et dauphin (*Delphinus delphis*) contient des protéases en particulier la chymosine. En effet, elles coagulent le lait sur une large gamme de pH et à des températures allant de 20 à 23°C. De plus, elles ont un rapport d'activité coagulante par rapport à l'activité protéolytique, relativement élevé ce qui favoriserait son utilisation dans la fabrication de fromage (MARTIN *et al.*, 1982, HAARD, 1992). Aussi, un ensemble de résultats a montré que les enzymes protéolytiques extraites des viscères de certaines espèces de poissons : Merlan (*Merlangius merlangus*), Raie noire (*Raja batias*), Tacaud (*Trisopterus luscus*), Sole (*Solea vulgaris*), Raie fleurie (*Raja naevus*), Chinchard (*Trachurus trachurus*), Raie piquante (*Raja clavata*), Limande (*Limanda limanda*), Lieu jaune (*Pollachius pollachius*), Limande-sole (*Microstomus kitt*), Sprat (*Sprattus sprattus*), Carrelet (*Pleuronectes platessa*), et Roussette (*Scyliorhinus canicula*) possèdent des activités intéressantes quant à l'hydrolyse des caséines, notamment de la fraction K. Ces propriétés permettraient d'envisager, sous certaines conditions, leurs utilisations en industrie fromagère (GUERARD, 1987).

Rappelons que les autres peptidases digestives, trypsine et chymotrypsine ne conviennent pas à la coagulation du lait car leur activité protéolytique est non spécifique. On outre, leur pH optimum d'action se situe dans la zone alcaline. De ce fait, un succédané doit présenter des propriétés physicochimiques et technologiques compatibles avec l'environnement fromager. Il importe que l'activité protéolytique de l'enzyme soit faible, afin d'éviter une hydrolyse trop importante des différentes fractions caséiniques qui entraînerait des chutes de rendements et pourrait être responsable de l'apparition de défauts de texture et de flaveur (CUVELIER 1993 ; RAMET, 1997a).

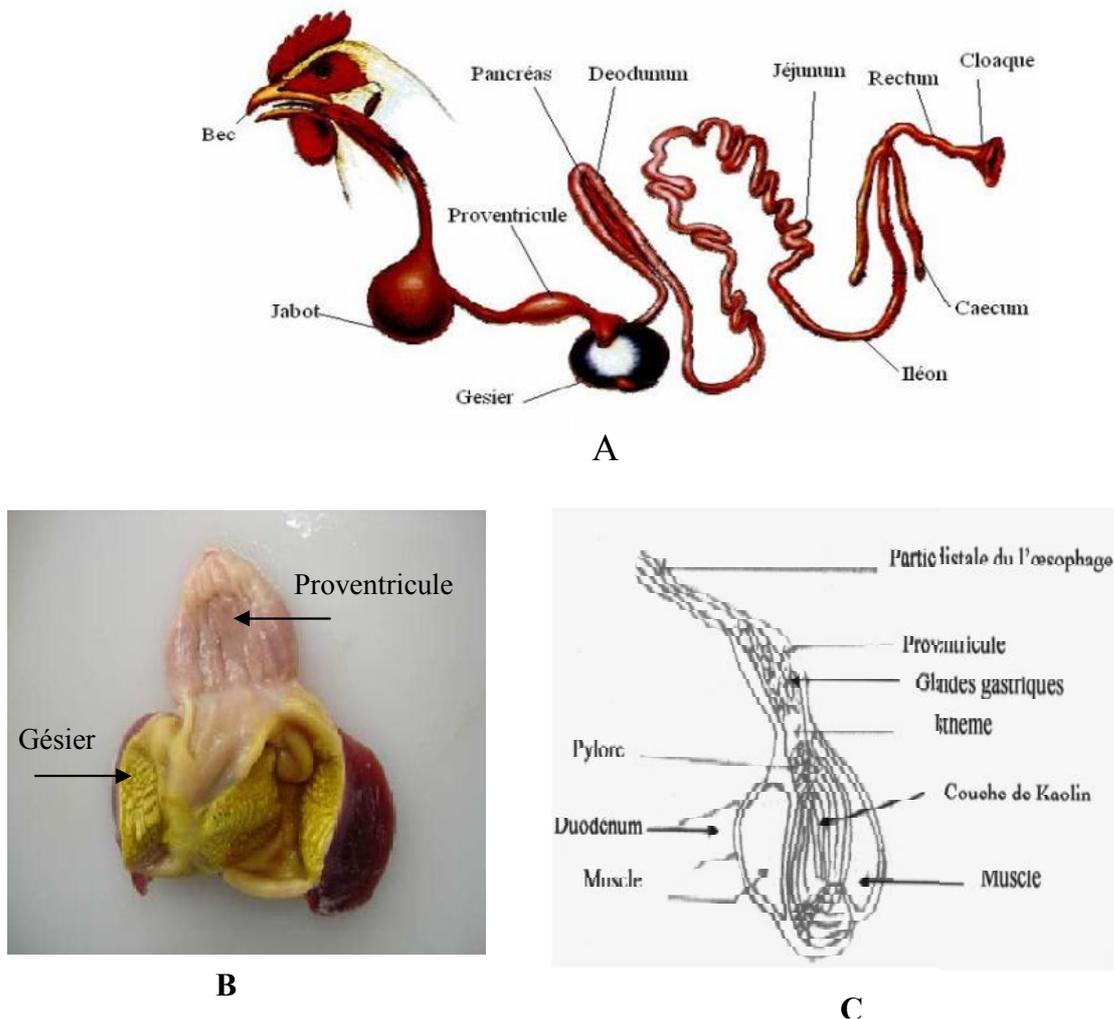
3-3-La pepsine aviaire

3-3-1-Anatomie du tractus digestif du poulet

Le développement du tractus gastro-intestinal est un phénomène prioritaire dans le développement du poussin. La taille et le poids des trois principales portions de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon) et des organes annexes (foie, pancréas, gésier, proventricule) augmentent significativement durant la première semaine de vie du poussin. Quelque soit l'espèce aviaire, l'appareil digestif, (figure 11) se distingue globalement par :

-un bec remplaçant les lèvres des mammifères ; deux estomacs mécanique et chimique et une partie terminale ou cloaque dans lequel aboutit à la fois le rectum, les voies urinaires et génitales.

Les deux estomacs sont spécifiés par : le ventricule succenturié, ou proventricule considéré comme l'estomac sécrétoire chimique (figure 11 A, B, C).



C'est un enflement fusiforme de 3 cm de long en moyenne, situé au dessus du gésier et de nature glanduleuse. Il est revêtu d'un épithélium de cellules cylindriques. Les alvéoles des glandes tubulaires sont bordées de cellules spécialisées sécrétant à la fois de l'acide chlorhydrique et une proenzyme protéolytique, le pepsinogène. Le système de canaux collecteurs s'ouvrant sur des petites papilles, apporte le suc gastrique dans la lumière de proventricule. Le deuxième estomac est le gésier ou estomac mécanique appelé aussi estomac broyeur (figure 11 B, C). Il écrase les aliments par un effet de meule. Les deux estomacs ont des rôles complémentaires. Le premier a une fonction sécrétoire, le second exerce surtout une action mécanique. Dans le proventricule des oiseaux, de l'acide chlorhydrique est sécrété. Le contenu de cet organe a donc un pH faible, environ 2,5 chez le poulet. Cette acidité entraîne une dénaturation des protéines et permet d'activer les pepsinogènes qui sont sécrétés par ce même organe. Dans le gésier des oiseaux, les pepsines commencent alors l'hydrolyse des protéines (ALAMARGOT, 1982 ; LARBIER et LECLERCQ, 1992).

3-3-2 Propriétés de la pepsine et du pepsinogène de poulet

3-3-2-1-Stabilité

Le pepsinogène de poulet est stable à 25 °C à des valeurs de pH comprises entre 7 et 10,5 et est dénaturé dans des solutions fortement alcalines. Cependant, il est stable dans la solution tampon phosphate (0,1 M) à pH 7,6 ou dans la solution tampon Tris 0,03 M, à pH 7,5. A des températures supérieures à 55 °C, le pepsinogène est inactif. Quant à la pepsine, sa stabilité est notée à 25°C à des valeurs de pH comprises entre 1 et pH 8 et est désactivée dans des solutions fortement alcalines avec une autolyse concomitante qui s'accroît avec l'augmentation du pH et de la température (BOHAK, 1970). Selon GREEN et LLEWELLIN (1973), le pepsinogène est stable dans la solution tampon de borate de sodium 0,05 M, à pH 7,6 et la pepsine dans la solution tampon de phosphate de sodium 0,02 M pH 6,0 pendant plusieurs mois à -20°C. La forme active de la pepsine est libérée de son zymogène, c'est-à-dire, le pepsinogène en présence d'acide chlorhydrique dans l'estomac (pH 2 à 4) (DONTA et VANVUNAKIS, 1970 a,b).

3-3-2-2-Composition et poids moléculaire

La composition en acides aminés des fractions de pepsinogènes A, D, et C et de leurs formes actives pepsines (tableau 5) est obtenue après sédimentation appliquée à haute vitesse suivie de séparation électrophorétique selon le poids moléculaire par SDS-PAGE. Le pepsinogène B encore hétérogène est obtenu à des taux très infimes.

A partir des données obtenues par analyse immunochimique, la composition des fractions de pepsinogènes A et D semble être identique, cependant elle est différente de celle du pepsinogène C. Les pepsines A et D ressemblent fortement à leurs précurseurs, sauf qu'ils sont de moins de 15 résidus d'acides aminés. En outre, les pepsines A et D ont montré une grande similitude entre eux vis à vis de leurs précurseurs par détection immunochimique des petites différences conformationnelles dans les molécules (DONTA et VANVUNAKIS, 1970a).

Tableau 5 : Composition en acides aminés des pepsinogènes et des pepsines de poulet (DONTA et VANVUNAKIS, 1970a)

Pepsinogènes				Pepsines		
Acides aminés	A	D	C	A	D	C
Lys	17	15	5	11	10	3
His	7	7	3	5	5	1
Arg	7	7	3	6	6	2
Asp	44	44	41	44	44	35
Thr	28	28	33	31	32	32
Ser	39	40	40	44	46	39
Glu	32	29	48	31	29	43
Pro	19	20	22	19	19	17
Gly	33	34	40	35	34	39
Ala	21	20	22	2	18	19
Demi-Cys	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
Val	27	28	22	27	28	21
Met	10	10	9	10	10	10
Ile	24	24	24	25	26	23
Leu	30	29	30	29	29	28
Tyr	24	27	24	24	24	20
Phe	25	22	27	23	22	24
Poids Moléculaire (Daltons)	42000	42000	42000	42000		38500

La pepsine se caractérise par une teneur élevée en acides aminés acides, β -hydroxylé et par la présence d'un petit nombre de résidus basiques. Elle a une forme bilobée avec un domaine N-terminal et un domaine C-terminal séparés par une fente

perpendiculaire au plus grand diamètre (figure 12). Cette fente contient les 2 résidus aspartyls impliqués dans le mécanisme catalytique et constitue un site de liaison du substrat de grande taille, capable de recevoir environ 6 résidus (AL-JANABI *et al.*, 1972, CHOISY *et al.*, 1997).

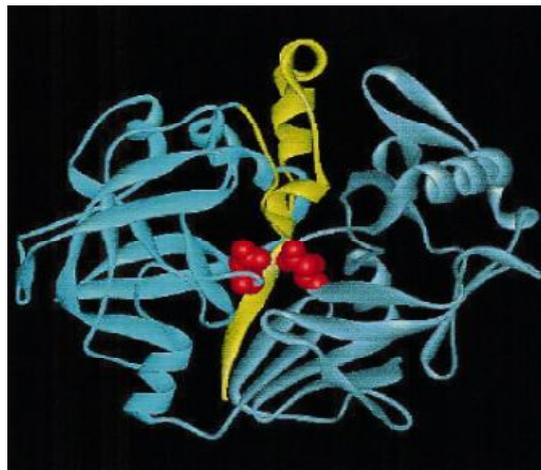


Figure 12 : Structure tertiaire du pepsinogène de porc (RICHTER *et al.*, 1998).

Le fragment de l'enzyme active est représenté en bleu, le prosegment (résidus peptidiques fixés en N-terminal de l'enzyme active) en jaune et les deux sites actifs à aspartate en rouge

Un avantage cité pour la pepsine de poulet c'est qu'elle est l'unique protéase qui contient un seul groupement thiol par molécule de pepsine ou par molécule de pepsinogène. Ce groupement apparaît réactif et réagit avec p-chloromercuribenzoate. Ceci permettrait l'étude cristallographique par rayons X de la forme active et le zymogène de cette enzyme et la présente sous forme modèle pour les protéases gastriques en général (GREEN et LLEWELLIN, 1973).

3-4-Modes de conservation

3-4-1-Par lyophilisation

La lyophilisation ou cryodessiccation est un procédé de séchage dont le principe consiste à sublimer la glace d'un produit congelé. L'eau de produit passe donc directement de l'état solide à l'état de vapeur. Le cycle de séchage se déroule en deux phase : la phase de sublimation proprement dite, encore appelée « dessiccation primaire », qui élimine environ 90% de l'eau, ce qui amène le produit à une humidité de l'ordre de 15% ; la phase de « désorption » ou « dessiccation secondaire », qui élimine les 10% d'eau liée restant et qui peut aboutir à un produit d'une humidité atteignant 2% (MAFART, 1991).

Quand une protéine est lyophilisée, les molécules ne conservent qu'une hydratation extrêmement réduite liée à la structure protéique. La notion de pH dans ces conditions n'a plus grand sens. Quand on disperse l'enzyme en poudre dans un solvant organique contenant une très petite quantité d'eau, juste nécessaire pour l'hydratation des molécules de protéine, on constate que l'activité récupérée dépend des conditions de pH qui régnaient avant dessiccation. Cela mène à dire que la protéine, même complètement déshydratée emporte avec elle l'état d'ionisation dans lequel elle se trouvait, et qui concerne l'état de protonation ou de déprotonation de certains groupes (PELMONT, 1993).

3-4-2-Par séchage sous vide

Le fait de sécher sous vide est idéal pour le produit qui serait endommagé ou changé, si exposé à de hautes températures. Le procédé est avantageux par le fait que l'évaporation de l'eau est facilitée à pression réduite. Le vide enlève l'humidité en prévenant l'oxydation qui peut se produire quand un produit se combine avec l'air. La principale attraction de séchage sous vide est que par l'abaissement de la température de vaporisation de l'eau par le vide, l'eau libre peut être vaporisée et enlevée à des températures non préjudiciables aux molécules sensibles à la chaleur. Le taux de séchage est donc augmenté, sans risques de défauts de séchage, qui se produisent à des températures plus élevées (SIMPSON, 1987, CHEFTEL *et al.*, 1992).

3-4-3-Principaux facteurs de stabilité des enzymes

Le premier souci des biochimistes depuis qu'ils ont commencé à travailler sur les enzymes est la perte de leurs activités. La raison est que les enzymes sont des molécules protéiques souvent sensibles, lorsqu'elles sont à l'extérieur de leur environnement naturel protecteur. En effet, elles sont soumises à un ensemble de stress auquel, elles ne peuvent pas résister. Par conséquent, la stabilité peut être accomplie par simulation des conditions de l'activité de l'eau relativement basse. Certaines enzymes sont considérablement plus exigeantes que d'autres et doivent être gardées à -80°C. Néanmoins, les enzymes qui se dénaturent durant la congélation peuvent être conservées dans une solution tampon contenant le glycérol. Ce dernier a l'avantage de ne pas dénaturer les enzymes et ne gèle pas aux températures de l'ordre de -20°C. Aussi, ce composant, complètement miscible dans l'eau, en forme de fortes liaisons hydrogène. Ceci baisse significativement le mouvement des molécules de l'eau et réduit par la suite, son activité. La structure ainsi

formée est plus stable et évite subséquemment le dépliement de la protéine (KENNEDY, 1987). Par ailleurs, le séchage peut changer aussi la structure secondaire de la protéine puisque son hydratation est en partie perdue. Cette hydratation pourrait être régénérée en remplaçant l'eau par un excipient, par exemple les sucres et les sucres alcool (glucose, fructose, lactose, maltose, sorbitol, etc.), qui sont capables de former des liaisons hydrogène avec la protéine. Ces substances ont un effet stabilisant et un effet protecteur vu qu'ils préservent la structure native de la protéine contre la perte de l'eau au cours du séchage (CARPENTER *et al.*, 1986 ; CARPENTER *et al.*, 1987 ; CARPENTER et CROWE ; 1989 ; IZUTSU *et al.*, 1991 ; CARPENTER *et al.*, 1993 ; GRIEBENOW et KLIBANOV, 1995; IZUTSU *et al.*, 2004 ; VASILJEVIC et JELEN, 2004).

Certaines enzymes peuvent aussi être conservées dans une suspension de cristaux de sulfate d'ammonium. Ces cristaux semblent stabiliser certaines protéines. Aussi, la forme sèche (lyophilisée) s'avère la meilleure façon pour préserver leur stabilité. D'autres part, il est à signaler la nécessité d'utiliser des milieux dont les caractéristiques sont compatibles avec la stabilité des enzymes (pH, force ionique, osmolarité, antioxydant, etc.). Pour maintenir le pH à un niveau adéquat, on inclut généralement un produit tampon dans les solutions. Le trishydroxy-méthyl-aminométhane (Tris) est très fréquemment utilisé en raison de son coût, aussi, l'hydroxyéthyl-pipérazine-éthane-sulfate (HEPES) est souvent employé. Ainsi, le PBS contient un tampon phosphate de pH 7,4 et l'osmolarité de la somme de toutes ses composantes est de 315 mOs. Le salin (NaCl 150 mM ou 0,85 %) a une osmolarité presque physiologique de 300 mOs et son pH est aux alentours de 7. Le travail à basse température ralentit les processus de dénaturation. Aussi, faut-il éviter de dénaturer les enzymes en les exposant à l'air ou en les faisant mousser, ce qui cause une dénaturation et favorise l'oxydation, particulièrement des cystéines en cystine (formation d'un lien disulfure). Une oxydation peut non seulement inactiver ou dénaturer les protéines, mais aussi causer leur agrégation si la cystéine d'une enzyme forme un lien disulfure avec celle d'une autre enzyme. L'emploi d'agents anti-oxydant comme le β -mercapto-éthanol ou le dithiothréitol est recommandé pour protéger ces enzymes particulièrement sensibles. La présence d'éthylène diamine tétra acétate (EDTA) pour chélater les ions métalliques, peut être utile car ces derniers accélèrent les réactions d'oxydation des enzymes. Les opérations d'homogénéisation mécanique et de centrifugation sont particulièrement à surveiller, car elles causent souvent une surchauffe de l'extrait (ÖSTERLUND et JANSON, 1998).

4-SITUATION AVIAIRE ET LAITIÈRE EN ALGERIE

4-1-Situation aviaire

La filière avicole en Algérie a connu un développement considérable en relation avec les politiques avicoles incitatives. Compte tenu du déficit des productions animales classiques, l'Algérie a opté pour le développement d'une production avicole intensive. Ce processus a mis fin aux importations de produits finis.

La structure actuelle de la filière avicole algérienne résulte des politiques de développement planifiées par l'état dans une perspective d'autosuffisance alimentaire. Ces politiques avicoles se résument dans les points suivants : (ONS, 2013)

1. développement d'une aviculture intensive qui doit assurer l'approvisionnement des populations urbaines en protéines animales de moindre coût.
2. développement d'un modèle d'élevage avicole intensif basé sur le recours aux technologies modernes et aux intrants avicoles industriels importés (matériel biologiques, produits vétérinaires, équipements).
3. une restructuration profonde caractérisée par l'émergence d'entreprises intégrées dans les activités avicoles ayant trait à l'élevage et à l'abattage.

La production aviaire en Algérie occupe la première place parmi les viandes des autres espèces. En effet, cette production atteint 250000 tonnes en 2011, alors que la production des autres viandes est au-dessous de 150000 tonnes (figure 13). Ceci est appuyé par la tendance croissante de la production de poulet de chair depuis 1989 jusqu'à 2011 montrée par la figure 14.

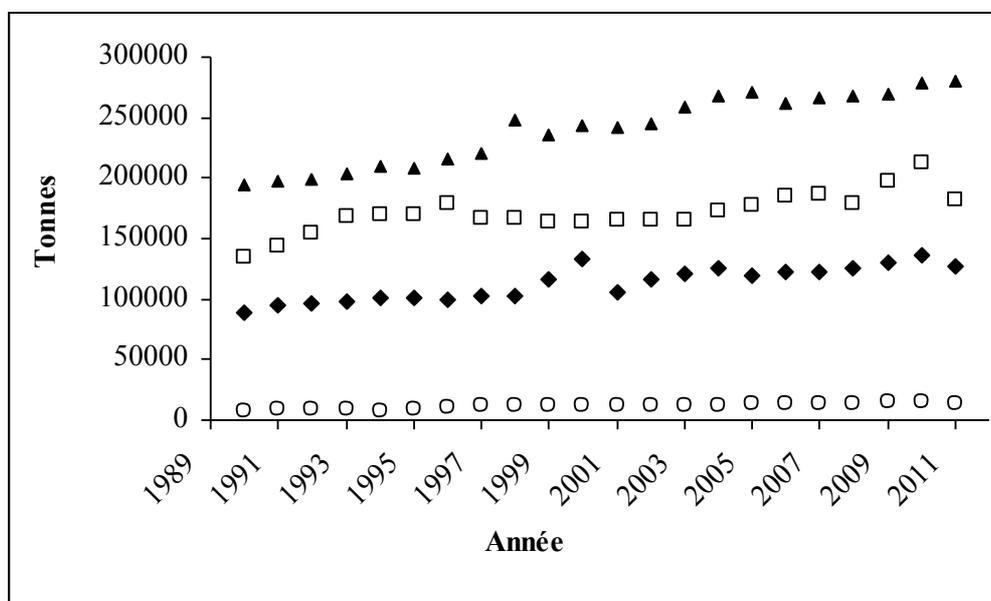


Figure 13 : Evolution de la production de viandes en Algérie. Viande de volaille (▲), viande ovine (□), viande bovine (◆) viande caprine (○), (FAOSTAT, 2013).

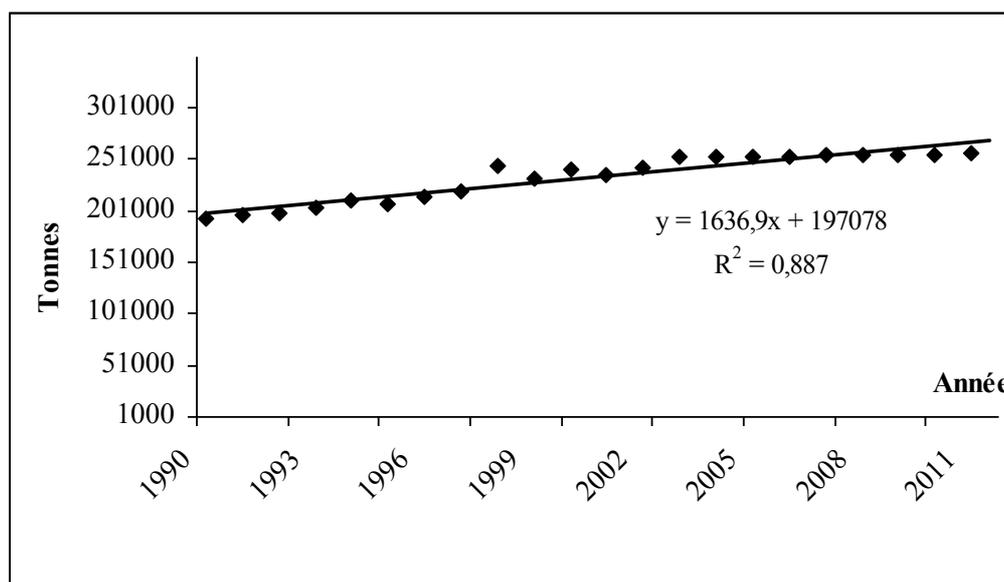


Figure 14 : Tendence de la production de poulet de chair en Algérie, (FAOSTAT, 2013).

D'autre part, la consommation de poulet de chair est passée de 7 Kg/habitant en 2005 à 12 kg/habitant en 2012. Selon la Société de gestion des participations-Productions animales (Sgp-Proda), des mesures devraient aboutir d'ici 2014 à l'augmentation du ratio de consommation de viandes blanches à 14 kg/habitant/an avec une prévision de production de 600 000-700 000 tonnes. Les moyens de production dont dispose le pays

permettent aisément d'atteindre les normes de l'OMS en matière de consommation de viande blanche pour atteindre un ratio de 20 kg/an/habitant. En effet, la filière avicole renferme d'importantes potentialités pour occuper une place stratégique dans l'économie agricole algérienne.

4-2- Situation laitière

Selon les informations données par le ministère algérien de l'agriculture et du développement rural en 2010, la moyenne annuelle de la production du lait cru, enregistrée entre 2004 et 2008 est de 1,9 milliard de litres. On prévoit à l'horizon 2014 une production de 3,2 milliard de litres, soit une augmentation de 1,3 milliard de litres en cinq ans. Il s'agit là, en outre, de l'un des plus grands défis lancés par le ministère de l'agriculture et du développement rural, à travers un programme de développement quinquennal (2009-2014) consacré spécialement pour la filière lait, et qui vise à augmenter la production laitière. Cette production provient d'un effectif de 893000 vaches laitières, dont 243000 BLM (bovin laitier moderne). En somme, ce sont 200 à 300 millions de litres de lait cru supplémentaires qui sont mis sur le marché. Notons que les importations de génisses sont passées de 12000 en 2008 à 15000 en 2009 et, pour le seul premier semestre 2010, ce sont 12700 vaches réceptionnées avec la mise de programmes de développement de transfert d'embryons et d'insémination artificielle et de mise à niveau des étables.

D'autre part, la quantité des importations de lait en poudre en 2009 a connu une diminution conséquente comparativement aux années précédentes. Sa facture est environ 350 millions de dollars contre 750 millions de dollars en 2008, marquant ainsi une baisse de 50 % environ. Le prix de la matière première sur le marché international est passé de 5000 dollars la tonne en 2008 à 2200 dollars en 2010. Cet état est attribué à une meilleure gestion des opérations d'importation, qui tient compte de la chute de la demande nationale en poudre de lait, en raison de l'intégration de lait cru dans le processus de transformation au niveau des laiteries (ONS, ONIL, 2010).

MATERIEL
&
METHODES

1-MATIERES PREMIERES

1-1-Les proventricules de poulet

Après abattage, les proventricules sont récupérés du tube digestif de poulets âgés entre 45 et 50 jours à partir d'un abattoir agréé par l'état situé à El Meridj (7 km de Constantine ville). Acheminés au laboratoire dans une glacière, les proventricules sont rincés à l'eau courante ; égouttés puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation. La figure 15 illustre la forme externe et interne du proventricule.

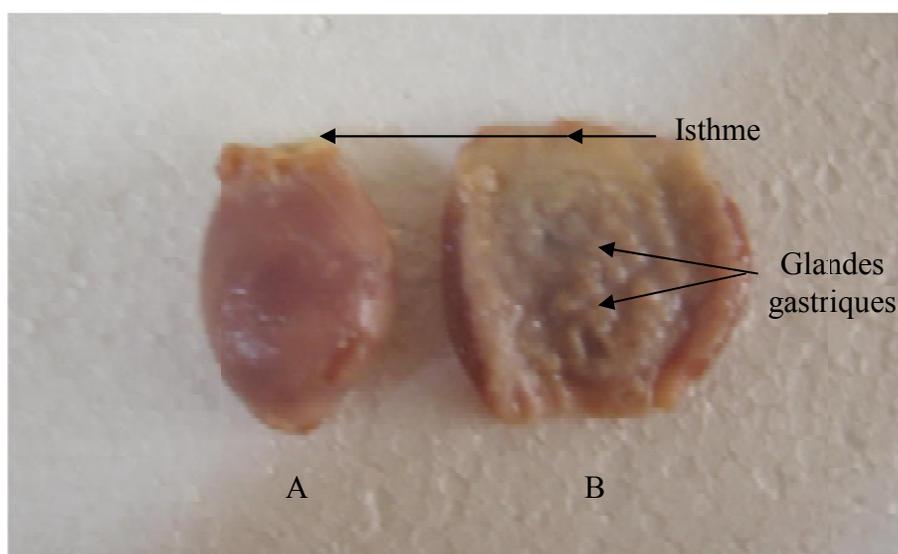


Figure 15 : Proventricule de poulet : A : avant incision ; B : après incision.

1-2-Le lait

Le lait est obtenu par reconstitution à 12 % (m/v) dans une solution de CaCl_2 (0,01M) d'une poudre de lait écrémé préparant ainsi le substrat de Berridge. Cette poudre de lait (moyen chauffage) provient de l'Ukraine (Molochansk Dairy) ayant une humidité de 3 % et une teneur en matière grasse de 0,15 % selon les descriptions de la fiche technique. Après reconstitution, le lait est conservé à 4°C pendant une nuit pour assurer 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.

2-TECHNIQUES D'ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUES

Pour déterminer les caractéristiques du substrat de Berridge et l'extrait brut de pepsine de poulet après extraction, différentes analyses physico-chimiques ont été effectuées.

2-1- Matière sèche

La matière sèche est déterminée selon la norme française V 04-207 (Anonyme, 1993). Après dessiccation à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ par évaporation d'une prise d'essai, le résidu sec obtenu par pesée jusqu'à stabilité de masse est retenu pour quantifier la matière sèche. Celle-ci est exprimée en grammes de matière sèche par unité de masse ou par unité de volume.

2-2-Cendres

Les cendres du lait sont déterminées selon la norme française V 04-208 (Anonyme, 1993). Le principe repose sur l'incinération d'une prise d'essai de lait à $525^{\circ}\text{C} \pm 25$ puis la pesée des cendres obtenues. Le résultat est exprimé en grammes de cendres par unité de masse.

2-3-Matière grasse

La matière grasse contenue dans la poudre de lait est déterminée par gravimétrie selon la norme française V 04-215 (Anonyme, 1993). Le principe est basé sur :

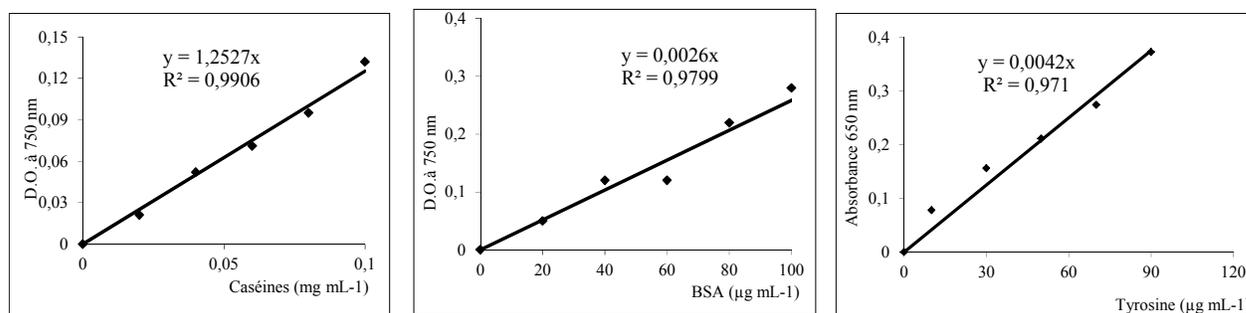
- une hydrolyse par l'acide chlorhydrique ($\rho_{20} = 1,19 \text{ g mL}^{-1}$) à chaud ;
- une séparation par filtration de l'insoluble contenant la matière grasse hydrolysée ;
- une extraction de la matière grasse par l'oxyde diéthylique. Le résultat est exprimé en grammes de matière grasse par unité de masse ou par unité de volume.

2-4-Protéines et matières azotées

2-4-1-Méthode colorimétrique selon Lowry *et al.*, (1951)

Dans la méthode de Lowry, le réactif de Folin-Ciocalteu réagit avec la tyrosine et le tryptophane, et dans une moindre mesure, avec la cystéine, l'histidine et la liaison peptidique. Une fois le réactif de Folin-Ciocalteu (PROLABO, CE) réduit, il se colore en bleu. La lecture de l'absorbance est faite à une longueur d'onde de 750 nm au spectrophotomètre (LKB Biochrom 4054, Ultrospec Plus, England).

La courbe d'étalonnage des protéines totales du lait, celle des extraits enzymatiques et des unités d'activité aspartylprotéase sont réalisées à partir de solution de caséine (LABOSI, Fisher Scientific, France), de Bovine Serum Albumin (BSA) (SIGMA-ALDRICH, Germany), et de tyrosine (LABOSI, Fisher Scientific, France) respectivement.



(A) **(B)** **(C)**
Figure 16 : Courbe d'étalonnage : **A** : des caséines, **B** : de la BSA, **C** : de la tyrosine

2-4-2-Azote total

La détermination de la teneur en azote total dans un échantillon par la méthode de Kjeldahl selon la norme française V 04-211 (Anonyme, 1993) repose sur :

- une minéralisation par chauffage en présence d'acide sulfurique concentré ($\rho_{20} = 1,83\text{g mL}^{-1}$) et en présence de catalyseurs (sulfate de cuivre et sulfate de potassium) ;
- une alcalinisation des produits minéralisés par l'hydroxyde de sodium concentré ($\rho_{20} = 1,33\text{g mL}^{-1}$) ;
- une distillation de l'ammoniac libéré puis capturé par une solution borique (4 % m/v) contenant l'indicateur rouge de méthyle (0,05 % dans l'éthanol 94-97 % v/v) qui vire du rouge dans un milieu acide au jaune dans un milieu basique ;
- une titration du distillat par l'acide sulfurique (0,1N).

Le résultat est exprimé en grammes d'azote par unité de volume ou par unité de masse du lait reconstitué.

2-5-Acidité titrable

Le principe consiste à titrer l'acidité lactique du lait reconstitué (substrat de Berridge) par l'hydroxyde de sodium (0,1N) en présence de phénolphtaléine (1g dans 100 mL d'éthanol 96%) comme indicateur de couleur de neutralisation selon la norme française V 04-206 (ANONYME, 1993). Le résultat est exprimé en en grammes d'acide lactique par unité de volume.

3-EXTRACTION DE LA PEPSINE

3-1-Le diagramme d'extraction adopté

L'extraction de la pepsine de poulet est effectuée selon le diagramme décrit par BOHAK, (1970). Les proventricules récupérés sont broyés et macérés dans une solution contenant du NaCl et du NaHCO₃. Le macérat est ensuite filtré puis activé à pH 2 pendant une demi-heure. Après activation, un ajustement du pH à 6,6 est réalisé pour tester l'activité enzymatique. Les étapes d'extraction de la pepsine de poulet sont décrites dans la figure 17.

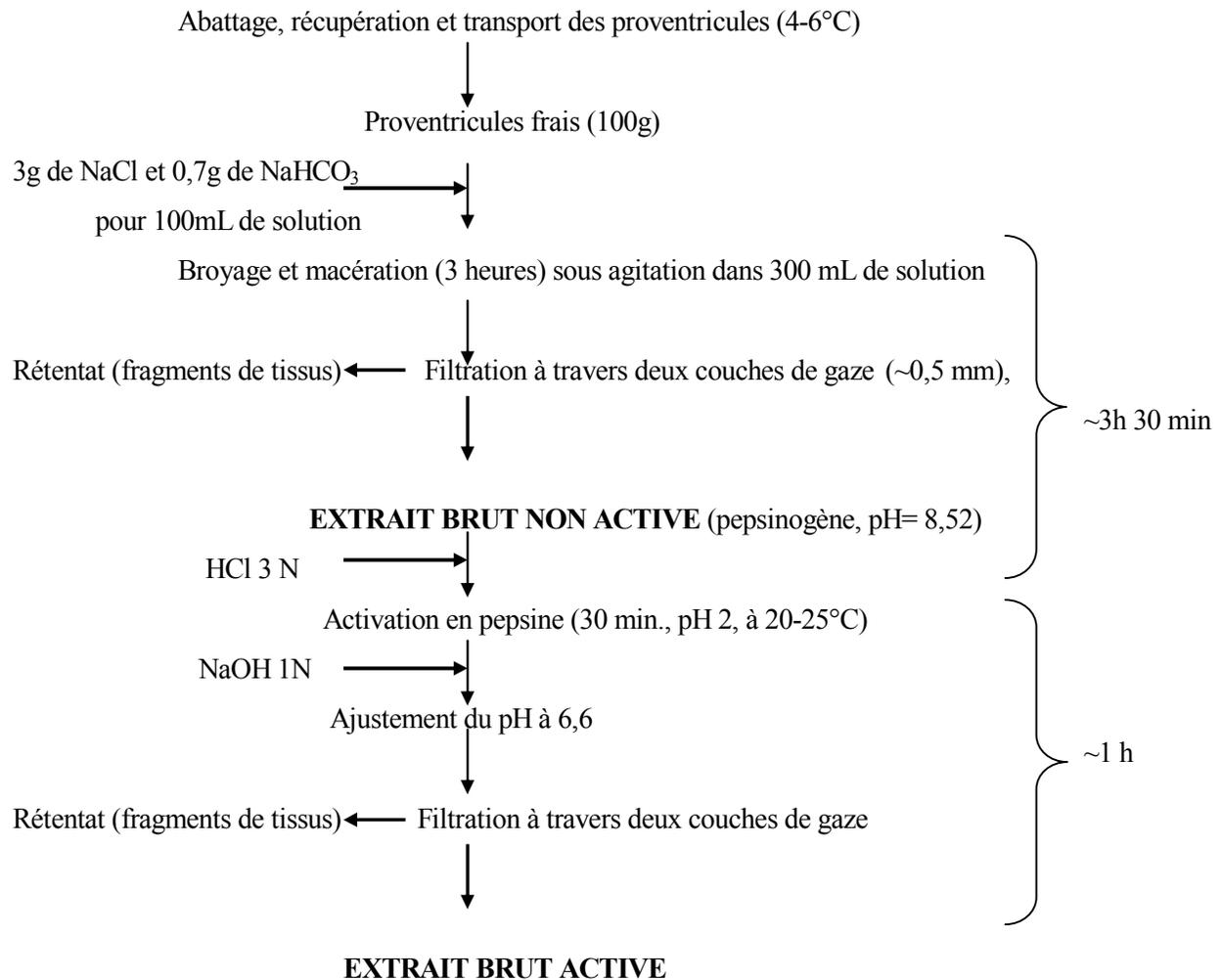


Figure 17: Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet selon BOHAK (1970).

3-2 Expression du rendement de l'extraction

Le rendement d'extraction de la présure est exprimé par unités présures totales rapportées au volume final obtenu après extraction et à l'unité de masse de proventricules frais. Aussi, ce rendement est exprimé sous forme de force coagulante en unités Soxhlet (MOSCHOPOULOU *et al.*, 2004, 2006, 2009, MOSCHOPOULOU, 2011).

Le rendement d'extraction relatif à l'extrait brut de pepsine de poulet obtenu après macération de 100 g de proventricules dans 300 mL de solution d'extraction est exprimé par unités présures totales rapportées au volume d'extraction final et à l'unité de masse de proventricules frais ainsi que par la force coagulante.

4-CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'EXTRAIT

Toute enzyme coagulante est principalement caractérisée par sa force coagulante et ses activités protéolytiques. Ces propriétés ainsi étudiées, déterminées et connues pour l'extrait brut de la pepsine de poulet constitueraient un potentiel d'utilisation et d'application dans la fabrication fromagère. Ceci est par comparaison à l'enzyme de référence, la présure.

4-1-Caractéristique de la présure de référence

Les déterminations effectuées sur la pepsine sont en comparaison avec l'enzyme de référence, la présure, présentée sous forme de poudre. Elle a une force de 1/100000 avec plus de 75 % de chymosine (4000 mg par kg) et moins de 25 % de pepsine. L'ensemble des ces caractéristiques est donné par la fiche technique du produit (MARSHALL™-Rhodia-Food-France). La poudre de présure est reconstituée à 1 g dans 100 mL d'eau distillée. Cette solution mère a servi à la préparation de dilution de l'ordre de 0,1mL/100mL soit 10^{-5} g de présure/mL d'eau distillée. Ceci est pour donner un temps de floculation compris entre 300 et 360 secondes (GREEN *et al.*, 1984).

4-2-Evaluation de l'activité coagulante

4-2-1-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 (ALAIS, 1984). Le temps de floculation est 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), soit 0,5 % (v/v) pour la dilution de l'extrait brut de pepsine et 0,1 % (v/v) pour la dilution de présure. Rappelons que la dilution de l'extrait brut de pepsine et celle de la présure suscitées ont servi à l'ensemble des différentes déterminations de notre étude.

4-2-2- Détermination des unités présure et de la force coagulante

Par définition, l'activité coagulante est représentée par un rapport de quantité, entre un certain volume d'enzyme et un certain volume de lait amené à coaguler dans des conditions fixées arbitrairement. La méthode de Berridge consiste à calculer l'Unité Présure (UP) qui est la quantité d'enzyme active contenue dans 1 cm³, qui coagule 10 cm³ de substrat standard en 100 secondes à 30°C.

$$UP/mL = \frac{100 \times V}{10 \times T \times v}$$

UP : unité présure, **100** : temps de coagulation du substrat standard (100 secondes), **V** : volume de lait ; **10** : volume du substrat standard (10 mL), **T** : temps de floculation en secondes, **v** : volume de l'extrait d'enzyme dilué (ALAIS, 1984).

La force coagulante (**F**), exprimée en unité Soxhlet (US), représente le nombre de volumes de lait frais de mélange coagulé par un volume de présure, en 40 min à 35°C (Veisseyre, 1979 ; ALAIS, 1984, MAHAUT *et al.*, 2000).

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

V : volume de lait ; **v** : volume de l'extrait d'enzyme dilué ; **T** : temps de coagulation en secondes ; 2400 : 40 x 60 secondes.

4-3-Détermination de l'activité de l'aspartyl protéase

L'activité protéolytique de la pepsine est estimée par la détermination des unités d'activité aspartyl protéase sur l'hémoglobine, substrat connu pour sa stabilité particulière

(JARDILLIER *et al.*, 1972). Le mélange réactionnel est composé de 2,5 mL d'hémoglobine, (2,5 %) (m/v), 1,5 mL du tampon sodium acétate (0,1 M, pH 4) et de 1 mL d'extrait enzymatique. Après incubation à 40 C au bain Marie pendant 1 heure, un volume égal d'acide trichloracétique (TCA) à 2,5 % de concentration finale est additionné au mélange, puis filtration. Les composés azotés non protéiques récupérés dans le filtrat, sont dosés par colorimétrie à 650 nm avec le réactif de Folin-Ciocalteu contre un blanc. Ce dernier est constitué avec les mêmes volumes que ceux du mélange réactionnel, d'abord d'hémoglobine et de TCA pour stopper la réaction enzymatique puis l'addition de l'extrait enzymatique (ANSON *et al.* 1938 cité par MECHAKRA *et al.*, 1999). L'unité d'activité aspartyl protéase correspond à 1 μ g de tyrosine libérée par heure et par mL de mélange réactionnel (courbe d'étalonnage figure 16 : C)

4-4-Caractérisation fine

Pour identifier la (les) fraction (s) hautement active(s) dans l'extrait brut de pepsine de poulet, une purification partielle par FPLC (Fast Protein liquid chromatography) suivie d'une détermination des activités coagulante et protéolytique sont effectuées.

4-4-1-Fractionnement par FPLC

L'extrait brut activé est ultracentrifugé à 30000 g pendant 25 minutes. Ensuite, il est dialysé (2,4 nm) contre une solution de bis-Tris (20 mM) pH 6 pendant une nuit à 4°C pour éliminer les différentes molécules de sel en l'occurrence le NaCl. Le dialysat ainsi obtenu est filtré à travers un filtre seringue de 0,45 μ m de porosité pour donner le dialysat filtré.

Le chromatographe utilisé est de type : (Pharmacia Plus, Gradient programmer G-P-250, avec pompes, Pharmacia LKB Pump P-500, HOLLANDE). La boucle liée à la colonne de capacité de 1000 μ L est chargée du dialysat filtré. Ensuite ce volume est injecté avec un débit de 0,2 mL/min pendant 4 min, dans la colonne échangeuse d'anions mono Q sépharose (volume 30 mL, diamètre 1,6 cm, hauteur 15 cm) pouvant fixer de 20 à 50 mg de protéines avec une amplitude de 1 DO à 280 nm. Les protéines non retenues par la colonne (exclues) sont séparées par la solution (A) (Tris 20 mM pH 6) à 0,5 mL/min pendant 4 minutes. Les protéines fortement liées sont séparées par la solution (B) (bis Tris 20 mM pH 6 + NaCl 0,5

M) avec un débit de 0,5 mL/min pendant 45 min. où le gradient en NaCl passe de 0 à 75% pendant 40 min puis de 75 à 100% pendant 5 min (Sheehan et O'Sullivan, 2004).

4-4-2-Activités coagulante et protéolytique des fractions

L'activité coagulante (UP/mL) et l'activité de l'aspartylprotéase (μg de tyrosine/ heure / mL) des fractions obtenues par FPLC ont été déterminées comme décrit dans le chapitre : « Caractérisation de l'activité enzymatique de l'extrait ».

4-4-3-Caractérisation par séparation électrophorétique

Des volumes d'échantillons prélevés de chaque niveau (250 μL) des différentes opérations unitaires (ultracentrifugation, dialyse, filtration du dialysat) utilisées pour la préparation de l'extrait brut à la purification partielle ainsi que la fraction présentant le maximum d'activité enzymatique issue du fractionnement par FPLC ont été séparés par SDS-PAGE. Ces échantillons ont été dilués dans la solution de préparation pH 6,8 (Tris HCl 0,062 M, dithiothréitol (DTT) 0,03 M, EDTA 0,0004 M, SDS 1,5%, glycérol 5 %, bleu de bromophénol 0,01%) puis chauffés à 100 °C pendant 5 min. Une séparation sur SDS-PAGE, est réalisée selon la technique de LAEMMLI (1970), dans une mini cuve d'électrophorèse (Hoefler Mighty small II SE 250, San Fransisco liée à un générateur de courant, Electrophoresis power supply ST 606 T, France).

De plus, nous nous sommes intéressés à comparer le profil de l'action protéolytique de la fraction dialysée, de la fraction partiellement purifiée par FPLC ainsi que celle de l'extrait brut non dilué, sur les protéines du substrat de Berridge dans une proportion de concentration enzyme/substrat de 1/10. Pour cela, une séparation sur SDS-PAGE (20%, et de 7,5 %) est opérée selon les conditions opératoires suscitées.

5-ETUDE DE LA COAGULATION

Pour mieux comprendre le phénomène de coagulation à l'échelle macroscopique et microscopique des gels, les propriétés physico chimiques, rhéologique, protéolytique et microstructurales ont été étudiées.

5-1-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 floculation en fonction des variations des facteurs du milieu réactionnel (pH, température et concentration en CaCl_2). Le temps de floculation 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 : 5,0 - 5,6 - 6,2 - 6,6 - 7,5 et 8,5 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 floculation 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 ont été fixées 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 floculation est déterminé (GORDIN et ROSENTHAL, 1978).

La vérification de la concentration en CaCl_2 , 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 CaCl_2 . 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 floculation est déterminé (GORDIN et ROSENTHAL, 1978).

5-2-Suivi des caractéristiques physico-chimiques

La formation progressive d'un gel au cours du temps peut être appréciée par les variations de la turbidité et de la conductivité électrique (LUCEY, 2002). Ainsi, la comparaison du degré d'agrégation des micelles de caséines après déstabilisation et l'aptitude

des minéraux répartis entre la phase aqueuse et le gel à conduire le courant électrique sont appréciés pour le gel pepsine ou le gel présure.

5-2-1-Turbidité

La turbidité consiste en la mesure de l'intensité lumineuse diffusée par des particules dispersées en suspension dans un liquide. L'indication de la mesure est effectuée en NTU (nephelometric turbidity unit). La transition du lait au gel sous l'action de la pepsine de poulet ou de la présure conduit à la détermination du degré d'agrégation des micelles par mesure de la turbidité (Turb 555IR USA) selon la méthode décrite par BANON et HARDY, (1992). Cette détermination porte sur la mesure du rayonnement diffusé par les particules non dissoutes, du gel pepsine ou du gel présure. La variation de la turbidité, $\Delta\tau$ exprimée en NTU est mesurée comme $\Delta\tau = \tau - \tau_0$ où τ_0 est la valeur de la turbidité du lait avant l'adjonction de l'enzyme (pepsine ou présure). Le profil de turbidité obtenu à pH 6,6 à 30°C est apprécié de 0,5 h à 24 h (0,5 h, 1h, 3h, 6h, 9h, et 24 h).

5-2-2-Conductivité

La mobilité des minéraux entre la phase aqueuse et la phase gel a été suivie par conductimétrie. Le conductimètre utilisé est de type (Tacussel CD6N, France). Il s'agit de faire passer un courant alternatif de très basse tension entre deux électrodes (de référence et de mesure) plongées dans le gel en question. La mesure porte sur la conductivité en milli Siemens par cm (mS/cm) au courant électrique des minéraux répartis entre les deux phases (aqueuse et micellaire) (TSOULI *et al.*, 1975) à pH 6,6 et 30 °C du gel pepsine ou du gel présure après coagulation de 0,5h, 1h, 3h, 6h, 9h, et 24 h.

5-3-Suivi des propriétés rhéologiques

Après coagulation, les propriétés rhéologiques du gel pepsine ou du gel présure sont appréciés. Ceci est dans le but de déterminer et de comparer leurs caractéristiques viscoélastiques, leurs seuils d'écoulement et leurs points de rupture ainsi que le suivi de la cinétique de la viscosité (transition sol-gel). Ces caractéristiques en outre, permettraient d'estimer et de présager le type d'interactions impliquées entre les protéines des gels étudiés.

Les paramètres rhéologiques du gel pepsine ou du gel présure : viscosité, seuil d'écoulement, cinétique de coagulation, ont été étudiés en régime permanent (vitesse de cisaillement imposée) et la viscoélasticité en régime dynamique (contrainte imposée). Le rhéomètre utilisé est de type StressTech Reologica (REOLOGICA INSTRUMENTS AB, SCHEELEVÄGEN 30, 22363 LUND, SWEDEN).

5-3-1-Détermination des modules G' et G''

Les méthodes rhéologiques déterminées à l'aide d'un rhéomètre caractérisent les propriétés physiques du gel. Elles permettent d'évaluer l'élasticité G' et la viscosité G'' du gel exprimées en Pascal (Pa) avec l'angle de perte δ qui est le rapport entre G'' et G' . Ce rapport informe sur le comportement prédominant du milieu, élastique ou visqueux.

La mesure est effectuée par un système cône-plan (40 mm de diamètre pour le plan et 4° pour le cône). L'expression des résultats G' (Pa), G'' (Pa) et angle de perte δ est en fonction de la fréquence (Hz). Pour éviter la destruction des gels, les modules d'élasticité G' de viscosité G'' ainsi que l'angle de perte δ des gels pepsine ou présure sont mesurés dans le domaine de viscoélasticité linéaire (déformation $<2\%$) (BROWN, 2003).

5-3-2-Détermination de la viscosité

La viscosité apparente (cinétique de coagulation) en fonction du temps des gels pepsine ou présure est déterminée à l'aide d'un système à cylindres co-axiaux (diamètre interne 25 mm et diamètre externe 27 mm) avec une vitesse de cisaillement constante (200 sec^{-1}) et un temps d'application de 23 minutes. Un volume de 15 mL de substrat de Berridge est gardé dans le cylindre pendant 30 minutes pour atteindre 30°C , puis 1 mL de la solution enzymatique de force 1/13142 y est additionné. Cet instant d'addition correspond au début de contact enzyme-substrat. La courbe exprime la viscosité (Pas) en fonction du temps en secondes.

La viscosité absolue du lait a été aussi déterminée. Après homogénéisation d'un volume de substrat de Berridge avec une baguette pleine en verre, une goutte est déposée sur le système de mesure constitué d'un cône-plan (40 mm de diamètre pour le plan et 4° pour le cône). Une vitesse de cisaillement allant de 1 à 200 sec^{-1} est appliquée avec un temps de mesure de 200 sec. Le rhéogramme obtenu exprime la contrainte τ (Pa) en fonction de la

vitesse de cisaillement $\dot{\epsilon}$ (1/s) (courbe d'écoulement), d'une part et la viscosité η (viscosité absolue) en fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\epsilon}$ (1/s) d'autre part (KOROLCZUC *et al.*, 1986 et TUNICK, 2000).

5-3-3-Détermination du seuil d'écoulement

Pour pouvoir déterminer les balayages en déformation et la contrainte seuil c'est-à-dire l'énergie minimale requise pour détruire la structure d'un gel, le seuil d'écoulement, paramètre rhéologique de l'état physique du matériau est investigué. Il correspond à la contrainte qui doit être atteinte ou même dépassée pour qu'il y ait écoulement. Notons que plus la contrainte seuil est élevée, plus la dispersion du système est compacte.

Le seuil d'écoulement du gel pepsine ou présure est déterminé après dépôt d'une goutte de gel cassé entre le cône d'une inclinaison de 4° et d'un plan de 40 mm de diamètre. Une vitesse de cisaillement allant de 1 à 200 sec^{-1} est appliquée avec un temps d'application de 200 sec. Le rhéogramme obtenu exprime la contrainte τ (Pa) en fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\epsilon}$ (1/s). Le point d'intersection de la droite du graphe avec l'axe des ordonnées détermine le seuil d'écoulement τ_c exprimé en (Pa) (CAYOT *et al.*, 2003).

5-4-Appréciation du point de rupture des gels

Pour estimer la force nécessaire à la déformation de la structure des gels pepsine ou présure, c'est-à-dire leurs points de rupture, une compression uniaxiale permettant de comprimer environ 90% de la hauteur initiale du gel est appliquée avec un temps de compression de 40 secondes. Cette mesure est obtenue par l'utilisation d'une sonde de 38 mm de diamètre et d'une vitesse de pénétration de 40 mm/min. Le gel pepsine ou présure servant aux mesures rhéologiques est obtenu après coagulation du substrat de Berridge pendant 12 minutes à 30°C, dans un bécher ayant une hauteur de 55 mm et un diamètre de 40 mm. Le maximum de la force exprimé en Newton (N) est relatif au point de rupture du gel correspondant (BERTOLA, 1992 ; LUCEY, 2002). Le texturomètre employé est : TEXTURE ANALYSER TA PLUS LLOYD INSTRUMENTS UK lié à un logiciel, NEXYGEN-LOT.

5-5-Etude de la synérèse

Pour estimer et apprécier leur compacité et leur contractibilité, l'étude de la synérèse du gel pepsine ou du gel présure est envisagée selon la méthode de MARSHALL (1982), cité par CALVO et BALCONES (2000). Un volume de 1mL de la pepsine de poulet ou de la présure est additionné à 60 mL de substrat de Berridge dans des béchers maintenus à 30°C. Après coagulation, (temps 0), le gel est découpé en cubes de 1 cm³, puis une couche de gaze est placée sur la surface du bécher de manière à retenir le gel et laisser le sérum s'y écouler. Le lactosérum exsudé de manière spontanée issu de la synérèse du gel pepsine ou du gel présure est quantifié par pesée à des intervalles de temps de coagulation différents (0,5 h, 1h, 3h, 6h, 9h, et 24h).

5-6-Suivi de la protéolyse

La protéolyse du substrat de Berridge après coagulation enzymatique a été estimée par le suivi de l'augmentation de la libération de l'azote non protéique (Non Protein Nitrogen ou NPN) par rapport à l'azote total, de l'augmentation en azote non caséinique (Non Casein Nitrogen ou NCN) par rapport à l'azote total ainsi que par une séparation électrophorétique des fractions azotées par SDS-PAGE et urea-PAGE. Ceci est pour caractériser le profil protéolytique de la pepsine de poulet et le comparer à celui de la présure.

5-6-1-par les fractions azotées libérées

L'activité protéolytique est étudiée par le suivi des fractions NCN et NPN dans le surnageant après précipitation des caséines à pH 4,4 (LENOIR, 1963, LE QUERE *et al.*, 1998 ; ROSEIRO, 2003) et des protéines à l'acide trichloroacétique TCA (Biochem, Chemopharma, USA) à 12 p. cent de concentration finale respectivement, suivie de centrifugation (10 000g, 10 min.). NCN et NPN ont été déterminés dans des intervalles de temps différents (0,5 h, 1h, 3h, 6h, 9h, 24h). L'azote total (TN), le NPN et le NCN ont été dosés par la méthode de Kjeldahl (chapitre 2 techniques d'analyses) sur unités de Gerhardt, Boon K 1.16 (UK).

5-6-2-par séparation électrophorétique

L'échantillon destiné à la séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu urée ou en milieu SDS est préparé comme suit : à 10 mL de substrat de Berridge (pH 6,6, 30°C), 1mL de la solution enzymatique (pepsine de poulet ou présure) est rajouté. Ensuite, la réaction est arrêtée à des différents intervalles de temps (0,5h, 1h, 3h, 6h, 9h, 24h) par addition de 500µL de TCA (50 g L⁻¹) de concentration finale 0,21 % (m/v). Les échantillons sont laissés pendant une nuit à 4°C pour précipiter. Ensuite, une centrifugation est achevée à 10 000 g, pendant 10 min. et les précipités (150 µL) sont dissous dans 450µL des solutions tampons **a** ou **b** (CAVALLI *et al*, 2004) :

(a) pour urea- PAGE, 0,062 M Tris, 8 M urée, 2 ml 2-mercaptoéthanol L⁻¹ et 0,02 g de bleu de bromophénol L⁻¹, puis le pH a été ajusté à 7,6 et les échantillons ont été agités pour 30s ;

(b) pour SDS-PAGE, 0,0625 M Tris, 20g SDS L⁻¹, 2 ml 2-mercaptoéthanol L⁻¹, 0,02 g de bleu de bromophénol L⁻¹. Le pH a été ajusté à 6,8 puis les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 5 minutes. La matrice du gel concentré utilisé (acrylamide/bis acrylamide) est de 30,8 % T, 2,6 % C.

La séparation électrophorétique a été effectuée dans une mini cuve type Protean III (Biorad Laboratories, California, USA), liée à un générateur de courant type Consort, (Turnhout, Belgique).

5-7-Identification des interactions impliquées dans les gels formés

En vue de caractériser le type d'interactions existant entre les protéines du gel pepsine ou du gel présure, des agents dissociants de différentes natures (SDS, urée et EDTA) et de différentes concentrations sont utilisés.

La méthode suivie est celle décrite par Lefebvre-Cases *et al.* (1998a). Le principe est basé sur la dislocation des liaisons impliquées dans l'interaction et le maintien des structures des gels pepsine ou présure par des agents dissociants. L'abondance et l'importance des liaisons hydrophobes sont décelées et situées par le sodium dodecyl sulfate (SDS), les liaisons hydrogènes par l'urée et les liaisons calciques par l'agent chélateur du calcium à savoir l'acide éthyle diamine tétra acétique (EDTA).

Des volumes de 8 ml, de gel pepsine ou de gel présure ont été dispersés dans 32 ml de la solution aqueuse dissociante dont les concentrations sont : SDS (1 %), urée (6 M) et EDTA

(100 mM), ou dans une solution de combinaison de deux agents dissociants (SDS-urée), (SDS-EDTA), (urée-EDTA).

Tableau 6 : Concentrations des agents dissociants seuls et en combinaison (Lefebvre-Cases *et al.* 1998a).

SDS (g 100mL ⁻¹)	0,1	0,3	0,5	0,7	1
Urée (M)	2	3	4	5	6
EDTA(mM)	20	40	60	80	100
SDS 1 % (g 100mL ⁻¹) + urée 6 M					
SDS 1 % (g 100mL ⁻¹) + EDTA 100 mM					
Urée 6 M + EDTA 100 mM					

Comme témoin, 8 mL du gel pepsine ou du gel présure ont été dispersés dans 32 mL d'eau distillée. Les mélanges ainsi obtenus (gels + agents dissociants ou gels + eau) ont été rapidement homogénéisés par l'utilisation d'un polytron (PT10-35, vitesse fixe 30.000 t/min, Kinematica AG Nouvelle-Zélande) pendant 45 secondes puis 1 mL prélevé de chaque dispersion du gel est centrifugé à 35000g pendant 32 minutes à 4°C (Centrikon T-42 K, ALC International Srl Italie). Après centrifugation, les surnageants (protéines solubles) ont été récupérés, conservés à 4°C jusqu'à analyse. Les protéines totales et les protéines solubles libérées dans le surnageant après action d'agents dissociants (seul ou en combinaison) sont quantifiées par la méthode de Lowry à 750 nm (voir chapitre 2 techniques d'analyses). Les résultats expriment le taux de protéines solubles relatif aux protéines totales en fonction des concentrations utilisées pour chaque agent dissociant.

5-8-Observation au MEB (Microscopie Electronique à Balayage)

Le mode d'agrégation des micelles de caséines du gel pepsine ou du gel présure ainsi que sa structure finale sont étudiés à l'échelle microscopique. Ceci est pour appuyer et expliquer davantage l'ensemble des propriétés physico-chimiques et des phénomènes rhéologiques déterminés à l'échelle macroscopique.

Le principe de la microscopie électronique à balayage consiste à utiliser un faisceau d'électrons accélérés très fin qui balaie point par point la surface de l'échantillon. Les électrons rétrodiffusés et les électrons secondaires émis par l'échantillon sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent le signal à un écran cathodique pour former des images.

Après coagulation (0,5h, 6heures et 24 heures), dans des tubes à essai, le gel pepsine ou le gel présure sont cassés par agitation manuelle, puis une goutte de chacun est déposée sur un support inerte (fragment de membrane en alumine), ensuite fixée par la solution de glutaraldéhyde (1%) pendant 15 heures environ. Les échantillons sont après déshydratés dans une série de solutions d'éthanol (20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80 , 85°, 90°, 95°, 100°), séchés au point critique du CO₂ sur un appareil Baltec CPD030, métallisés à l'or sur un appareil Baltec MED 20 (Balzers Union, FL-9496 Balzers, Germany), puis observés par le microscope électronique à balayage (Philips XL 30, BP 45, 94454 Limeil Brevannes, France), opéré à 30 Kv, grossissement (x14000) (ATTIA *et al.*, 1991).

6-APPRECIATION DE L'APTITUDE A LA CONSERVATION DE L'EXTRAIT BRUT

Pour préserver une stabilité de l'activité de l'extrait brut de pepsine de poulet étudié et garantir son utilisation, les possibilités de conservation par séchage sous vide poussé (lyophilisation), ou sous vide partiel sont envisagées. L'impact de l'adjonction ou non du lactose en tant que protecteur et l'activation ou non du pepsinogène avant et après séchage sont abordés.

L'objectif est d'étudier l'effet de la conservation par lyophilisation (séchage sous vide poussé, à -60°C, 0,1 m bar, 12 heures) (lyophilisateur, Alpha 1-4, 100400, Germany) ou par séchage sous vide partiel (48°C, 200 mbar, 18h) (Gallenkamp, OVL-570-010 J, OVA 031. XX 1.5, UK) sur l'activité coagulante résiduelle de l'extrait brut de pepsine de poulet.

6-1-Conservation par déshydratation

L'extrait brut destiné au séchage sous vide poussé (lyophilisation) ou au séchage sous vide partiel est réparti en quatre volumes : a) non activé non lactosé (NA-NL), activé non lactosé

(A-NL), non activé lactosé (NA-L), activé lactosé (A-L). Nous signalons que le terme « non activé » désigne l'extrait brut de pepsine de poulet non activé avant séchage. Son activation a lieu, après séchage lors de sa reconstitution, pour l'estimation de l'activité résiduelle. L'adjonction du lactose est de l'ordre de 5% (m/m) vu que ce diholoside présente une haute rétention de l'activité enzymatique comparativement à d'autres sucres pour la même concentration (VASILJEVIC et JELEN, 2003). Cinq mL de chaque volume sont déposés dans une boîte de pétri (70 mm de diamètre et 30 mm d'épaisseur). Pour éviter la projection de la poudre de l'extrait enzymatique obtenue en fin de chaque opération, toute boîte a été recouverte d'une couche de parafilm finement trouée. Les échantillons destinés à la lyophilisation sont d'abord placés à -25°C.

6-1-1-Sous vide partiel

L'opération est procédée à 48°C et à 200 mbar (Gallenkamp, OVL-570-010 J, OVA 031. XX 1.5, UK). Cette opération est arrêtée (18 heures) après obtention d'un extrait enzymatique sec d'une humidité moyenne de 5 % (WARD *et al.*, 1999) sur des échantillons témoins.

6-1-2-Cryodessiccation

L'opération est procédée à (-60°C), et 0,1 m bar (Alpha 1-4, 100400, Germany). Cette opération est arrêtée (12 heures) après obtention d'un extrait enzymatique sec d'une humidité moyenne de 5 % (WARD *et al.*, 1999) sur des échantillons témoins.

6-1-3-Entreposage des échantillons déshydratés

Après déshydratation, des boîtes de pétri sont utilisées comme contenant pour les échantillons séchés. Elles sont recouvertes, entourées d'une bande adhésive sur les bords, puis placées dans des cartons et stockées à température ambiante.

6-2-Estimation de l'activité coagulante résiduelle

L'efficacité de l'opération du séchage sous vide partiel ou sous vide poussé est appréciée directement après chacune des deux opérations. Aussi, l'effet de conservation par les procédés de séchage suscités est estimé tous les 15 jours d'entreposage sur une période de 135 jours par évaluation de l'activité coagulante résiduelle comparée à l'activité coagulante à

l'état frais (pepsine sans lactose). Ceci est procédé après dissolution de l'extrait enzymatique séché dans un volume d'eau distillée ayant la même concentration que celle de l'extrait enzymatique avant séchage.

6-3-Expression de l'activité coagulante résiduelle

Dès récupération des échantillons déshydratés, une estimation de l'activité coagulante est effectuée. Cette activité mesurée correspond au temps zéro de l'entreposage. Cela permet de distinguer l'activité résiduelle montrant l'effet de l'opération de séchage.

$$\text{Activité coagulante résiduelle (\%)} = \frac{\text{Activité coagulante après lyophilisation ou séchage sous vide partiel}}{\text{Activité coagulante initiale à l'état frais}} \times 100$$

Au cours de l'entreposage, l'activité coagulante résiduelle est aussi estimée pour chacun des modes de séchage comme suit :

$$\text{Activité coagulante résiduelle au cours de l'entreposage (\%)} = \frac{\text{Activité coagulante après entreposage}}{\text{Activité coagulante initiale à l'état frais}} \times 100$$

Les étapes de préparation des différents échantillons sont résumées dans la figure 18.

7-ANALYSE STATISTIQUE

Les données expérimentales sont présentées sous forme de moyennes et d'écart-type de trois expériences. Pour confirmer ou infirmer la présence d'une différence significative de certains facteurs de mesure des données expérimentales, une analyse de la variance (ANOVA) au seuil de 5% en est effectuée par l'utilisation du logiciel STATISTICA Version 8.0 (2008).

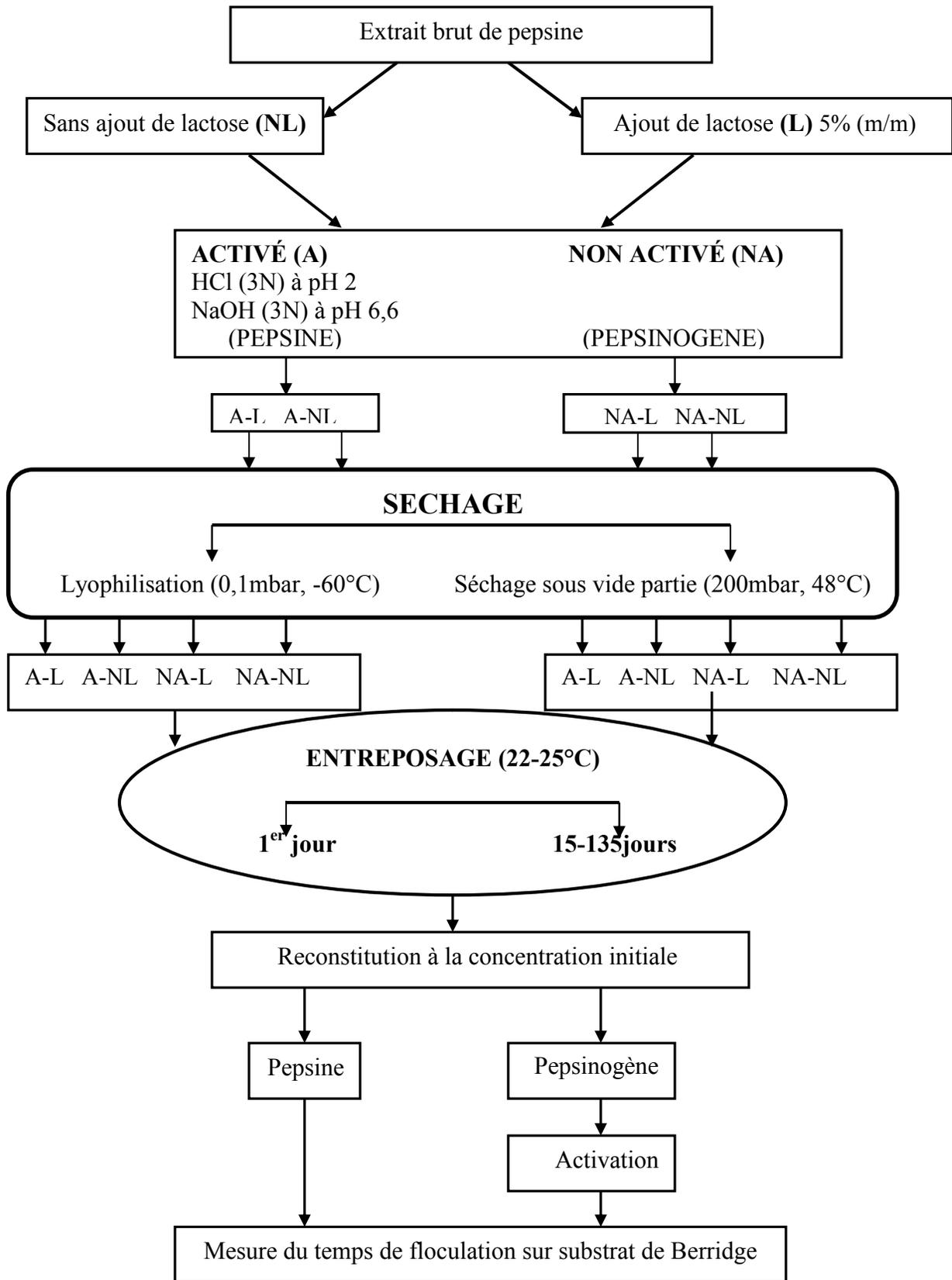


Figure 18 : Préparation de l'extrait brut pour l'étude de l'aptitude à la conservation

RESULTATS
&
DISCUSSION

1-CARACTERISATION DES MATIERES PREMIERES

Les résultats présentés dans ce chapitre sont obtenus à partir d'une extraction répétée trois (3) fois.

1-1-Caractéristiques dimensionnelles des proventricules

Sur un lot de 50 proventricules frais, la masse (g) et la longueur (mm) sont $6,7 \pm 0,7$ et $34 \pm 0,5$ respectivement. Ces résultats s'accordent avec ceux donnés par BOHAK (1970) et par ALAMARGOT (1982) qui sont respectivement en moyenne de l'ordre de 7g et de 30 mm.

1-2-Caractéristiques du lait

Le lait reconstitué à 12 p. cent (m/v) ayant servi comme substrat de Berridge présente la composition globale suivante :

Tableau 7 : Composition du substrat de Berridge

Caractéristique	Moyenne \pm ET (g . 100 mL⁻¹),
Matière sèche totale	$11,58 \pm 0,02$
Fractions azotées	
TN	$0,63 \pm 0,04$
NPN	$0,0320 \pm 0,0021$
NCN	$0,210 \pm 0,02$
Matière grasse	$0,13 \pm 0,10$
Cendres	$0,97 \pm 0,19$
pH	$6,7 \pm 0,1$
Acidité lactique	$1,7 \pm 0,1$

Vu sa teneur satisfaisante en protéines (4%) (ALAIS, 1984 ; CAYOT et LORIENT, 1998 ; MAHAUT *et al.*, 2000) et sa faible teneur en matière grasse totale, nous considérons que ce lait peut servir comme un bon substrat pour la détermination de l'activité coagulante de l'enzyme étudiée et pour la caractérisation rhéologique des gels obtenus par la pepsine ou par la présure. Des activités coagulantes optimales, sont obtenues sur des laits dont la teneur en matière grasse totale est inférieure à 2 % (McMAHON *et al.*, 1984).

2-CARACTERISTIQUES DE L'EXTRAIT BRUT ET RENDEMENT DE L'EXTRACTION

2-1-Caractéristiques de l'extrait brut

L'extrait brut de pepsine de poulet obtenu après extraction est caractérisé par l'activité coagulante, la force coagulante, et l'activité aspartyl-protéase, regroupées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Activités enzymatiques de l'extrait brut de pepsine de poulet par comparaison à la présure

Caractéristique	Extrait brut de pepsine de poulet (moyenne ± ET)	Présure (moyenne ± ET)
Activité coagulante (UP.mL ⁻¹)	60,06 ^a ± 0,14	323,62 ^b ± 44,56
Force coagulante (US)	13142 ^c ± 1498	70815 ^d ± 1865
Activité aspartyl-protéase (µg mL ⁻¹ h ⁻¹)	8,38 ^e ± 0,22	6,83 ^f ± 0,12
Activité coagulante /activité aspartyl protéase	7,23	47,38
Protéines (mg mL ⁻¹)	35,40 ^g ± 0,40	10,33 ^h ± 0,25
*Activité spécifique (UP mg ⁻¹)	1,7	31,32

Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05)

* Activité spécifique (UP mg⁻¹) = activité coagulante (UPmL⁻¹)/taux de protéines (mg mL⁻¹)

L'extrait brut (pH 8,5± 0,1) issu de proventricules de poulet est constitué principalement de broyats de glandes sécrétrices d'enzymes appelées glandes à mucus. Ces glandes renferment principalement le zymogène de pepsine ou pepsinogène (ALAMARGOT, 1982). Après activation à pH acide, le fragment peptidique (~8 KD) qui masque le site actif est détaché et l'enzyme (pepsine) devient donc active. Cette activité est exprimée de différentes manières pour mieux caractériser l'enzyme étudiée. La pepsine est considérée comme étant l'unique protéase présente dans le suc gastrique du proventricule de poulet (LARBIER et LECLERCQ, 1992).

Sur le plan statistique, une différence très significative (p< 0,0001) (tableau 8) est notée entre les activités enzymatiques de l'extrait brut de pepsine de poulet étudiée et celles de la présure. Ceci concorde avec les résultats des travaux de recherches des auteurs

qui ont confirmé que l'activité protéolytique exprimée sous ses différentes formes pour la pepsine de poulet est plus élevée que celle de la présure. Ceci semble valable que la pepsine soit testée principalement sur les caséinates de sodium bovines, ou sur l'hémoglobine (BOHAK, 1969, BOHAK, 1970, DOLGIKH *et al.*, 1976, GORDIN et ROSENTHAL, 1978, EL-ABBASSY et WAHBA, 1988, PICHOVA et KOSTKA 1990, EL-SHAMEI et GOUDA 1990, GOUDA et EL-SHAMEI 1990), ou lors de l'affinage de certains fromages (Cheddar, Domiati, Edam, Emmental et Kachkaval) spécifié par l'amertume accentuée et caractérisé par la libération du tryptophane et/ou de la tyrosine (GORDIN et ROSENTHAL, 1978, GORDIN *et al.*, 1978, LIM et GORDIN, 1979, GORDIN et KOSIKOWSKI, 1979, STAINLEY *et al.*, 1980, FINDLAY *et al.*, 1984, GREEN *et al.*, 1984, WAHBA et EL-ABBASSY, 1984).

En effet, GOUDA *et al.* (1988), ont montré que les activités protéolytiques de la pepsine de poulet et de la présure exprimées en mg de tyrosine par 100 mL de solution après standardisation du temps de floculation à 4 minutes, sont de 14,36 et 0,63 respectivement. D'autres recherches ont montré que la pepsine porcine coagule le lait de chamelle (22,1 UP mL⁻¹), 5 fois plus rapidement que le lait de vache (4,5 UP mL⁻¹). Cependant, la chymosine coagule le lait de chamelle (10,9 UP mL⁻¹) 7 fois moins que le lait de vache (72,5 UP mL⁻¹) (WANGOH *et al.*, 1993).

D'autre part, MOSCHOPOULOU *et al.*, (2006) ont indiqué que l'activité de la pepsine porcine est la plus élevée sur les caséinates de sodium bovines à pH 5,5 pendant 24 heures, comparativement à celles des pepsines ovines bovines qui avaient des activités protéolytiques semblables (présure de veau et présure d'agneau) mais légèrement supérieure à celle de la chymosine. De plus, BAUDYS et KOSTKA, (1983), ont montré l'existence d'une grande similitude entre la pepsine de poulet et la pepsine porcine du point de vue structure et activité protéolytique. Ce résultat permettrait de déduire que la pepsine de poulet est d'une activité protéolytique assez élevée comparativement aux pepsines des autres espèces.

Cependant comment peut-on pallier à priori à cette protéolyse peptique intense ? La pepstatine A, un hexapeptide isolé de plusieurs cultures filtrées de l'espèce *Streptomyces* est un inhibiteur compétitif pour la plupart des protéases aspartique auxquelles il se lie au site actif de façon non covalente, (FUSEK et VETVICKA, 2005). La pepsine de chevreau est inhibée par la pepstatine A à une concentration de 5 mM, la pepsine de brebis est

complètement inhibée à 10 mM. La chymosine de veau et la pepsine bovine sont inhibées à 45 mM et à 220 mM respectivement (MOSCHOPOULOU *et al.*, 2006). Ces résultats conduisent à conclure que la pepsine de poulet pourrait être utilisée dans la fabrication de fromage comme substitut de chymosine et son activité protéolytique pourrait être suivie, contrôlée et modérée par l'utilisation de la pepstatine A principalement lors de l'affinage. Néanmoins, l'effet de la pepstatine A sur la santé humaine mérite aussi une étude approfondie.

Notons enfin, que les enzymes coagulantes qui présentent un rapport élevé entre activité coagulante et activité protéase aspartique sont celles qui sont retenues le plus dans la fabrication du fromage (SHAMMET *et al.*, 1992). Signalons aussi que la connaissance de l'activité spécifique de l'extrait brut constitue un premier pas pour suivre les étapes de purification de pepsine mais doit être complétée et confirmée par une analyse électrophorétique.

2-2-Rendement de l'extraction

Le protocole d'extraction appliqué a montré qu'à partir de 100 g de proventricules, et pour 300 mL de solution d'extraction, un volume moyen de 280 ml d'extrait brut est récupéré.

Le rapport des proventricules à la solution d'extraction est de 1:3. L'activité coagulante totale rapportée au volume d'extraction et à l'unité de masse de proventricules frais est de 16816,8 unités présure totales et 168,168 unités présure totales par gramme de proventricules frais respectivement. Ainsi, un litre de cet extrait pourrait coaguler environ 13142 litres de lait. Par ailleurs, cette même quantité de lait pourrait être coagulée par 0,1856 litres de présure dont sa force coagulante -selon nos résultats obtenus- est de l'ordre de 70815. Cette opération pourrait réduire 24 € environ du prix de la présure qui coûte approximativement 130 € /L à l'importation selon les déclarations de l'Office National Interprofessionnel du Lait (ONIL, 2011). Notons par la suite que le rendement (13142) obtenu constitue environ le 1/5 de la force de la présure (70815) utilisée comme référence. Ceci est lié étroitement aux différentes conditions d'extraction.

En effet, TAVARES *et al.*, (1997) ont déterminé les conditions optimales d'extraction de la pepsine afin de mesurer l'activité coagulante. Ces conditions sont de 2,5-3,0 % pour la concentration en NaCl, 3 heures de temps de macération à 4°C et un

intervalle d'ajustement de pH des extraits enzymatiques de [6-6,9]. Ces valeurs s'accordent avec celles du protocole que nous avons suivi pour l'extraction de la pepsine à étudier à partir du proventricule de poulet. En effet, la concentration en solution saline est de 3,7 %, le temps de macération est de 3 heures à 4°C et l'ajustement du pH de pepsine est à 6,6. Ainsi, la pepsine semble être extraite dans des conditions adaptées. Mais ceci n'exclue pas l'idée que le protocole appliqué pour la pepsine de poulet mérite encore une optimisation des différentes conditions pour augmenter le rendement d'extraction.

D'autre part, ZHANG et WANG (2007) ont montré que le rendement de l'extraction de la présure à partir de la caillette du chevreau pourrait être augmenté suite à l'application d'une méthode physique à ultrasons suivie d'une extraction dans une solution de NaCl à 16% pendant 25 minutes avec un rapport des muqueuses de caillettes à la solution d'extraction de 1:30. Cette technique augmente le rendement et diminue d'une manière très significative le temps d'extraction comparativement aux autres méthodes classiques. Un temps d'extraction long pourrait favoriser une prolifération microbienne dans l'extrait final. Ce procédé pourrait être envisagé pour la pepsine de poulet et ce, pour améliorer notamment le rendement et d'écourter le temps d'extraction.

A titre de comparaison des activités coagulantes, MOSCHOPOULOU *et al.*, (2009) rapportent que l'activité coagulante de la présure de l'agneau non sevré de $29,6 \pm 8,2$ (UP/mL) est significativement élevée ($p < 0,05$) par rapport à celle de l'agneau nourri uniquement d'herbes $16,3 \pm 3,9$ (UP/mL). Ainsi le rendement en activité coagulante totale exprimée en unités présures totales de la première présure $56,713 \pm 9,866$ est plus élevée que la seconde $30,308 \pm 7,464$. D'autre part, la comparaison des caractéristiques enzymatiques rapportées à la masse du matériel frais utilisé montre que l'activité coagulante de la présure de la caillette d'agneau de masse de 261,4g non sevré (481,4 unités présure totales par gramme de caillette) est significativement élevée ($p < 0,05$) que celle obtenue de l'agneau après sevrage de masse de 245,7 g (269,3 unités présure totales par gramme de caillette). Cette différence est attribuée d'une part aux types d'alimentation (au lait ou aux herbes) et d'autre part aux différentes conditions d'extraction.

En comparaison avec nos résultats, nous constatons que l'activité de pepsine de poulet est nettement inférieure à celle de la présure d'agneau par unité de masse. L'activité

coagulante issue de 1g de caillette d'agneau non sevré et celui nourri d'herbe correspond environ à 3 g et à 1,6 g de proventricules frais respectivement.

MOSCHOPOULOU *et al.*, (2004) et WANGOH *et al.*, 1993 ont étudié l'influence du rapport de la masse de la caillette au volume de la solution de l'extraction en fonction du pH. Pour cela, des caillettes d'agneaux ont été hachées puis macérées dans une solution de 6% NaCl-2% H₃BO₃ à des rapports de 1:3, 1:5 et 1:7 à des pH 4,5 et 5,3. Les résultats ont montré que l'extraction au rapport 1:3, qu'elle soit à pH 4,5 ou 5,3 a donné le maximum de rendement exprimé sous forme de force évaluée à 3340 et 3230 respectivement. Cependant, les rendements pour les autres rapports de caillettes à la solution de macération 1:5 et 1:7 ont été plus faibles que celui de 1:3 avec des forces de 2260 et de 1560 à pH 4,5 et de 2220 et de 1810 à pH 5,3 respectivement. Ceci montrerait que le volume réduit de la solution d'extraction semble accumuler, grouper et condenser le maximum du pool d'enzymes contenues dans le tissu de la caillette et par conséquent augmenter le rendement en force coagulante. Rappelons par ailleurs que le rapport utilisé pour l'extraction de la pepsine de poulet par application du protocole de BOHAK (1970) est de 1: 3 et a donné un extrait brut de force de 13142.

D'une manière générale, le rendement de la production de la présure sous forme liquide ne dépend pas seulement de l'état de la caillette mais aussi des conditions de l'extraction (rapport entre caillettes et solution d'extraction, durée d'extraction, pH, température, etc.). A titre d'exemple, et pour situer l'effet de pH, l'extraction de la présure dans une solution constituée de 6% de NaCl et de 2% d'acide borique à pH 5,5 donne une activité coagulante très élevée comparativement à celle extraite dans les mêmes conditions de concentrations de solutions mais dans un intervalle de pH allant de 4,0 à 4,5 (MOSCHOPOULOU *et al.*, 2004, et MOSCHOPOULOU, 2011). De même, il serait intéressant de procéder à l'extraction de la pepsine de poulet à différentes valeurs de pH pour mieux situer l'intervalle optimal du rendement. Un autre facteur lié au rendement d'extraction dépend du type d'alimentation de l'animal. En effet, la chymosine de la présure issue de la caillette d'agneau nourri exclusivement de lait (avant sevrage) présente une activité coagulante significativement plus élevée ($p < 0,05$) que celle obtenue de la caillette de l'agneau nourri uniquement aux herbes. Ceci est dû probablement à la présence de lait qui augmente de manière continue sa sécrétion (MOSCHOPOULOU *et al.*, 2007, 2009). Ces mêmes auteurs ont bien souligné la

différence notée entre les forces coagulantes de deux présures artisanales évaluées à 2179 et à 1358. Ces présures étaient préparées à partir de caillettes séchées, salées, hachées et macérées puis filtrées ayant été collectées de chez deux fabricants de fromages différents. Cette différence d'activités enzymatiques dépend de l'espèce animale (ovine, bovine ou caprine), du type d'alimentation et principalement de l'âge de l'animal.

Une étude sur les étapes de croissance du proventricule selon l'âge du poulet, le type d'alimentation ainsi que son espèce serait intéressante et permettrait de dévoiler des données vectorielles et indicatrices pour caractériser, évaluer et comparer l'activité coagulante de la pepsine dans chaque état.

3-PURIFICATION PARTIELLE DE LA PEPSINE DE POULET PAR FPLC

3-1- Caractérisation en activités enzymatiques

Pour mieux caractériser la pepsine de poulet, une purification partielle de l'extrait brut par FPLC a été envisagée. Pour cela, des traitements préliminaires pour la préparation au fractionnement sont entrepris. Une ultracentrifugation, suivie d'une dialyse puis d'une microfiltration ont permis à l'extrait brut d'acquérir de nouvelles caractéristiques enzymatiques présentées dans le tableau 9. Le passage de l'extrait brut à l'extrait dialysé filtré a provoqué une baisse en activité coagulante de 24% par rapport à l'activité initiale, alors que l'activité protéolytique a marqué une chute très importante estimée à 77%. Cela a conduit à une augmentation dans le rapport AC/AP de manière remarquable et intéressante passant de 7,15 à 23,59. Aussi, l'activité spécifique se voit en augmentation avec une baisse parallèle du taux des protéines à chaque étape de clarification. Ces résultats sont bien souhaités pour une enzyme coagulante en vue d'une utilisation dans la coagulation du lait et par conséquent dans la fabrication du fromage.

Tableau 9 : Caractéristiques de la pepsine de poulet obtenues selon le niveau de purification partielle

Etapes de purification partielle de l'extrait brut	Activité coagulante (AC) (UPmL⁻¹)	Activité protéolytique (AP) (µg mL⁻¹h⁻¹)	(AC)/(AP)	Taux de protéines (mg mL⁻¹)	Activité spécifique (UP mg⁻¹)	Facteur de purification
Extrait brut	58,06 ±0,11	8,12 ± 0,12	7,15	34,2 ± 0,23	1,70	1
Après ultracentrifugation (30000 g pendant 25 minutes)	50,12 ± 0,11	5,54 ± 0,11	9,04	28,5 ± 0,20	1,76	1,03
Après dialyse (24 h à 4°C)	46,22 ±0,09	2,13 ± 0,11	21,69	17,11 ± 0,16	2,70	1,60
Après microfiltration sur filtre seringue (0,45 µm) (dialysat filtré)	44,12 ±0,07	1,87 ± 0,06	23,59	11,65 ± 0,11	3,79	2,23

Activité spécifique (UP mg⁻¹) = activité coagulante (UPmL⁻¹)/taux de protéines (mg mL⁻¹).

Facteur de purification = activité spécifique après une étape de traitement /activité spécifique de l'extrait brut

3-2-Caractérisation des principales fractions après purification partielle

La séparation des protéines de l'extrait brut de pepsine de poulet par chromatographie liquide rapide (FPLC), a permis l'obtention de 45 fractions (figure 19) sous les conditions opératoires suscitées. Les fractions obtenues ne sont pas homogène. Leurs activités coagulantes et protéolytiques sont présentées dans le tableau 10. Elles sont significantes à partir de la fraction 11 (3,08 ± 0,01 UP mL⁻¹ et 0,11 ± 0,01 µg mL⁻¹h⁻¹) jusqu'à la fraction 21 (1,62 ± 0,01 UP mL⁻¹ et 0,06 ± 0,01 µg mL⁻¹h⁻¹). Ces activités enzymatiques atteignent leurs maximum pour la fraction 18 où on note une valeur de 12,33 ± 0,05 UP mL⁻¹ et 0,36 ± 0,03 µg mL⁻¹h⁻¹, pour l'activité coagulante et l'activité protéolytique respectivement.

Dans nos conditions opératoires, la fraction 18 fut détachée de la colonne mono Q sépharose pour une concentration en NaCl de 22% environ. Cependant, GREEN et LLEWELLIN (1973) rapportent que l'élution de la pepsine de poulet lors de sa séparation par FPLC exige des concentrations croissantes en NaCl vu son bas point isoélectrique qui est de $4,2 \pm 0,3$.

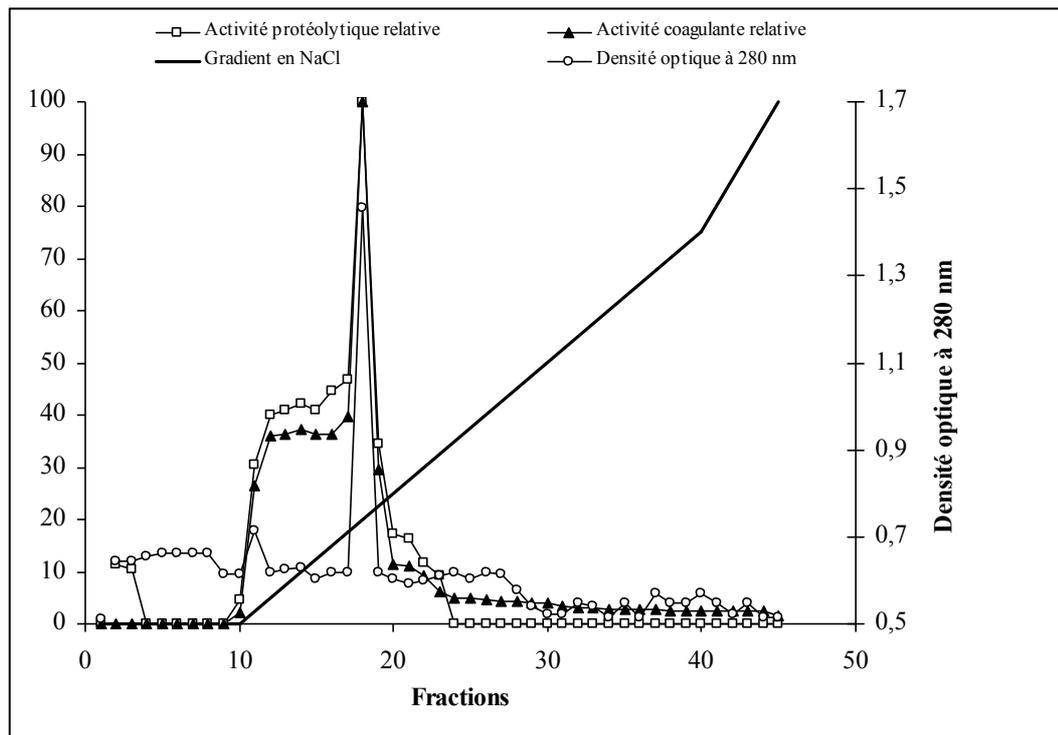


Figure 19 : Profil d'élution des fractions de l'extrait brut de pepsine après purification partielle par FPLC sur colonne mono Q sépharose (20 à 50 mg de protéines). Les expressions des activités coagulantes et des activités protéolytiques des différentes fractions sont relatives à celles de la fraction majoritaire (fraction 18).

Tableau 10 : Caractéristiques des principales fractions séparées en activités enzymatiques

Principales fractions à activités enzymatiques	Activité coagulante (AC) (UPmL ⁻¹)	Activité protéolytique (AP) (µg mL ⁻¹ h ⁻¹)	Taux de protéines (mg mL ⁻¹)	Activité spécifique (UP mg ⁻¹)	Facteur de purification
Fraction n°11	3,08 ± 0,01	0,11 ± 0,01	3,23 ± 0,08	0,95	0,56
Fraction n°12	4,31 ± 0,02	0,14 ± 0,01	2,19 ± 0,03	1,96	1,15
Fraction n°13	4,31 ± 0,02	0,14 ± 0,01	2,43 ± 0,06	1,77	1,04
Fraction n°14	4,56 ± 0,02	0,14 ± 0,01	2,11 ± 0,04	2,16	1,27
Fraction n°15	4,23 ± 0,03	0,16 ± 0,01	2,34 ± 0,04	1,80	1,06
Fraction n°16	4,20 ± 0,05	0,17 ± 0,02	2,17 ± 0,03	1,93	1,24
Fraction n°17	4,68 ± 0,03	0,17 ± 0,02	2,13 ± 0,04	2,20	1,13
<u>Fraction n°18</u>	<u>12,33 ± 0,05</u>	<u>0,36±0,03</u>	<u>1,10±0,02</u>	<u>11,20</u>	<u>6,60</u>
Fraction n°19	3,45 ± 0,03	0,13 ± 0,01	3,11± 0,09	1,10	0,65
Fraction n°20	1,62 ± 0,01	0,06 ± 0,01	1,3 ±0,01	1,25	0,73
Fraction n°21	1,62± 0,01	0,06 ± 0,01	1,3 ±0,01	1,25	0,73

Activité spécifique (UP mg⁻¹) = activité coagulante (UPmL⁻¹)/taux de protéines (mg mL⁻¹).

Facteur de purification = activité spécifique après une étape de traitement /activité spécifique de l'extrait brut

A côté, les profils électrophorétiques présentés en figure 20 montrent les bandes protéiques séparées sur SDS-PAGE de poids moléculaire allant de 10 à 105 KDa correspondant à la pepsine de poulet à l'état brut jusqu'à 37 à 60 KDa correspondant à son état partiellement purifié par FPLC caractérisé par la fraction majoritaire 18. Les bandes protéiques de cette fraction sont de l'ordre de trois, dont l'une correspond à un poids moléculaire de 37 KDa. qui pourrait se rapporter à la pepsine de poulet

En effet, le passage de l'état brut caractérisé par les multiples couches protéiques stratifiées jusqu'à son état partiellement purifié marqué par un nombre très réduit en bandes protéiques renseigne sur l'efficacité des traitements. Ces derniers ont été entrepris pour la préparation de l'extrait brut à la séparation par FPLC, passant par l'ultracentrifugation, puis par la dialyse suivie d'une microfiltration du dialysat.

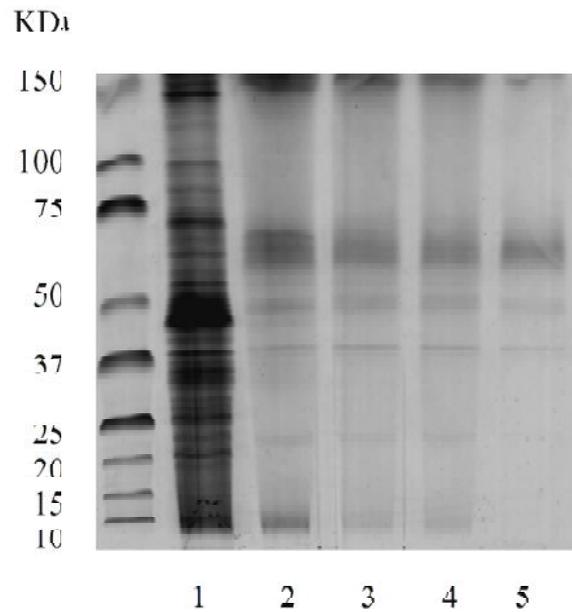


Figure 20 : Profil électrophorétique sur SDS-PAGE des étapes de préparation de l'extrait brut à la purification partielle (1-4). 1 : extrait de pepsine brut, 2 : après ultracentrifugation (30000 g pendant 25 minutes), 3 : après dialyse (pendant 24 h à 4°C), 4 : après filtration sur filtre (0,45 µm) (dialysat filtré) et après purification partielle par FPLC 5 : fraction 18

De plus, DONTA et VAN VUNAKIS (1970), rapportent que l'extrait brut de pepsine de poulet contient trois pepsines séparées par chromatographie sur colonne Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose) à pH 6,9 suivie de filtration sur gel et vérification de la purification par SDS-PAGE. Pour GREEN et LLEWELLIN (1973), l'extrait brut de pepsine de poulet contient au moins cinq (5) pepsines, séparées par chromatographie sur colonne DEAE-cellulose et chacune d'elle est caractérisée par sa mobilité électrophorétique sur gel d'agarose à pH 8,3. Cependant, BOHAK, (1969) rapporte l'existence d'une seule pepsine de poulet qui apparait sous forme d'un seul pic, après purification par chromatographie sur colonne DEAE-cellulose, filtration sur gel d'agarose et vérification de la purification sur SDS-PAGE. Ce dernier résultat se rapproche du notre vu l'obtention d'un seul pic relatif à une seule fraction (F18) présentant le maximum d'activités enzymatiques. Par ailleurs, il faut noter que d'autres traitements de purification de la pepsine de poulet comme la chromatographie d'affinité par fixation sélective de l'enzyme sur un ligand hautement spécifique méritent d'être envisagés et appliqués pour des résultats plus déterminants et concluants.

La diminution de l'activité protéolytique de l'extrait brut de pepsine sur le substrat de Berridge après dialyse et purification partielle par FPLC a été vérifiée sur SDS-PAGE. Les électrophorégrammes (figure 21) montrent un nombre de caséines hydrolysées plus réduit comparativement à celui de l'extrait de pepsine de poulet à l'état brut.

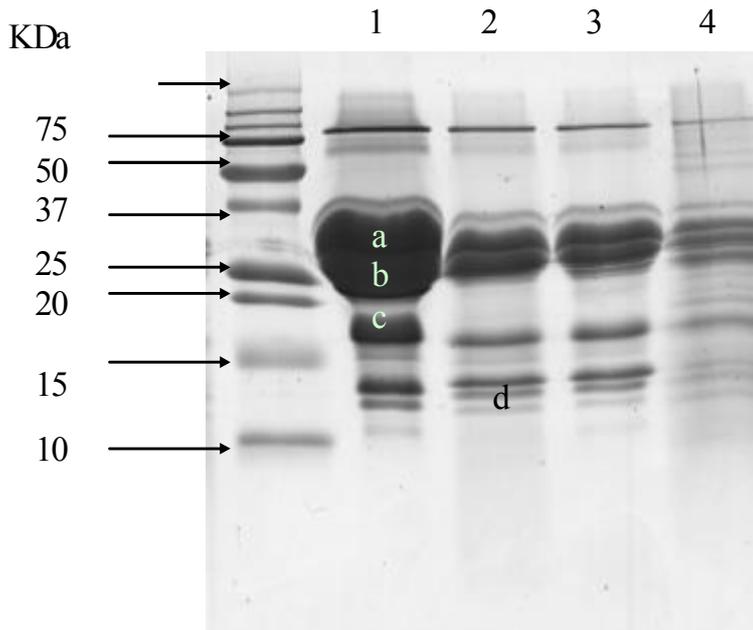


Figure 21 : Profil électrophorétique de la protéolyse du substrat de Berridge (1) (a : α_s -CN, b : β -CN, c : κ -CN, d : Para κ -CN) sur SDS-PAGE à 20 % par : la fraction 18 (2), l'extrait de pepsine dialysé (3) et l'extrait brut de pepsine de poulet non dilué (4)

Nous constatons que l'activité protéolytique de la pepsine à l'état brut non dilué (profil 4) sur les protéines du substrat de Berridge est relativement plus intense que celle de l'extrait dialysé (profil 3) ou que celle de l'extrait partiellement purifié (profil 2). Cette activité est visualisée par l'apparition de multiples bandes obtenues suite à la séparation des protéines par SDS-PAGE. En effet, cet extrait brut a une hydrolyse accentuée, qui est observée par la diminution remarquable des différentes bandes des protéines du lait. Cela permet de constater le nouveau caractère acquis par les extraits purifiés, distingué par la protéolyse spécifique, qualité et particularité recherchées pour les enzymes coagulantes. Contrairement à l'état brut, l'enzyme a une protéolyse encore plus intense car elle est plus stable et plus résistante aux différentes variations lorsqu'elle est dans son milieu environnemental. En effet, LEITE *et al*, 2008, rapportent que l'utilisation industrielle des extraits bruts d'enzymes au lieu des enzymes purifiées est plus économiquement adéquate.

Ceci est justifié par le fait que le coût de la récupération de l'extrait brut constitue environ 1 % de celui de l'enzyme purifiée. Aussi, cette dernière se trouve affecter par de nombreux facteurs extérieurs en l'occurrence, les inhibiteurs, les concentrations élevées en sel, le pH et la température. Ces derniers affectent très sensiblement son site actif, qui, contrairement et pour les mêmes conditions, l'extrait brut se trouve plus stable et plus résistant.

De plus, les valeurs des activités protéolytiques qui diminuent par rapport aux étapes de purification depuis l'extrait brut $8,12 \pm 0,12$ ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}^{-1}$) à l'extrait dialysé $2,13 \pm 0,11$ ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}^{-1}$), jusqu'à la fraction (18) $0,36 \pm 0,03$ ($\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}^{-1}$) confirment et appuient cette différence de protéolyse. La purification partielle de l'extrait brut de pepsine par FPLC semble diminuer de manière efficace son activité protéolytique.

D'autre part, le rapport activité coagulante/ activité protéolytique (AC/AP) est passé de 7,15 pour l'extrait brut à 34,25 pour l'extrait partiellement purifié (fraction 18). Rappelons que l'augmentation du rapport (AC/AP) constitue un bon indicateur pour la connaissance de l'adéquation et la convenance de l'utilisation des protéases comme substituts de présure en fromagerie.

Ce résultat s'accorde avec ceux de TEMIZ *et al.*, (2007, 2008) qui rapportent que la purification partielle par filtration sur gel Sephadex G-75 et sur gel Sephadex G-50 de l'extrait brut de pepsine issu du proventricule de dinde a permis au rapport (AC/AP) de passer de $18,88 \pm 0,77$ à $40,86 \pm 0,42$ et de $10,16 \pm 0,44$ à $107,47 \pm 5,68$ respectivement notés pour la fraction 8.

CONCLUSION

L'extrait brut de pepsine de poulet obtenu à partir du protocole d'extraction appliqué de BOHAK, (1970) pendant 3 heures de macération à (4-6)°C présente différentes activités enzymatiques coagulantes et protéolytiques. L'activité coagulante totale rapportée au volume d'extraction et à l'unité de masse de proventricules frais est de 16816,8 unités présure totales et 168,168 unités présure totales par gramme de proventricules frais respectivement. La force coagulante est de 13142. Elle constitue le 1/5 de la force de la présure (70815) utilisée comme référence.

Ce rendement est étroitement lié aux différents facteurs et conditions d'extraction qui méritent une optimisation notamment au niveau des rapports de la masse du

proventricule à la solution de macération et leurs concentrations ainsi que la durée, le pH et la température d'extraction. D'autres méthodes pourraient aussi être envisagées pour augmenter le rendement et diminuer le temps d'extraction.

La séparation de protéines par chromatographie liquide rapide (FPLC), a permis l'obtention de 45 fractions à partir de l'extrait brut de pepsine de poulet. La fraction 18 (~37 KDa) a montré des activités coagulante ($12,33 \pm 0,05 \text{ UP mL}^{-1}$) et protéolytique ($0,36 \pm 0,03 \text{ Unités mL}^{-1}$) remarquables comparativement aux autres fractions. Le rapport activité coagulante par rapport à l'activité protéolytique (AC/AP) de l'extrait brut de pepsine est passé de 7,15 à 34,25 après purification partielle. L'augmentation du rapport AC/AP est un critère de choix des protéases pour leurs utilisations comme substituts de présure.

4-ETUDE DE LA COAGULATION

4-1-Confirmation des conditions optimales de coagulation

4-1-1-Température et temps optimum de floculation

Les variations du temps de floculation du substrat de Berridge par la pepsine ou par la présure en fonction de la température sont présentées dans la figure 22. La courbe montre trois zones distinctes La première zone marque le temps de floculation du substrat de Berridge pour la pepsine noté de 300 s. à 320 s. et de 278 s. à 290 s. pour la présure à des températures allant de 30°C à 35°C. La deuxième zone délimitée par l'intervalle de température allant de 40°C à 65°C est caractérisée par une diminution progressive pour le temps de floculation exprimée environ de 244 s. à 323 s. pour la pepsine et de 180 s. à 190 s. pour la présure, puis une baisse notable pour le temps de floculation exprimée environ de 150 s. à 110 s. pour les deux enzymes. La troisième zone est cependant marquée par une augmentation dans le temps de floculation pour la pepsine et la présure à des températures supérieures à 55°C.

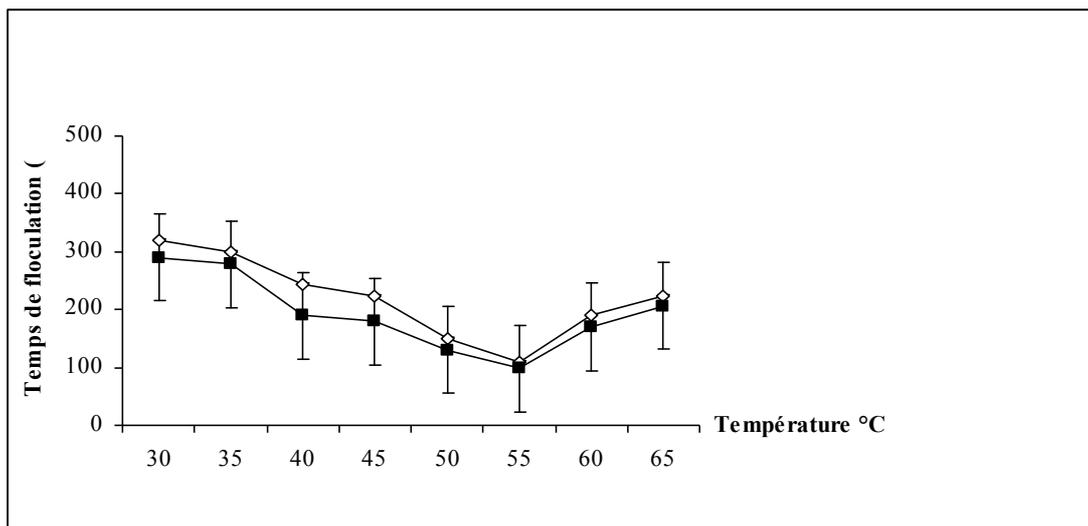


Figure 22 : Effet de la variation de la température sur la floculation du lait par la pepsine (◇) et par la présure (■)

Dans nos conditions de travail, l'optimum de température vérifié est compris entre 50°C et 65 °C pour la pepsine de poulet et la présure. Cet intervalle de température donne une augmentation dans l'activité coagulante qui passe de 68 à 70 (UP/mL) pour la pepsine et de 390 à 420 UP/mL pour la présure. Cependant, nous notons que ces valeurs n'ont pas

été prises en considération dans la partie expérimentale car d'une part, une floculation instantanée et rapide est constatée à ces températures et d'autre part, l'application de la formule servant au calcul de l'activité coagulante de l'enzyme sur le substrat de Berridge stipule le travail à une température de 30°C.

Selon COGAN *et al.*(1982), la température optimale notée pour la coagulation du lait par la pepsine de poulet avoisine 55°C. Ceci est probablement dû à l'augmentation de l'activité enzymatique suite au dépliement de la structure tridimensionnelle du substrat et par la suite faciliter l'accès à l'enzyme pour aboutir à l'accélération de la phase primaire ou la phase enzymatique de la coagulation. Une diminution de l'activité enzymatique est enregistrée au-delà de la température suscitée. Des résultats analogues sont observés pour la présure où la température optimale est d'environ 47°C. Ainsi la température optimale pour la coagulation du lait par la pepsine de poulet est de 8°C plus élevée que celle de la présure et de 10°C plus basse que celle annoncée pour la présure microbienne de *Mucor miehei*.

D'autres part, les résultats de GORDIN et ROSENTHAL, (1977), ont montré que le maximum de l'activité coagulante de la pepsine de poulet et celle de la présure ont été enregistrés dans l'intervalle de 45-55°C. MOSCHOPOULOU *et al.*, (2006) ont indiqué que la pepsine de chevreau, la pepsine de veau et celle de l'agneau restent actives à des températures avoisinantes 46°C. Au-delà de cette température, la pepsine de chevreau est inactive. Cependant, la chymosine du chevreau est encore active au-delà de 60°C à pH 6,2, alors que sa forme purifiée est encore plus sensible aux températures élevées. La chymosine de veau reste encore active jusqu'à 62°C à pH 6,2. La purification des enzymes coagulantes les rend plus sensibles et moins résistantes aux augmentations de la température. Pour cette raison, les formes brutes des protéases ovines et bovines sont les plus recommandées dans la fabrication des fromages.

Selon LUCEY, (2002a), la température optimale pour la coagulation du lait par la présure à pH 6,6 est de 45°C. Le taux d'agrégation des micelles déstabilisées augmente fortement avec l'augmentation de la température. La température optimale pour la fermeté du gel présure est entre 30-35°C. A des températures inférieures à 15°C, le temps de coagulation est très élevé et le gel formé est de fermeté très faible dus principalement à la dissociation et la séparation de la caséine β des autres micelles.

En effet, certains auteurs ont montré que l'élévation de la température entraînerait une fusion rapide des micelles (STORRY ET FORD, 1982 ; MARSHALL, 1982 ; CALVO, 2002). Par augmentation de la température, le maximum de fermeté du gel est atteint rapidement suite à l'augmentation considérable des liaisons hydrophobes (forces d'interactions majoritaires de la coagulation présure), des interactions micellaires et du mouvement Brownien (WALSTRA ET VAN VLIET, 1986).

4-1-2-pH et temps optimum de floculation

Les variations du temps de floculation du substrat de Berridge par la pepsine ou par la présure en fonction du pH sont présentées dans la figure 23.

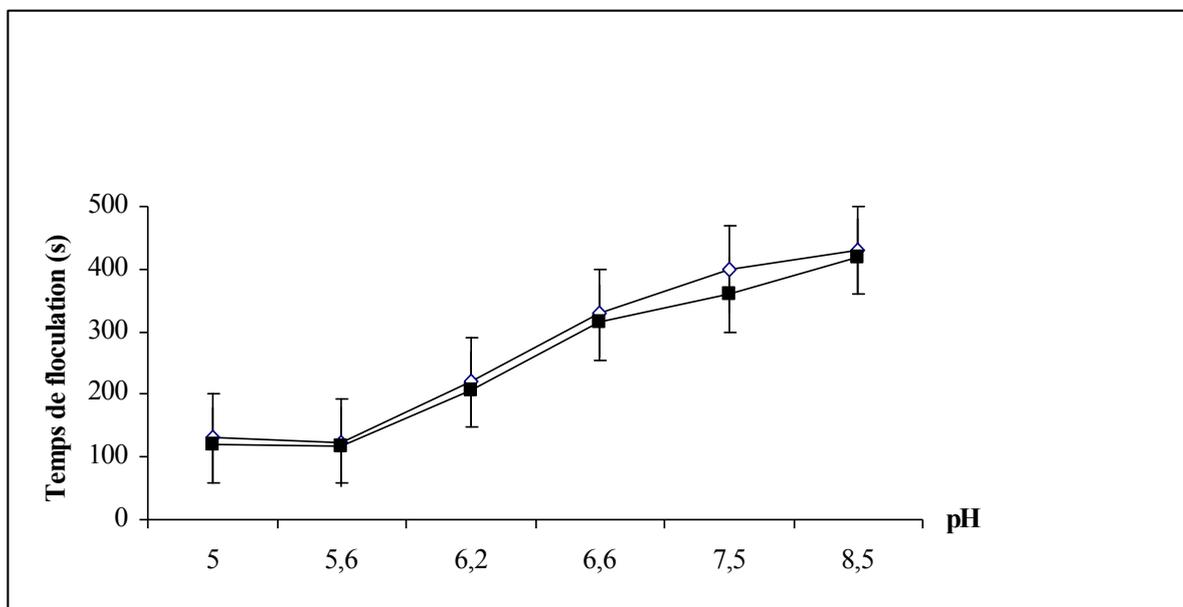


Figure 23 : Effet de la variation du pH sur la floculation du lait par la pepsine (◇) et par la présure (■)

Nous notons le plus faible temps de floculation pour la pepsine et la présure enregistré à 125 s. environ pour des valeurs de pH comprises entre 5,0 et 5,6. Une augmentation modérée du temps de floculation passant de 125 s. à 300 s. pour des valeurs de pH plus élevées de 6,2 à 7,5. Une floculation est nettement ralentie au-delà de la valeur de pH de 7,5. Dans nos conditions de travail, l'optimum de pH est noté de 6,2 à 6,6 pour la pepsine de poulet et la présure.

Selon CASTILLO *et al.*, (2000), LUCEY (2002a), et MISHRA *et al.*, (2005), l'optimum de pH pour l'action de la présure sur le lait est de 6,0. Cependant, cette valeur

est encore inférieure pour les caséines purifiées ou les peptides synthétiques. L'abaissement du pH du lait conduit à la rapidité de la fermeté du gel, à la diminution du temps de coagulation due à la réduction de la répulsion électrostatique entre micelles, à l'augmentation de la concentration des ions Ca^{++} due à la solubilisation du calcium phosphate colloïdal, à l'apparition de la floculation pour une très basse hydrolyse de la caséine Kappa, et à l'augmentation de l'activité de la présure. En effet, d'après l'étude de LARSSON et ANDREN (1997), l'adsorption de la chymosine sur la caséine κ passe de 0 % au pH 7,0 à 90 % au pH 5,0. Cette augmentation d'adsorption entre enzyme et κ -caséine due à la réduction du pH a pour effet d'accélérer le processus d'agrégation et de diminuer le temps de la coagulation. En outre, ces auteurs précisent que la fermeté du gel présure augmente pour des valeurs de pH comprises entre 6,0 et 6,3. A des valeurs de pH inférieures à 6,0, la fermeté du gel est réduite et il y a une augmentation dans la valeur de l'angle de perte δ (voir partie : propriétés rhéologiques des gels), probablement due à la solubilisation excessive du calcium phosphate colloïdal qui agit comme un agent liant entre les molécules de caséines et les micelles de caséines. Le pH affecte à la fois la phase enzymatique et la phase d'agrégation des micelles.

Selon GORDIN et ROSENTHAL, (1977), plus le pH du substrat diminue plus le temps de coagulation est plus court. Les variations des activités coagulantes pour la pepsine de poulet et pour la présure étaient similaires pour un intervalle de pH allant de 5,1 à 6,2. Au-delà de ce pH, il a été remarqué que l'activité coagulante de la pepsine de poulet a diminué complètement en comparaison avec celle de la présure.

4-1-3- Concentration du calcium et temps optimum de floculation

Les variations du temps de floculation du substrat de Berridge par la pepsine ou par la présure en fonction de la concentration du CaCl_2 sont présentées dans la figure 24. Nous remarquons que l'allure de la courbe est similaire pour les deux enzymes. Ainsi l'augmentation progressive dans la concentration du chlorure de calcium entraîne une diminution dans le temps de floculation. Dans nos conditions de travail, la concentration en chlorure de calcium de 0,01 M. est considérée comme une concentration optimale utilisée pour la préparation du substrat de Berridge en vue d'évaluer le temps de floculation et par la suite estimer l'activité coagulante.

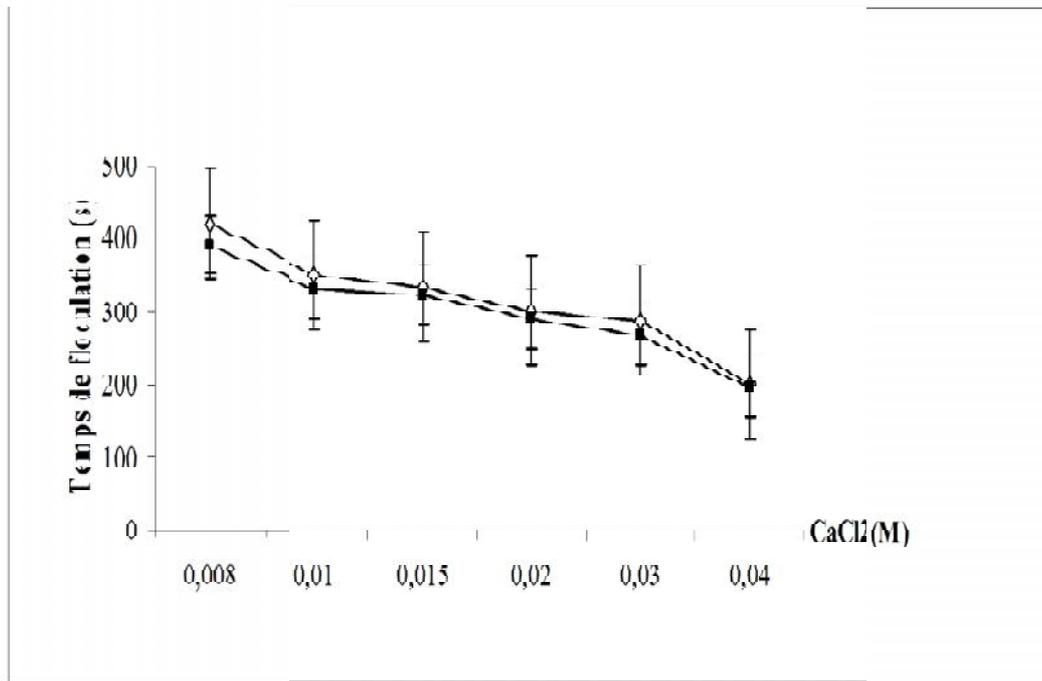


Figure 24 : Effet de la variation de la concentration en CaCl₂ sur la floculation du lait par la pepsine (◇) et par la présure (■)

D'après GORDIN et ROSENTHAL (1977), l'activité coagulante enzymatique dépend de la concentration du CaCl₂. Ce facteur, à des concentrations élevées, réduit le temps de coagulation et par conséquent augmente significativement l'activité coagulante. Il a été montré que l'activité coagulante de la pepsine de poulet et celle de la présure étaient fortement accrues pour des concentrations en CaCl₂ comprises entre 0,015 et 0,025 M. Cependant, à des concentrations basses, l'activité coagulante de la pepsine de poulet était inhibée plus que celle de la présure. Ceci était corrélé à la possibilité de l'augmentation du pH du substrat correspondant à ces concentrations en CaCl₂.

Selon TARODO De LA FUENTE, et ALAIS (1975), GASTALDI *et al.*, (1994), LUCEY, (2002a), NAJERA *et al.*, (2002), et LAGAUDE *et al.*, (2004), l'addition du CaCl₂ réduit le pH du lait et donc accélère la réaction de l'hydrolyse. La phase secondaire semble également être influencée par la teneur en calcium du milieu. Cet ion pourrait induire une diminution du potentiel de surface micellaire, accélérant de ce fait, la vitesse d'agrégation des particules en entraînant une augmentation de la fermeté du coagulum. L'addition du calcium (<50mM) réduit le temps de coagulation même à des valeurs de pH constantes du lait et la floculation apparaît pour une très basse hydrolyse de la caséine Kappa. Aussi, l'addition du calcium augmente la fermeté du gel présure, et ce

principalement par la neutralisation de la charge négative de la surface des micelles et probablement par la formation de ponts calciques. L'addition de forte concentration de CaCl_2 ($>0,1\text{M}$) réduit la fermeté du gel présure probablement par l'augmentation du taux de la charge positive sur la surface des micelles. La réduction de la teneur du calcium phosphate colloïdal des micelles de caséines d'environ 30%, empêche la coagulation sauf si la concentration en Ca^{++} augmente. Il apparaît que le déplacement du calcium phosphate colloïdal conduit à la rupture de la structure micellaire et d'où son incapacité à la formation du gel.

4-2-Suivi des caractéristiques physico-chimiques

4-2-1-Turbidité

Pour évaluer le degré d'agrégation des micelles dans le gel pepsine ou le gel présure, une étude portant sur la mesure du rayonnement des particules non dissoutes par turbidimétrie est réalisée. L'agrégation étudiée informe sur certaines interactions entre les particules de caséines pendant la formation des gels. Les profils de la cinétique de turbidité du gel pepsine et du gel présure sont présentés dans la figure 25.

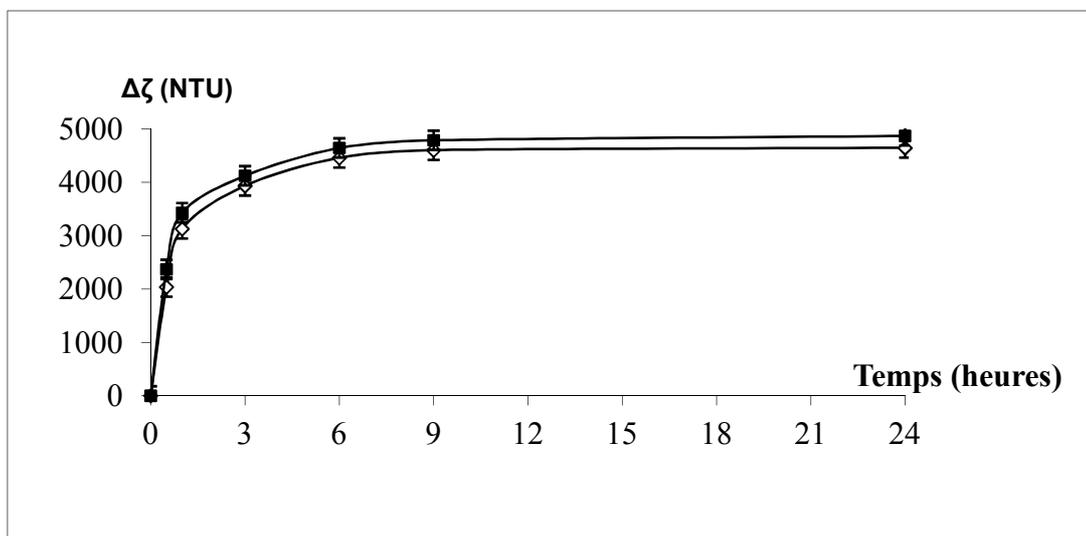


Figure 25 : Evolution de la turbidité au cours de la coagulation par la pepsine (◇) et par la présure (■)

Les deux gels présentent une bonne similitude dans l'allure générale avec une augmentation rapide de la turbidité pendant les six premières heures, avec la même intensité jusqu'à ce qu'ils atteignent environ 4800 NTU. La transition du lait au gel est exposée en deux phases :

la première phase correspond aux 6 heures premières où les micelles de caséines natives (50-500 nm) sont présentes sous forme d'amas dispersés de sphères denses et qui tendent à s'agréger particulièrement en présence d'ions de calcium (DE KRUIF, 1998 ; LEHNER *et al.*, 1999 ; DICKINSON et ELIOT, 2003). L'agrégation des micelles déstabilisées se produit lorsque le degré d'hydrolyse enzymatique atteint environ 60% à 80% et la diffusion aléatoire des particules parvient à une collision entre les particules de caséines (mouvement Brownien). L'ampleur de l'agrégation des caséinates dépend de la taille des micelles, de la concentration et des propriétés optiques des colloïdes, de la température qui affecte la force des interactions hydrophobes, du pH et de la force ionique qui affecte fortement les interactions électrostatiques (BANON et HARDY, 1992 ; DICKINSON et ELIOT, 2003, KLANDAR *et al.*, 2007).

Les micelles de caséine non dissoutes, réfléchissent plus de lumière et par conséquent, augmentent la turbidité. Cette augmentation est souvent attribuée à la formation continue de flocons et d'amas micellaires permanents et engendre en parallèle une augmentation du diamètre des micelles de caséines (AZUMA *et al.*, 1998 ; DALGLEISH, 1998 ; LEHNER *et al.*, 1999). La deuxième phase (de 6 à 24 heures) montre le maximum de turbidité pour les deux gels et forme un plateau à 4800 NTU. Pendant cette deuxième phase, l'agrégation des micelles mène à une transition sol-gel correspondant à la phase primaire caractérisée par l'action enzymatique puis à un gel ferme suite à l'agrégation des micelles déstabilisées (phase physique) et dont ses propriétés sont étroitement dépendants des facteurs intrinsèques de la coagulation.

En effet, la désintégration des micelles de caséine relève de la rupture des interactions hydrophobes internes et de la dissociation du colloïde phosphate de calcium. Les sub-micelles produites sont très hydrophobes et se réassocient en de petits agrégats de forme irrégulières. Enfin, cette partie de micelles de caséine agglomérées forme un gel. (DALGLEISH et HOLT, 1988; De KRUIF, 1999 ; OULD ELEYA *et al.*, 2004 ; MADADLOU *et al.*, 2005 ; QIN *et al.*, 2007).

Les principales interactions impliquées dans l'association des micelles de caséines se résument par la présence prépondérante des interactions hydrophobes, interactions de Van Der Waals, des liaisons hydrogène, et des liaisons électrostatiques déterminées par la présence de calcium ionique, de phosphate colloïdal, de ponts disulfure et autres ponts à ions divalents. L'énergie des interactions hydrophobes est comprise entre 4 et 10 kJ mol⁻¹,

celle de Van Der Waals environ 5 kJ mol^{-1} et celle des liaisons hydrogène entre 12 et 30 kJ mol^{-1} (HORNE et DALGLEISH 1980, LEFEBVRE-CASES *et al.* 1998a, LEFEBVRE-CASES *et al.*, 2001 ; DALGLEISH, 2007, GARRETT et GRISHAM, 2000 et PETSKO, 2008). Ainsi, la similitude probable entre le degré d'agrégation des micelles de caséines du gel pepsine et du gel présure pourrait être attribuée à la ressemblance des différents modes d'interactions de leurs protéines.

4-2-2-Conductivité

Les variations de la conductivité électrique des gels pepsine ou présure sont présentées dans la figure 26. La conductivité électrique du substrat de Berridge (pH 6,6) a été mesurée juste après sa préparation à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Elle est évaluée en moyenne à $4,89 \text{ mS/cm}$. Cette valeur est relativement proche de $5,12 \text{ mS/cm}$ donnée par NIELEN *et al.*, (1992). Après addition des enzymes et incubation de 0,5 heure à 9 heures de temps, cette conductivité a chuté fortement de $4,15$ à $1,45 \text{ mS/cm}$ pour le gel pepsine et de $4,03$ à $1,11 \text{ mS/cm}$ pour le gel présure. A partir de 9h d'incubation, nous notons une baisse faible dans les conductivités électriques pour le gel pepsine et le gel présure évaluées à $0,76$ et $0,53 \text{ mS/cm}$ respectivement.

Ceci dit qu'avant coagulation du lait, les minéraux contenus dans la phase aqueuse et la phase micellaire sont en équilibre et conduisent le courant électrique d'une manière stable et régulière. Après coagulation, cet équilibre est rompu et les minéraux des micelles et de la phase soluble se trouvent en répartition non équitable. La gélification du lait au cours du temps emprisonne en effet au fur et à mesure l'ensemble des minéraux micellaires et probablement une partie des minéraux de la phase aqueuse. Ceci conduit à la baisse de la conductivité électrique du milieu traduit par une indisponibilité des ions conducteurs et par suite une diminution des charges. Cet abaissement de conductivité peut aussi avoir comme facteur, la séparation du caséino-glycopeptide de la caséine Kappa par la présure qui est supposé être l'un des éléments conducteurs (TSOULI *et al.*, 1975).

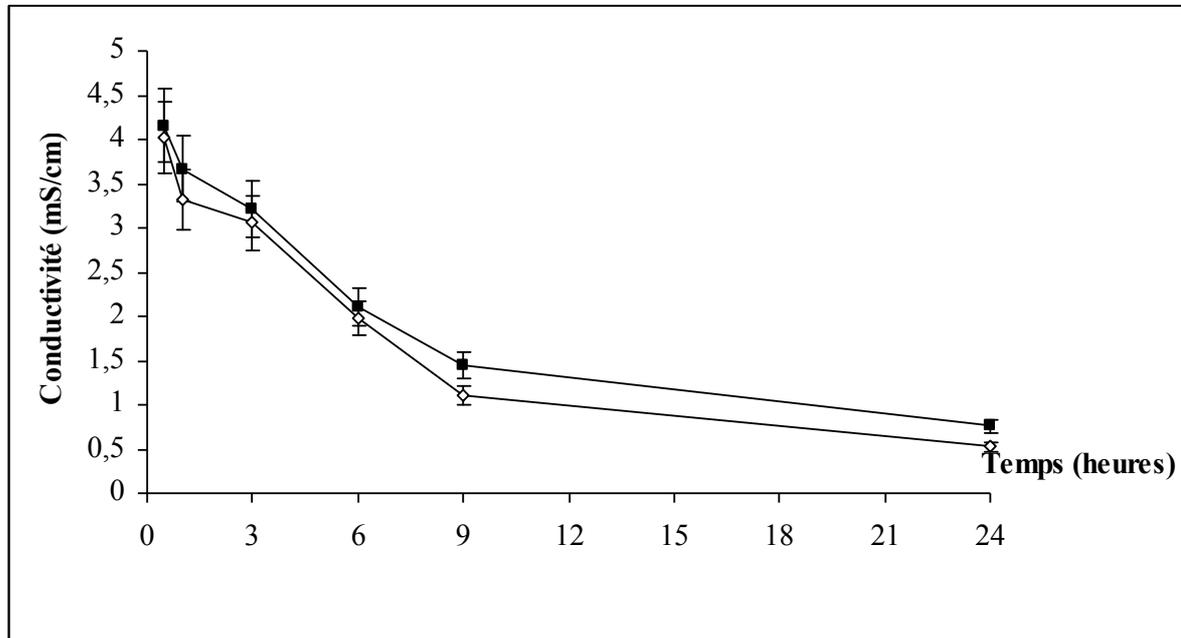


Figure 26 : Evolution de la conductivité du gel pepsine (◇) et du gel présure (■)

En effet, le lait a des propriétés conductrices car il contient des composants chargés, en l'occurrence les sels minéraux. La conductivité électrique du lait (4 à 6 mS/cm à 25 °C) est principalement déterminée par les ions sodium Na^+ , potassium K^+ et chlorures Cl^- . Leur distribution est sous forme de fractions de sel entre la phase soluble et la phase colloïdale qui dépend d'un équilibre pouvant être modifié par le pH et la température du lait. Notons que malgré leurs contributions minimes, les acides aminés libres de nature basique ou acide sont aussi des conducteurs de courant, alors que la contribution des protéines et des peptides est d'une importance mineure. Le lactose ne conduit pas de courant, cependant, sa fermentation en l'acide lactique augmente brusquement la conductivité. L'acidification du lait change l'équilibre de ses systèmes tampon et solubilise les sels calciques et les sels phosphoriques des caséines. Aussi, la diminution du pH cause l'hydrogénation des ions de phosphate monohydrogène aux ions de phosphate dihydrogène, qui ont une conductivité molaire basse. Ce phénomène augmente brusquement la conductivité qui libère les fractions de sels solubles. Alors que les lipides sont considérés comme étant une barrière pour la conductivité électrique des ions et empêchent leur mobilité, les acides gras libres qui peuvent être de bons conducteurs électriques sont négligeables dans le lait frais (CAPRITA *et al*, 2003, CAPRITA et CAPRITA, 2008).

La conductivité électrique du lait est principalement due à sa fraction de sel soluble, donc un phénomène complexe qui regroupe différents éléments de différentes natures

chimiques. Ces éléments possèdent un potentiel de conductivité électrique et sont liés soit à la micelle de caséine soit à la phase aqueuse (MUCCHETTI *et al.*, 1993, JUOZAITIENE *et al.*, 2010). La conductivité est l'un des paramètres physiques utilisé pour le suivi de la coagulation du lait (LUCHEY, 2002a).

Cette différence ($p < 0,05$) de conductivité électrique serait l'expression d'un éventuel emprisonnement progressif et croissant des minéraux conducteurs suite à l'accroissement de la fermeté du gel pepsine au cours du temps et par conséquent l'abaissement de la conductivité électrique. Ce résultat pourrait être à l'origine lié à l'existence des interactions hydrophobes et liaisons hydrogène qui seraient relativement importantes dans la constitution du réseau du gel pepsine.

4-3-Suivi des propriétés rhéologiques

L'étude rhéologique a permis d'approcher la viscosité, les seuils d'écoulement, le rapport viscoélastique et les forces de rupture du gel obtenu par la pepsine en comparaison avec ceux de la présure (figures 28,29, 30 et 31).

4-3-1-Viscosité

La courbe d'écoulement du substrat de Berridge (figure 27) montre une proportionnalité entre la contrainte de cisaillement τ (Pa) et la vitesse de cisaillement ($\dot{\epsilon}$) (1/s). Ceci est présenté par une droite croissante ($y=0,002 X$) qui passe par l'origine et de pente égale à la viscosité, valeur notablement constante.

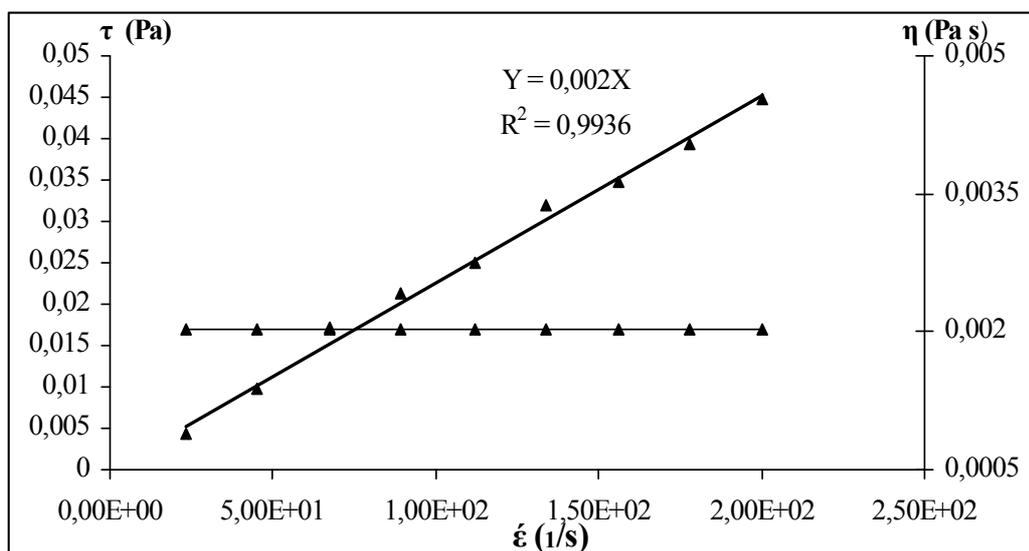


Figure 27 : Viscosité absolue du substrat de Berridge

Ces résultats montrent que ce substrat présente bien un comportement d'un liquide Newtonien. Il indique l'absence des forces de frottement des composants du lait et leur dispersion dans la phase aqueuse favorisant ainsi son écoulement continu.

L'application d'une vitesse de cisaillement de 200 s^{-1} en régime permanent non destructif a permis de tracer l'évolution de la viscosité apparente du gel pepsine et du gel présure en fonction du temps. La figure 28 montre que les deux courbes ont une allure similaire. Au départ, la viscosité est relativement stable ($0,002 \text{ Pa.s}$) durant les 257 premières secondes. Ceci pourrait s'expliquer par la stabilité de la caséine kappa traduite par un comportement Newtonien du substrat suite à la stabilité de la caséine kappa. Par la suite, un point d'inflexion est noté où la viscosité des deux gels commence à augmenter. A ce point, un temps estimé à 5,18 min., caractériserait le début de floculation. Au delà, la viscosité croît rapidement entre 5,18 et 23,4 min. pour atteindre un maximum de viscosité de $0,008 \text{ Pa.s}$ pour le gel pepsine et $0,007 \text{ Pa.s}$ pour le gel présure.

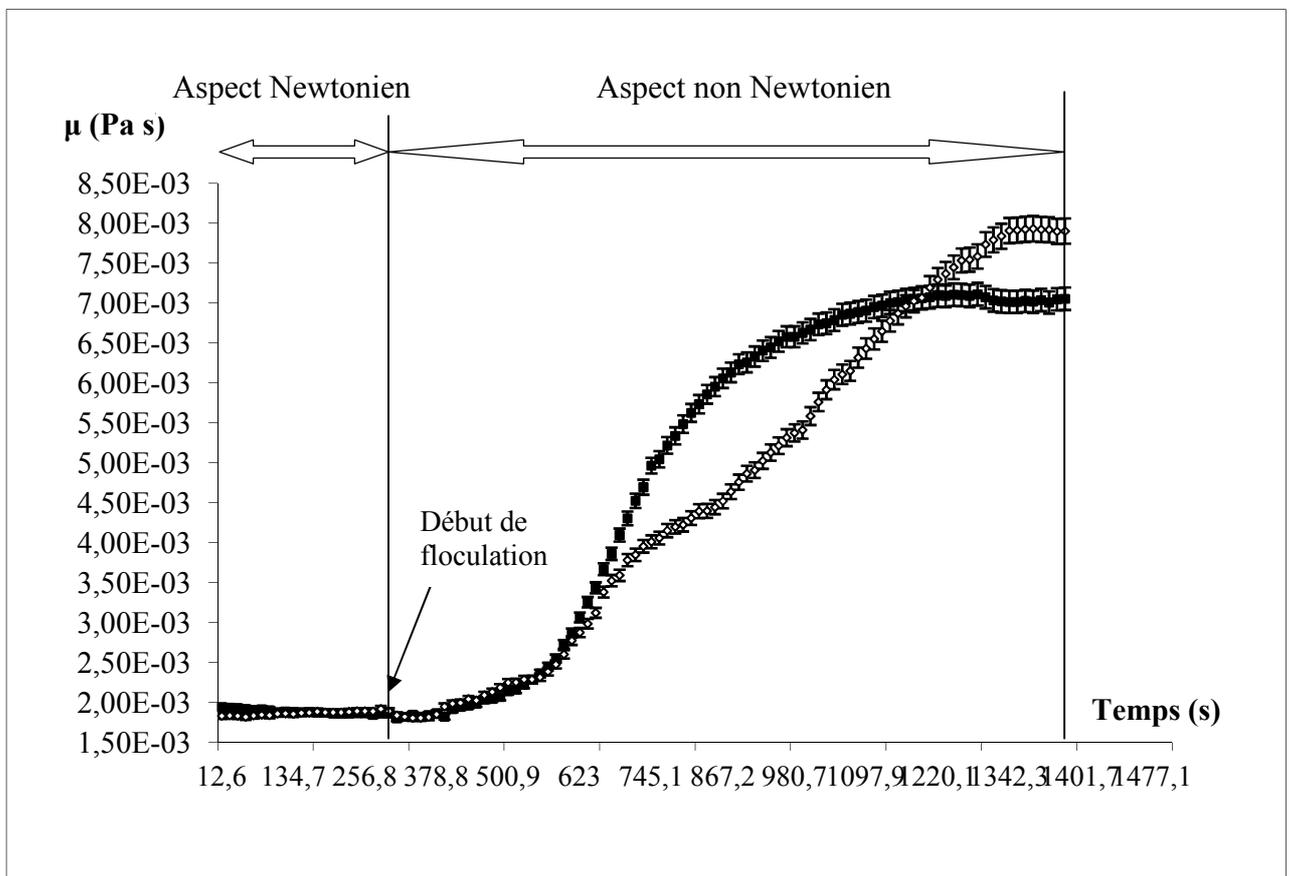


Figure 28 : Variations de la viscosité apparente du substrat de Berridge après coagulation par la pepsine (\diamond) et par la présure (\blacksquare).

En effet, cette approche a conduit à la visualisation du phénomène de la coagulation avec détermination du temps de floculation qui correspond au début de la déstabilisation de la caséine kappa (phase enzymatique) et le temps de coagulation qui représente le temps qui s'écoule depuis l'addition de l'enzyme coagulante jusqu'au moment où la viscosité atteint son maximum. Cette phase marque la phase d'agrégation des micelles déstabilisées appelée aussi phase physique ou phase transition liquide-gel.

Après hydrolyse par la présure, la caséine kappa est clivée au niveau de la séquence Phe 105-Met 106 et le segment hydrophile du c-terminal (résidu 106-169) est détaché de la molécule kappa et diffuse loin de la micelle à la phase aqueuse. Ce macropeptide est appelé caséinomacropeptide (CMP) ou encore (GMP) s'il est hautement glycosylé par la présence du N-acétylneuraminique fixé sur la thréonine. Ceci conduit à la réduction de la charge nette négative diminuant ainsi les forces de répulsion. Dans la première phase l'activité protéolytique de la présure ne fait que libérer les sites réactionnels nécessaires pour l'établissement de liaisons qui seront contractées au cours de la seconde phase d'agrégation de micelles. La légère réduction de la viscosité juste avant le démarrage de la seconde phase notée par la petite flexion correspond à une collision de 1 nm ou moins entre les particules de caséines (mouvement Brownien) ayant pour but, le rapprochement des sites réactionnels apolaires dégagés l'une de l'autre sous l'action des interactions hydrophobes, de forces de Van der Waals et de ponts calciques pour la formation d'un réseau de gel compact. En effet, l'accroissement considérable de la viscosité au cours de la phase physique s'explique donc par l'augmentation des interactions protéines-protéines, par l'exposition des chaînes latérales des acides aminés non polaires en surface de la molécule et par l'édification progressive d'agrégats micellaires grâce à des liaisons de différentes natures notamment de type hydrophobe (VEISSEYRE, 1979, ALAIS, 1984, BRULE *et al.*, 1997, KUDRYASHOV *et al.*, 2000, KONUKLAR et GUNASEKARAN, 2002).

Le processus d'agrégation dépend étroitement de la température et ne se passe qu'aux températures supérieures ou égales à 18°C. La viscosité du lait n'augmente qu'après un taux d'hydrolyse enzymatique avoisinant 87%. Ainsi il y a un chevauchement entre la phase d'hydrolyse et la phase d'agrégation des micelles (DALGLEISH, 1980, DALGLEISH, 1983).

Actuellement le mécanisme d'agrégation des micelles de caséines est étudié par simulation informatisée du mouvement Brownien. Avec cette approche, la conduite de l'agrégation des micelles soumises à différentes forces d'attraction peut être étudiée. Cette technique aide à la compréhension de l'influence des interactions entre particules sur les propriétés du gel (LUCY, 2002b).

Notons ici que la méthode utilisée pour l'étude de la viscosité du substrat de Berridge sous l'action de la pepsine ou de la présure est une méthode non destructive. Elle ne montre pas la phase du début de synérèse contrairement au mode destructif qui marque le début de l'exsudation du lactosérum. Ainsi, l'allure générale de l'évolution de la viscosité apparente (figure 28) du substrat de Berridge sous l'action de la présure est en accord avec celle observée par GASTALDI *et al.*, (1996).

4-3-2- Seuils d'écoulements

L'appréciation de la consistance et la cohésion des gels de pepsine et de présure a été approchée par les courbes d'écoulement données par la contrainte de cisaillement (τ) en fonction de la vitesse de cisaillement ($\dot{\epsilon}$) (figure 29). Ces courbes montrent une baisse de la viscosité apparente proportionnelle à la vitesse de cisaillement avec un comportement de liquides non Newtonien plastique caractérisant le liquide de Bingham de formule ($\tau = \tau_c + \alpha \tau$). Ces corps ne s'écoulent qu'à partir d'une valeur de la contrainte notée τ_c . Cette contrainte correspond au seuil d'écoulement et représente l'ordonnée à l'origine de la courbe.

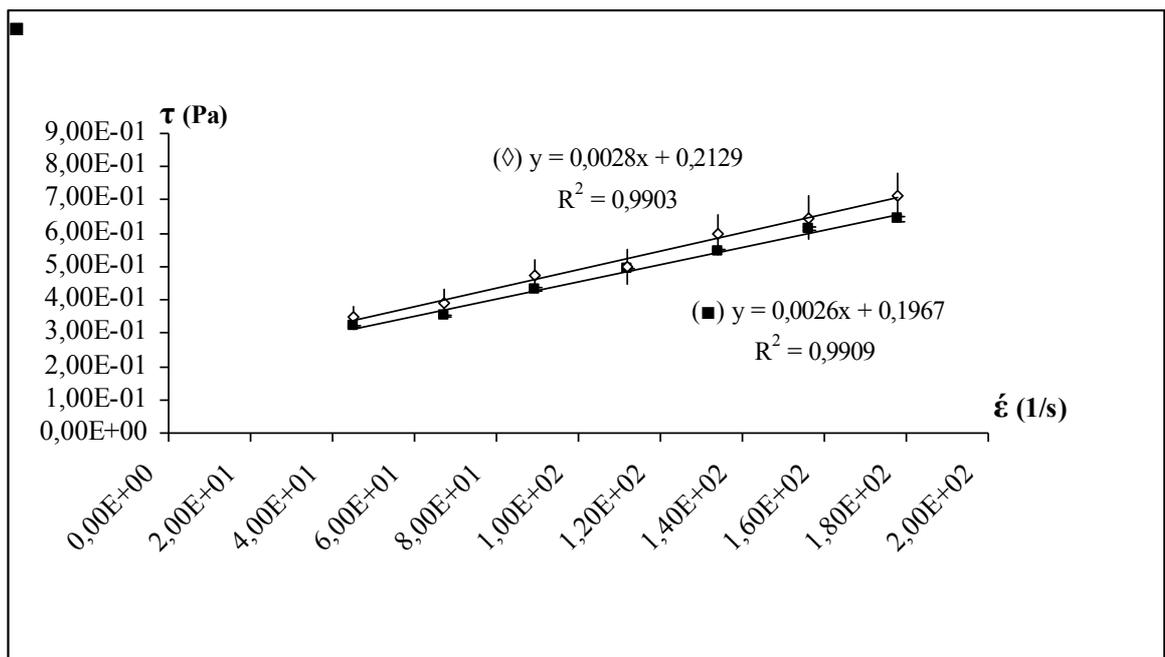


Figure 29: Rhéogramme des seuils d'écoulement du gel pepsine (◇) et du gel présure (■)

Ce seuil est de 0,2129 pour le gel pepsine et est de 0,1967 pour le gel présure. Ces deux valeurs proches indiqueraient une ressemblance probable dans la nature et /ou le nombre des liaisons impliquées dans l'élaboration des gels pepsine et présure. La réorganisation de la micelle et de ses sub-unités déterminent les propriétés rhéologiques des gels. Cependant, cette réorganisation spatiale est elle même déterminée par des possibilités d'interactions entre les différents types de caséines.

L'interprétation la plus communément admise d'un tel comportement revient à supposer que le corps considéré possède, au repos, une structure tridimensionnelle rigide représentée par un ensemble de particules floclées. Le seuil d'écoulement correspond à la force nécessaire pour les séparer, vaincre les forces de cohésion du type Van der Waals, et provoquer l'écoulement. Au delà de ce seuil, la structure rigide est détruite et l'écoulement s'effectue sous l'effet de la contrainte effective ($\tau - \tau_c$). Les liaisons assurant la cohésion sont par conséquent rompues et les particules caséiniques dispersées s'orientent totalement et instantanément dans le même sens que l'écoulement. Le corps se comporterait ensuite comme un liquide Newtonien. Notons que le seuil de l'écoulement joue un rôle très important dans la description du comportement plastique dans la mesure où il définit la limite entre deux régimes de déformation très distincts (GUTHY *et al.*, 1989, COUARRAZE et GROSSIORD, 1991). La similitude de comportement à l'écoulement entre les gels pepsine et présure serait liée à une ressemblance dans la nature de liaisons impliquées dans leurs microstructures.

4-3-3-Viscoélasticité

Des mesures en mode oscillatoire non destructif à faible déformation ont permis la détermination du module élastique conservatif G' (préservation de l'énergie), le module visqueux dissipatif G'' (module de perte) et l'angle de perte delta (δ) du gel pepsine et du gel présure présentés dans la figure 30. Les modules élastique (G') et visqueux (G'') des deux gels évoluent dans le même sens dans un intervalle de fréquence allant de 0,0035 à 0,04 Hz. Le G' varie de 0,30 à 0,74 Pa pour le gel pepsine et de 0,50 à 1,47 Pa pour le gel présure. Le module visqueux varie quant à lui de 0,1 à 0,53 Pa pour le gel pepsine et de 0,18 à 0,81 Pa pour celui de présure.

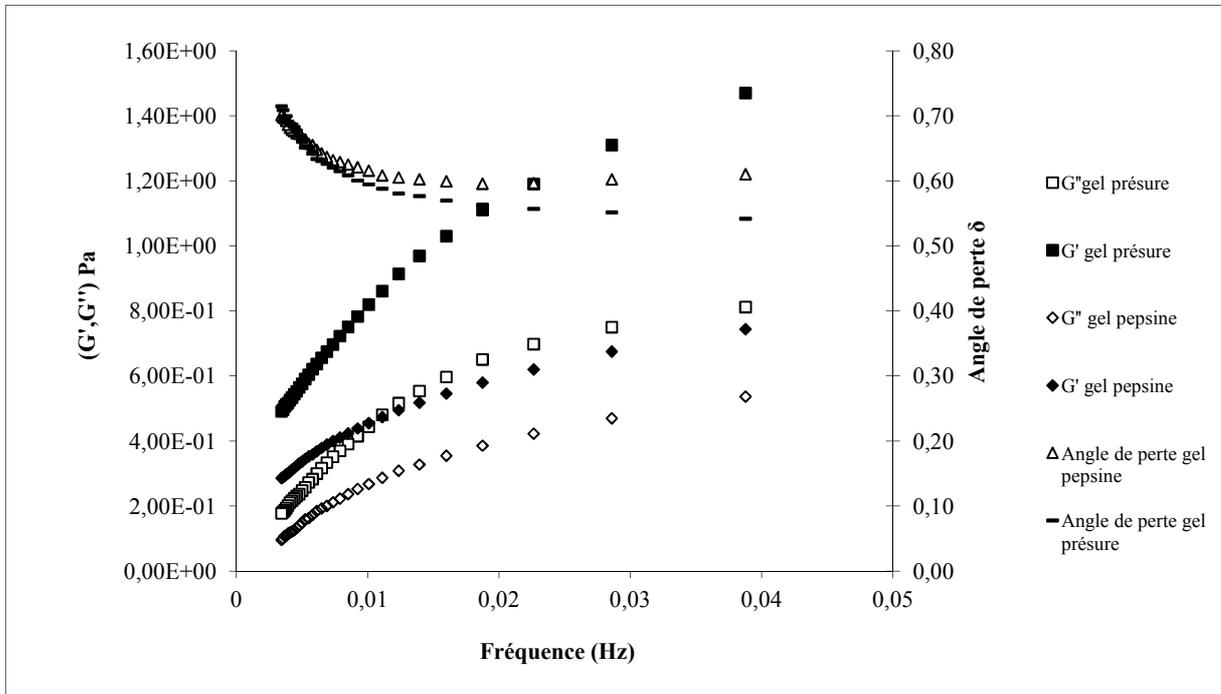


Figure 30 : Propriétés viscoélastiques du gel pepsine et du gel présure

D'autre part, la décroissance de l'angle de perte δ (<1) montre que le caractère élastique l'emporte sur le caractère visqueux pour le même gel ($G' > G''$) et entre les deux gels, constaté par l'abaissement de l'angle de perte δ . Ce paramètre est de valeur de 0,60 pour le gel pepsine et de 0,55 pour le gel présure. Les gels présure semblent légèrement élastiques et visqueux que ceux de pepsine, ce qui a conduit à des angles de perte tang (δ) relativement faibles pour la présure que pour la pepsine.

Selon VETIER *et al.*, (2000), le module conservatif G' d'un gel présure est compris entre 10 et 500 Pascal alors que le module dissipatif G'' est compris entre 10 et 200 Pascal.

En effet, le module élastique (G') représente, le nombre de liaisons permanentes qui puissent exister dans un corps soumis à une certaine déformation. Ce paramètre reflète probablement la fusion continue des micelles qui mène à l'augmentation de la surface de contact entre les particules agrégées et possibilité de l'incorporation de particules additionnelles au réseau du gel formé. Généralement, on mesure cette composante (G') afin de suivre la fermeté d'un coagulum. L'angle de perte δ représente une appréciation du caractère visqueux (liaisons susceptibles de se rompre) par rapport à son caractère élastique (liaisons permanentes). Ainsi, la chute initiale de l'angle de perte δ est liée à une diminution du caractère visqueux et au relâchement (détente) des liaisons dans le gel

pendant sa déformation. En conséquence, l'aspect élastique augmente (BOHLIN *et al.*, 1984). Cette étape permettrait la création d'une éventuelle nouvelle distribution spatiale et une réorganisation structurale créant de nouvelles interactions (liaisons hydrophobes, hydrogène et électrostatiques) entre les caséines (LUCEY *et al.*, 1997 ; ZOON *et al.*, 1988a et 1988b ; SRINIVASAN et LUCEY, 2001 et LUCEY, 2002a). Ces interactions qui s'établissent d'une manière très progressive dans le gel présure (TARODO De la FUENTE *et al.*, 1999) et probablement dans le gel pepsine seraient responsables dans la préservation de leurs fermeté et de leurs compacité.

4-3-4-Force de rupture

Les propriétés mécaniques des gels de présure et de pepsine de poulet sont étudiées à travers l'évolution de la force de rupture en fonction du temps (figure 31).

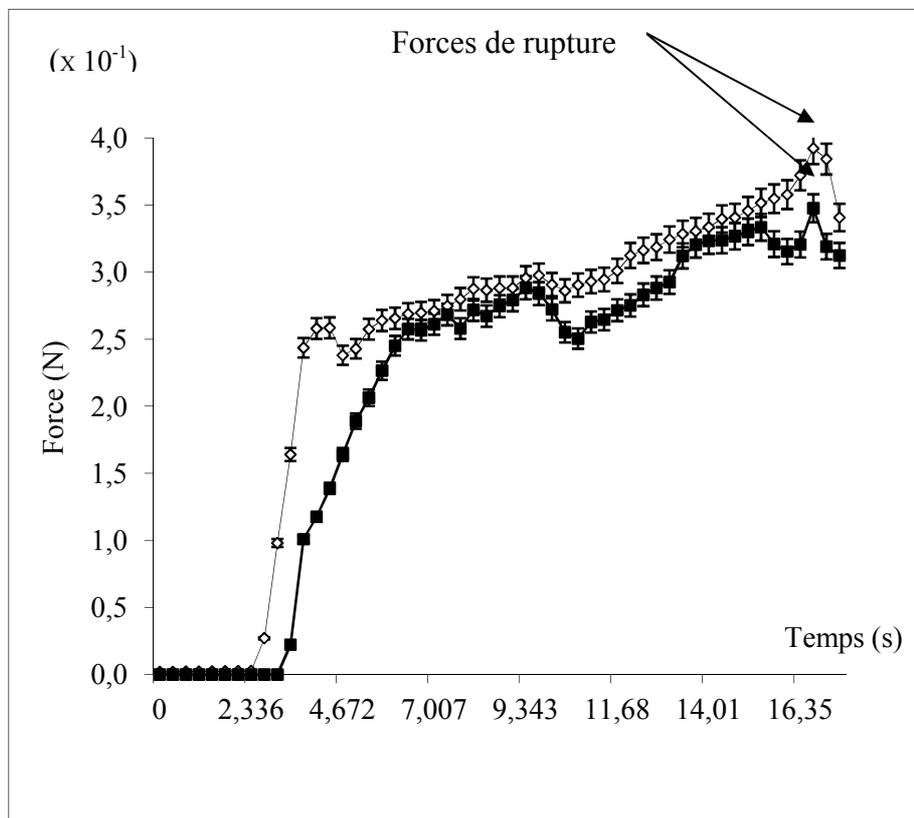


Figure 31 : Forces de rupture du gel pepsine (◇) et du gel présure (■)

Au départ, nous assistons à une résistance graduelle vis-à-vis des forces de compression appliquées, jusqu'à la force de 0,34 N et la force de 0,38 N où sont notés les deux points de rupture du gel présure et du gel pepsine respectivement. Ce dernier semble être relativement ferme que le gel présure étudié ou que ceux décrits par CAYOT *et al.*,

(2003) et LUCEY *et al.*, (2003), qui donnent une valeur moyenne pour le point de rupture du gel lactique évaluée à 0,25 N et du gel présure à 0,32N. En effet, la fermeté exprimée en rhéologie par la consistance est le travail exigé pour atteindre la déformation indicative des forces de liaisons internes existantes dans le produit.

Selon DAVIAU (2000a, b, c), LUCEY, (2002b) et LUCEY *et al.*, (2003), la fermeté du gel présure augmente avec l'augmentation de la concentration de la caséine. Ainsi, une augmentation dans le taux des caséines conduit à une augmentation de la rigidité et de la fermeté du caillé. Un taux élevé en minéraux dans les caséines conduit à l'établissement d'un nombre élevé d'interactions caractérisées par de fortes liaisons entre elles qui résistent encore plus aux contraintes de déformation. La contrainte de rupture signalée par la suite est assez importante lorsque le taux de caséines est élevé. Certains auteurs comme McMAHON et BROWN (1984), ZHOU et MULVANEY, (1998), CALVO, (2001), LUCE (2002a), MISHRA *et al.*, (2005) et PHADUNGATH (2005), PARK *et al.*, (2007), trouvent que les propriétés texturales d'un gel sont liées principalement à la concentration de la caséine, au pH, et à la température. De plus, ils annoncent que la rigidité du gel et ses propriétés viscoélastiques sont strictement liées à la teneur élevée en matière sèche exprimée en protéines, principalement en caséines. Ces dernières sont efficacement reconnues pour donner une constitution solide au gel et une structure élastique continue. Aussi, il a été démontré que l'eau pourrait jouer le rôle d'un lubrifiant entre caséines, donc, toute diminution dans la teneur en eau dans le gel peut réduire la mobilité entre les micelles de caséines. Cela mène à l'obtention d'un gel plus résistant aux différentes déformations rhéologiques. La rigidité d'un gel augmente avec la diminution de sa teneur en eau, et probablement à la forte réduction de la répulsion électrostatique.

Ainsi, la force de rupture du gel pepsine laisse présager l'existence de liaisons intramicellaires et par conséquent structurales et texturales encore plus résistantes aux déformations mécaniques que celles du gel présure.

4-4-Synérèse

La cinétique de la synérèse du gel pepsine et du gel présure est présentée dans la figure 32. La courbe de l'exsudation du lactosérum pour les deux gels montre deux phases différentes.

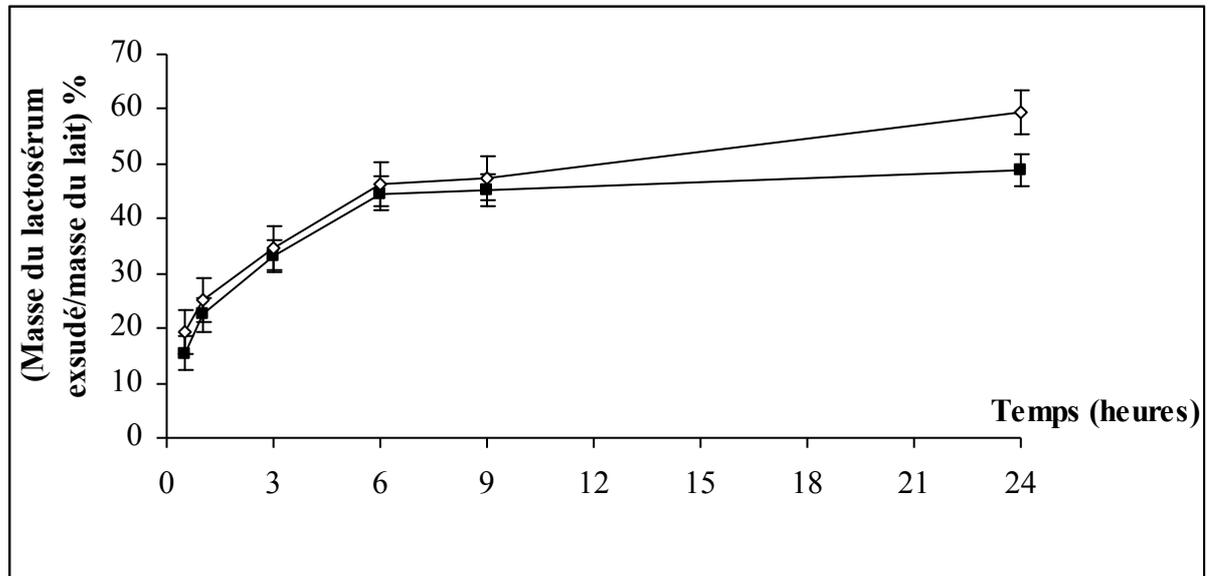


Figure 32 : Profil de la synérèse du gel pepsine (◇) et du gel présure (■)

La première phase correspond à une expulsion rapide du lactosérum notée d'un taux d'exsudation de 19 à 45 % (m/m) pour le gel pepsine et de 15 à 42 % (m/m) pour le gel présure dans un intervalle de temps allant de 0,5 heure à 6 heures. La deuxième phase correspond par contre à une expulsion du lactosérum relativement lente. Elle tend à former un plateau pour le gel présure avec un taux final de 42 % relativement stable de 9 heures à 24 heures. Contrairement au gel pepsine, l'exsudation tend à former un palier de 6 heures à 9 heures d'un taux de 45 % puis à augmenter progressivement de 9 heures à 24 heures d'un taux final de 58 %.

L'allure de la cinétique de synérèse s'approche de celles de CALVO et BALCONES (2000) obtenues lors des travaux menés sur la coagulation du lait par la présure. Selon la littérature, la voluminosité de la micelle native est de $3,3 \text{ mL.g}^{-1}$. Après action de la présure, elle diminue à $2,4 \text{ mL.g}^{-1}$ environ. La diminution initiale du degré d'hydratation des micelles de caséine peut être attribuée à la contraction de l'enveloppe protéique sous l'effet d'une neutralisation des charges et d'un accroissement des interactions protéiques (VETIER *et al*, 2000).

Le tranchage de la surface du gel présure aide au commencement du phénomène de la synérèse. La pression endogène de la synérèse c'est-à-dire la pression interne du gel responsable de l'expulsion du lactosérum n'est pas constante. Initialement, elle augmente proportionnellement avec le temps après emprésurage puis diminue au cours du temps.

Ceci est dû à la fusion des para-caséines conduisant à la réduction de la perméabilité du réseau du gel contracté (DAVIAU, 2000a).

Le mouvement de l'eau dépend du comportement endogène de la synérèse qui est étroitement lié au caractère dynamique de la caséine. La capacité de la caséine à retenir l'eau lors de la coagulation présure, résulte de la libération du caséinomacropéptide hydrophile de la micelle de caséine, de la diminution de l'hydratation native de la caséine et du réarrangement du réseau des particules de caséine dans le caillé. L'augmentation dans la concentration des caséines de 27 à 36 g.kg⁻¹ conduit à une diminution de la synérèse par diminution du poids final du lactosérum (réduction moyenne de 25 g). Aussi, elle permet une élévation dans la teneur de l'extrait sec du gel égoutté d'une moyenne de 25,5 g.kg⁻¹ ce qui pourrait conduire à l'accroissement de la fermeté du caillé formé avec des grains moins déformés. Le facteur principal de la synérèse est le réarrangement du réseau qui implique une déformation des paracaséines et du mouvement Brownien. En effet, le mécanisme responsable de la tendance du gel présure à la synérèse est lié au réarrangement extensif des caséines qui apparaît après formation du gel. Ce processus de réarrangement est accéléré voire plus extensif à des valeurs de températures élevées et de pH bas. Le réarrangement des particules de caséines dans une structure plus compacte va augmenter le nombre des liaisons internes du gel et par la suite la mise d'un réarrangement approprié et adapté des molécules internes du système (DAVIAU *et al*, 2000a, DAVIAU *et al*, 2000a, DAVIAU *et al*, 2000c, DAVIAU *et al*, 2000d, LUCEY, 2002a). Aussi, il a été reporté que l'aptitude du gel à expulser le lactosérum devient progressivement réduite lorsque le gel est laissé pendant un temps assez long suite à une réduction de la force ionique.

Après synérèse, des changements dans la balance des sels et aussi dans la minéralisation et la structure du caillé sont observés (DAVIAU, 2000a ; DAVIAU, 2000b ; DAVIAU, 2000d).

4-5-Suivi de la protéolyse

4-5-1-par les fractions azotées libérées

L'activité protéolytique de la pepsine de poulet en comparaison avec celle de la présure a été aussi estimée par l'évaluation de la libération des fractions de NPN et de NCN, présentées dans la figure 33.

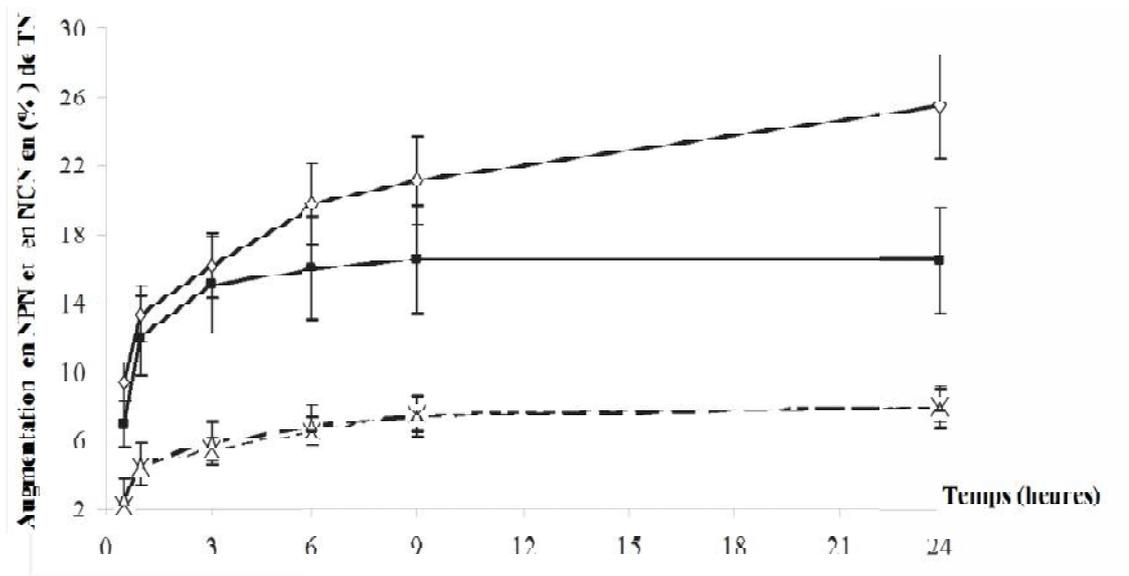


Figure 33 : Evolution de l'augmentation du NPN (Δ , \times), et du NCN (\diamond , \blacksquare) du gel pepsine et du gel présure respectivement

Les taux initiaux de Non Protein Nitrogen (NPN) et de Non Casein Nitrogen (NCN) déterminés dans le substrat de Berridge utilisé, sont respectivement 5,08 % et 33,33 % de l'azote total (TN) (voir tableau 7). Ces résultats s'accordent avec ceux donnés par ALAIS (1984) et qui sont respectivement 5 % et 32 % de l'azote total pour NPN et NCN du lait écrémé.

La libération de NPN du gel pepsine et du gel présure est précédée à des taux similaires ($p > 0,05$) et en deux étapes : (1^{ère} étape) : 0,5-9 heures pendant laquelle nous assistons à une augmentation en NPN d'environ 5,82 % de TN pour la pepsine et 5,42 % de TN pour la présure (figure 33). Ces augmentations ont donné des taux en NPN (par addition du NPN initial) de 10,90 % et 10,50 % de l'azote total pour la pepsine et pour la présure respectivement ; (2^{ème} étape) : 9-24 heures, pendant cette phase, nous constatons une faible augmentation de NPN évaluée approximativement à 0,5 % pour donner un taux final moyen en NPN de 11,40 % et 11 % de TN pour la pepsine et pour la présure respectivement. Cette étape est caractérisée par la formation d'un plateau marquant ainsi une stabilité dans la libération des fractions azotées non protéiques.

Cependant, l'activité protéolytique relative à la libération des fractions NCN, montre une différence significative ($p < 0,05$), entre la pepsine et la présure. Pour la pepsine, nous notons une augmentation continue dans la libération de NCN, d'environ 16 % de

l'azote total de 0,5h (9,39 %) à 24h (25,51 %) (figure 33) soit un taux en NCN de 42,72 % de TN qui s'élève jusqu'à 58,44 % de TN après addition du NCN initial. Cependant, la présure montre deux niveaux d'activité protéolytique. Le premier caractérisé par une augmentation dans la libération de NCN d'environ 9,5 % de 0,5h (7,02 %) à 9h (16,53%) soit un taux en NCN de 40,35 % de TN qui continue à s'élever jusqu'à 49,86 pour marquer le deuxième niveau allant de 9h à 24 h, caractérisé par une stabilité dans la libération de NCN

La similitude dans la libération des fractions de NPN sous l'action de la pepsine ou de la présure pourrait être expliquée par l'activité protéolytique limitée et spécifique de ces deux enzymes. En effet, pendant la première phase de dégradation, correspondant à la phase enzymatique, la caséine κ est clivée spécifiquement au niveau de la liaison 105-106 (Phe-Met), alors que l' α et la β caséines ne sont pas affectées. La caséine κ donne un taux de NPN qui constitue environ 8 à 10 % de l'azote total (ALAIS, 1984). Cette sélectivité et spécificité de la présure pour son substrat, la caséine kappa fait d'elle l'enzyme par excellence utilisée en fromagerie (DANLEY *et al.*, 1988).

L'augmentation en NPN et en NCN en p. cent de l'azote total dépend étroitement de l'enzyme coagulante utilisée, des conditions du milieu (concentration, pH, température) ainsi que du temps d'incubation. En effet, BARBANO ET RASMUSSEN (1992), SOUSSA et MALCATA, (1997) et SOUSSA et MALCATA, (1998), rapportent que l'augmentation en NPN dans 12 % de concentration finale de TCA pour la pepsine bovine, ovine, et caprine varie de 1 % à 2 % pendant un temps moyen d'incubation de 90 minutes. Pour la pepsine de poulet, ce taux est de 1,2 % pendant 120 minutes d'incubation (GORDIN et ROSENTHAL, 1972).

HOUINS *et al.* (1973), ont étudié l'évolution de la protéolyse de la présure exprimée en NPN en p. cent de l'azote total ainsi que l'évolution de la protéolyse par ses substituts emporase, rennilase et suparen extraites de *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* et *Endothia parasitica* respectivement, pendant un temps d'incubation allant de 5 heures jusqu'à 5 jours. Les résultats ont montré un taux de NPN moyen évalué à 7,5 % pendant 24 heures d'incubation. Ce taux s'élève à 13% environ pendant 5 jours d'incubation, soit une augmentation moyenne de 1,5 % et 8 % de NPN (en p.cent de l'azote total) respectivement. Le taux des fractions de NPN libérés suite à l'action des substituts de présure suscités sont en moyenne de 6,5 % pour un temps d'incubation de 24 heures, où

L'augmentation en NPN est approximativement de 1,5 %. Toutefois, les proportions de NPN augmentent de manière distinctive et spécifique après 5 jours d'incubation pour chaque enzyme. Elles sont de l'ordre de 8 % pour l'emporase, 14 % pour la rennilase et 18 % pour la suparen. Celles-ci correspondent à un taux d'augmentation en NPN de 3%, 9 % et 13 % de TN respectivement.

Dans ce même contexte, et pour d'autres enzymes protéolytiques, ALAIS (1984), rapporte que la trypsine, la chymotrypsine et les protéases microbiennes libèrent continuellement le NPN sans atteindre une stabilité dans la solution de TCA à 12% de concentration finale. Cependant, la stabilité est observée uniquement pour la pepsine et pour la chymosine après un temps d'incubation total de 50 minutes où l'augmentation en NPN est de 2,5 %.

Le taux de NCN libéré en p.cent de l'azote total suite à l'action de la présure, varie en moyenne de 35 % à 40 % pour un temps d'incubation allant de 60 min. jusqu'à 5 jours (HOUINS *et al.* 1973, ALAIS, 1984, IDF, 1991, IDF, 1999). Cependant, ce taux connaît une montée très importante lors de la protéolyse des fromages affinés. En effet, il constitue un bon indice de maturation allant en moyenne de 45 % pour un temps d'affinage moyen de 4 à 6 semaines pour les fromages à pâte molle (ex : Camembert, Brie) et de 60 % environ pour un temps d'affinage moyen de 12 à 30 semaines pour les fromages à pâte pressée cuite (ex : Emmenthal, Beaufort, Comté), (IDF, 1991, Mc SWEENEY *et al.*, 1995, IDF, 1999, SOUSA *et Mc SWEENEY*, 2001, SOUSA *et al.*, 2001 ; YAZICI *et DERVISOGLU*, 2001 ; ROSEIRO *et al.*, 2003 ; CALVO *et al.*, 2007 ; DELGADO *et al.*, 2011).

La différence dans la libération des fractions de NCN, pourrait être commentée par l'activité protéolytique de chacune des enzymes qui est liée étroitement et dépendante de leurs structures tridimensionnelles. L'analyse aux rayons X a permis l'identification des sites actifs de nombreuses aspartyl protéases. Elle montre que ces enzymes ont une structure tridimensionnelle semblable et que leurs sites actifs consistent en une crevasse à laquelle la molécule du substrat s'adapte de façon complémentaire. Le site actif a la forme d'une poche bordée par des résidus d'acides aminés possédant des groupements polaires chargés. Dans le cas général des pepsines, le site actif est constitué principalement de deux résidus aspartyls, Asp 32 et Asp 215 (cas de la pepsine porcine) séparés par environ 183 résidus d'acides aminés de natures différentes. Cette structure permet aux protéases d'avoir

des réactivités chimiques distinctes et une activité protéolytique dissemblable (ERSKINE, 2003 ; KAMOUN *et al.*, 2003). Alors que la pepsine coupe préférentiellement les résidus d'acides aminés à noyaux aromatiques (Tyr, Trp, Phe) et déstabilise les liaisons hydrophobes des résidus d'acides aminés non polaires (Leu, Ile, Ala Val) (BAYLISS *et al.*, 1969 ; KEIL, 1992 ; ANDREEVA et RUMSH, 2006 ; QI *et al.*, 2007 ; MADY *et al.*, 2011), la présure coupe uniquement son substrat spécifique, la kappa caséine en Phe (105)-Met (106) en donnant la paracaséine kappa (κ -CN f1-105) qui reste attachée aux micelles de caséines et le glycomacropetide (κ -CN f106-169) fraction libérée dans le lactosérum. La présure a une activité spécifique et limitée. Pour cette raison la protéolyse limitée est l'une des caractéristiques à prendre en considération pour la sélection des substituts de présure (TSOULI *et al.*, 1975, FOX *et al.*, 1994, ANDREEVA et RUMSH, 2006 , MADY *et al.*, 2011). Le clivage du substrat par la pepsine aiderait à l'apparition d'une quantité d'hydrolysats encore plus importante que celle qui apparaît sous l'action de la présure. Ceci pourrait être appuyé par les études faites par BAYLISS *et al.*, (1969), qui montrent que le site actif de la pepsine contient plusieurs groupes carboxyliques, responsables de son activité catalytique et par conséquent favorise encore mieux l'hydrolyse d'une large gamme de liaisons peptidiques. Aussi, la propriété remarquable de cette hydrolyse est que l'étendue de l'action protéolytique de la pepsine se fait dans un large intervalle de pH allant de 1,0 à 7,0 (ANDREEVA et RUMSH, 2006). L'adaptation du substrat avec le site actif met en jeu de nombreuses liaisons (de type hydrogène, ionique, hydrophobe, Van der Waals) et c'est l'ensemble de ces liaisons qui définit l'interaction optimale du substrat dans le site actif (WALLACH, 1997).

La tendance de l'augmentation et de la stabilité des fractions de NPN et de NCN libérés sous l'action des deux enzymes est en accord avec celle donnée par certains auteurs. En effet, GORDIN et ROSENTHAL (1978) rapportent que la libération de NPN après hydrolyse par la pepsine de poulet ou par la présure est similaire. Aussi, ils précisent que le taux de NCN varie entre 0,89 et 2,83 % de l'azote total pour les fromages préparés à partir de la pepsine de poulet et de 0,66 à 1,90 de l'azote total pour ceux fabriqués par la présure.

4-5-2- par séparation électrophorétique

Dans le but de déterminer les produits de dégradation issus de la caséine α , la caséine β et la caséine κ par la pepsine ou par la présure, l'activité protéolytique a été suivie par urea-PAGE et par SDS-PAGE. Les profils de dégradation des caséines pendant des temps différents sont montrés par les électrophorégrammes en figures 34 et 35.

En urea-PAGE, les produits de dégradations α ₁I-CN et β I-CN issus des caséines bovines α ₁-CN et β -CN respectivement par l'action de la pepsine ou de la présure apparaissent sous forme de bandes distinctes et à des temps d'incubation différents. Les produits de dégradation α ₁I-CN ont été observés en premiers avant ceux de la présure pour le même temps de réactions enzymatiques (figure 34). Ils apparaissent clairement depuis 0,5 heure jusqu'à 3 heures d'incubation, puis leur intensité commence à diminuer depuis 6 heures jusqu'à 24 heures d'incubation. Ceux de la présure apparaissent encore plus tard, à partir de 6 heures d'incubation et commencent à disparaître à partir de 9 heures d'incubation. Les produits de dégradation β I-CN ont été observés à partir de 0,5 heure jusqu'à 24 heures d'incubation pour la pepsine. Pour la présure, ils ont commencé à apparaître tardivement et ce, à partir de 6 heures d'incubation, puis leur intensité diminue à partir de 9 heures d'incubation. La caséine γ a été principalement observée à 0,5 heure d'incubation pour les deux enzymes. Ces résultats montrent que la pepsine a une action protéolytique sur les caséines α s et β plus élevée que celle de la présure. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'activité protéolytique de la pepsine sur les caséines lors de la libération des fractions de NCN de 0,5 heure à 24 heures d'incubation sans aucune stabilité (figure 36). Par ailleurs, l'apparition tardive des bandes α ₁I CN et β -I CN issues de l'hydrolyse de α -CN et β -CN par la présure et la diminution de leur intensité depuis 9 heures jusqu'à 24 heures d'incubation, montrerait l'action limitée de cette enzyme sur ces caséines présentée par la stabilité dans la libération des fractions de NCN (figure 33).

Selon FOX *et al.*, (1994), CHOISY *et al.*, (1997), et TRUJILLO *et al.*, (2000), la présure agit sur Phe23-Phe24 de la caséine α ₁ pour donner un peptide considérable α ₁-CN composé de 167 acides aminés (Phe 24-Trp199) appelé α ₁I. Il présente une mobilité électrophorétique élevée comparée à celle de α ₁. Les produits α ₁I sont observés pour chaque cas d'hydrolyse enzymatique. Ils sont principalement composés de Leu169-Gly170, Leu149-Phe150, Phe28-Pro29, Phe153-Phe154, Leu156-Asp157, Tyr159-160 et Trp164-Tyr165, Phe32-Gly33, Leu101-Lys102, Leu142-Ala143, et Phe179-Ser180. Le

clivage de la caséine β par la présure au niveau du site Leu192-Tyr193, produit β -I CN qui correspond à un peptide très amer composé de 192 acides aminés (Arg1-Leu192). De plus, la présure agit sur six autres sites de la caséine β qui sont Ala189-Phe190, Leu165-Ser166, Gln167-Ser168, Leu163-Ser164, Leu139-Leu 140, Leu 127-Thr128.

UPADHYAY *et al.*, (2004) confirment que l'hydrolyse de la caséine α_1 est plus rapide que celle de la caséine β pendant la coagulation comme le révèle nos résultats observés en l'urea-PAGE.

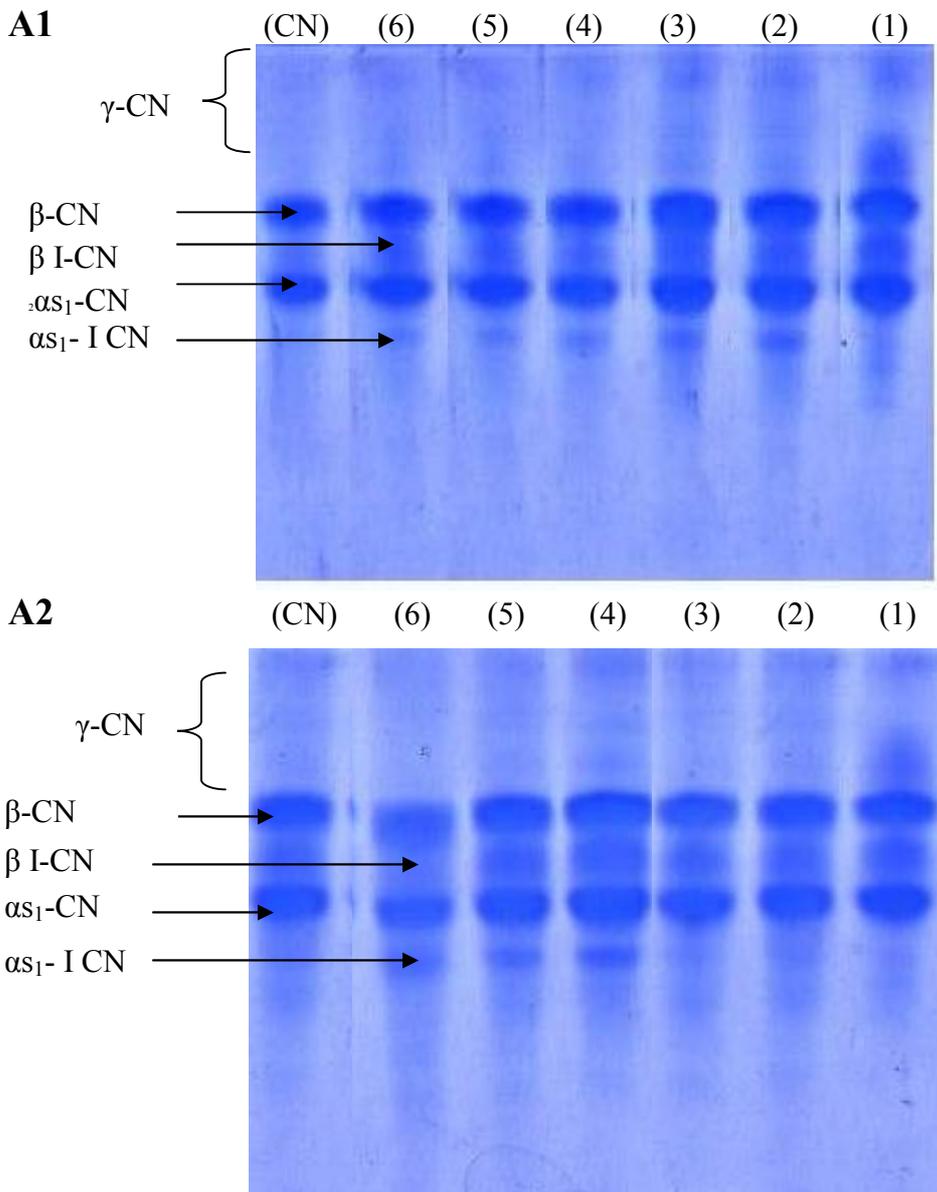


Figure 34 : Urea-PAGE de la protéolyse des caséines bovines par la pepsine (A1), ou par la présure (A2) à pH 6,6, 30°C. Bandes de 1-6 : caséines après incubation pour 0,5, 1, 3, 6, 9, 24 heures respectivement. (CN), caséines natives.

D'autres auteurs rapportent que la caséine bovine β est moins susceptible à la protéolyse par les enzymes aspartiques de l'extrait de *Centaurea calcitrapa* et *Cynara cardunculus* que celle de la caséine α s (TAVARIA *et al.*, 1997). Le maximum du taux de l'hydrolyse par ces enzymes d'origine végétale est atteint dès les premières trois heures d'incubation, principalement pour α s-CN ensuite, il diminue (SILVA *et al.*, 2002). La pepsine hydrolyse la caséine α s₁ en Phe 23-Phe 24, Phe 28-Pro29, Leu40-Ser41, Leu 149-Phe150, Phe153-Tyr 154, Leu 156-Asp157, Tyr 159-Pro160 et Trp 164-Tyr 165 à pH 6,6 (DAVE *et al.*, 2003).

Les produits de dégradation de la caséine Kappa en urea-PAGE n'ont pas été observés car dans les caséines bovines, la caséine kappa est composée de plusieurs fractions avec la même chaîne peptidique, des carbohydrates différents et de deux résidus de cystéine par molécule à l'état natif. Après traitement par des agents réducteurs, la caséine kappa apparaît comme une bande diffuse qui migre avant la caséine β (ALAIS, 1984, MOATSOU, 2004).

Par l'utilisation de SDS-PAGE, α s-CN (24 à 30 KDa), β -CN (24,1 KDa) et κ -CN (19 KDa) ont pu être visualisées (figure 35). La mobilité de la caséine kappa est la plus élevée. Une bande électrophorétique représentant la para-caséine kappa (PM < 16 KDa) a déjà apparu pour les deux enzymes lors des 30 premières minutes d'hydrolyse. C'est la principale caséine touchée par la pepsine de poulet et par la présure pendant la phase primaire de la coagulation du lait.

SDS-PAGE montre que la pepsine et la présure ont uniquement une action limitée sur la caséine kappa durant le temps d'incubation (de 0,5 heure à 24 heures). Ceci est confirmé par la similitude dans la libération des fractions de NPN par les deux enzymes et la stabilité marquée sur leurs profils graphiques (figure 33).

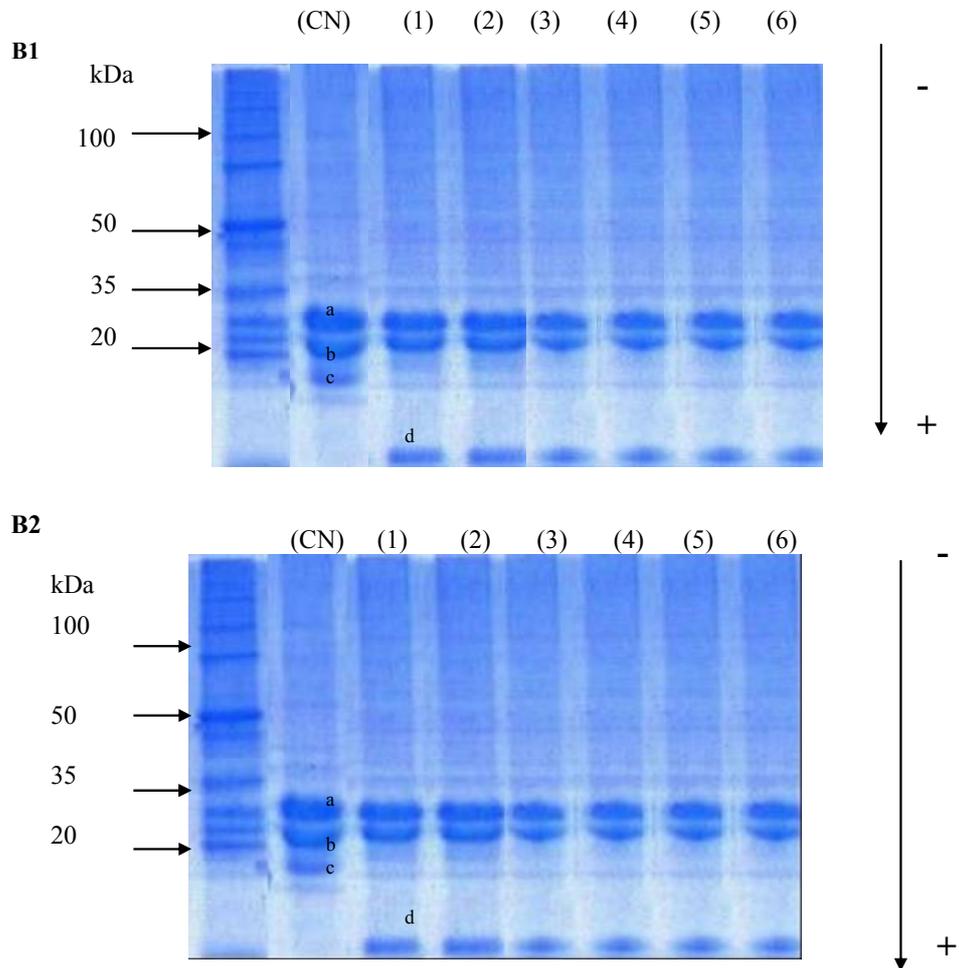


Figure 35 : SDS-PAGE de la protéolyse des caséines bovines par la pepsine (B1), ou par la présure (B2) à pH 6,6, 30°C. Bandes de 1-6 : caséines après incubation pour 0,5, 1, 3, 6, 9, 24 heures respectivement. (CN), caséines natives, (a) : α -CN, (b) : β -CN, (c) : κ -CN, (d) : Para- κ -CN

4-6-Identification des interactions impliquées dans les gels formés

L'utilisation d'agents dissociants nous permet de présager la nature des interactions entre les protéines des micelles de caséine dans le gel pepsine et dans le gel présure. En effet, le taux des protéines dissociées après action de dispersion et ultracentrifugation, renseigne sur l'effet de l'agent dissociant ajouté sur les protéines du gel et par conséquent, la présence d'interactions spécifiques. Les interactions hydrophobes sont interrompues par SDS ; les liaisons hydrogènes et indirectement les interactions hydrophobes sont interrompues par l'urée ; et les liaisons ioniques avec les sels de calcium sont cassées après complexation par l'EDTA. Les taux des protéines solubles obtenus après dissociation

représentent la résultante combinée et conjuguée de l'action de l'agent dissociant et celle de la force centrifuge utilisées.

Sodium dodecyl sulfate (SDS) agit sur les chaînes latérales des protéines non-polaires en provoquant une dislocation compétitive des interactions hydrophobes. La concentration en SDS montre une augmentation dans la dissociation des protéines avec des profils semblables pour le gel pepsine et le gel présure (figure 36). Pour la plus basse concentration (0,1g SDS 100 mL⁻¹), la dissociation des protéines des deux gels est relativement élevée (63,2 ± 1,0% pour le gel pepsine et 70,9 ± 1,2 % pour le gel présure). A partir de 0,7 g SDS 100 mL⁻¹ environ, la dissociation commence à atteindre son maximum puis tend à se stabiliser à la concentration supérieure en SDS (1g 100 mL⁻¹). A cette concentration, nous constatons que 94,9 ± 2,4 % et 96,9 ± 1,6 % des protéines du gel pepsine et du gel présure respectivement sont pratiquement dissociées sans une différence significative (p> 0,05) notée entre les deux gels (tableau 10).

Pour le gel présure, le taux de dissociation des protéines est similaire à celui rapporté par LEFEBVRE-CASES *et al.* (1998a, 1998b) évalué à 98,2 ± 1,2 % des protéines solubilisées pour la concentration maximale de 1 g SDS 100 mL⁻¹.

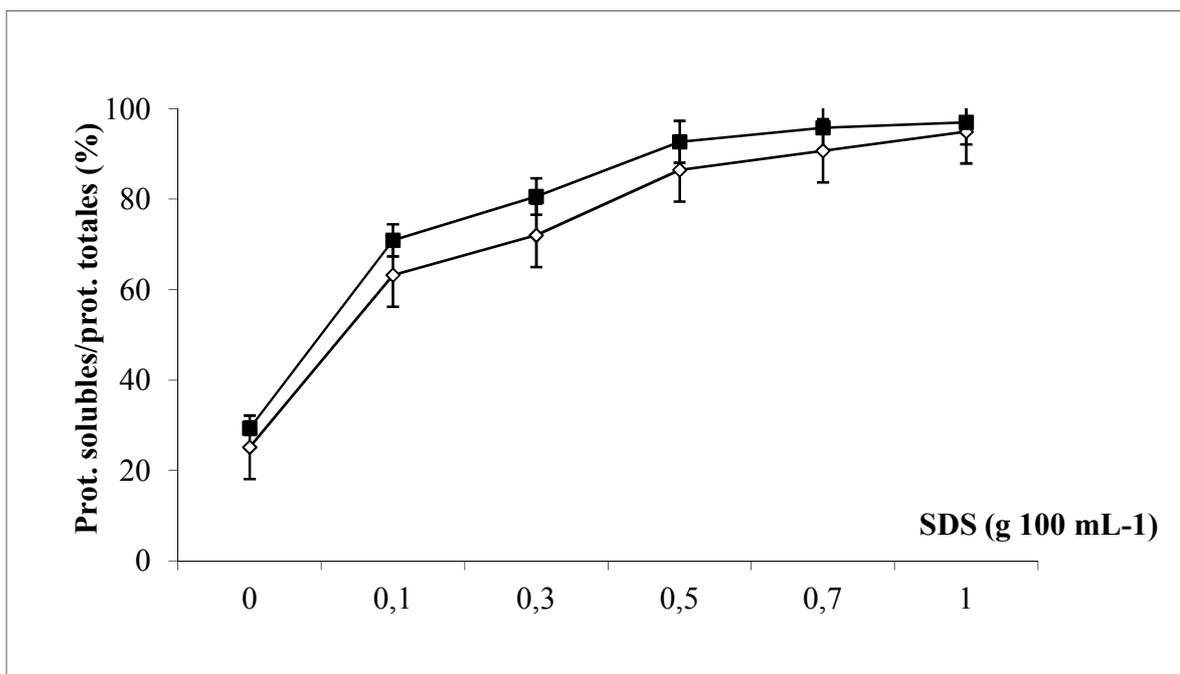


Figure 36 : Effet de la concentration du SDS sur la solubilisation des protéines du gel pepsine (◇) et du gel présure (■)

L'urée dénature les protéines par la rupture des liaisons hydrogènes intramoléculaires des polypeptides. La comparaison des effets des concentrations de l'urée sur la dissociation des protéines du gel pepsine et du gel présure est présentée par la figure 37. Les taux de solubilisation de protéines des deux enzymes montrent les mêmes profils mais encore avec des proportions moins élevés que celles engendrées par SDS. L'urée à une concentration de 2M dissocie environ $30,9 \pm 1,1$ et $38,9 \pm 1,0$ % des protéines du gel pepsine et du gel présure respectivement. Cette dissociation augmente pour les deux gels à la concentration supérieure (6M d'urée) pour atteindre son maximum évalué à $59,2 \pm 1,6$ et à $61,6 \pm 0,2$ % pour le gel pepsine et le gel présure (tableau 10). Cette dernière valeur s'accorde avec celle donnée par LEFEBVRE-CASES *et al.* (1998a) relative au gel présure et est estimée à $64,0 \pm 8,4\%$ pour une concentration d'urée de 6 M.

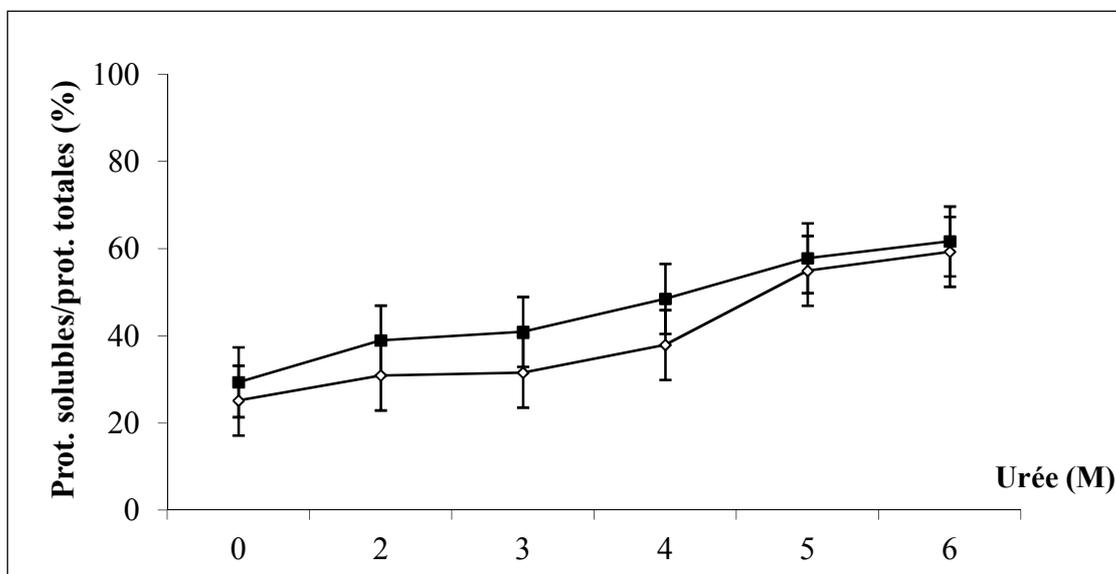


Figure 37 : Effet de la molarité de l'urée sur la solubilisation des protéines du gel pepsine (◇) et du gel présure (■)

Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) est un agent chélateur du calcium et des ions divalents. Son effet sur la dissociation des protéines du gel pepsine et du gel présure est montré dans la figure 38. Néanmoins, les taux de dissociation sont visiblement plus bas que ceux montrés par les deux autres agents précédents. Une concentration de 20 mM produit une dissociation d'environ de $30 \pm 1,3$ % des protéines des deux gels. Rappelons que cette valeur est approximativement égale à celle des solutions témoins sans agent dissociant (28% environ) marquant la concentration zéro en abscisse des trois graphes suscités. Cent (100) mM d'EDTA produit une dissociation d'environ de $41,35 \pm 1,5$ % et

de $44,13 \pm 1,76$ % des protéines du gel pepsine et du gel présure respectivement. Ces deux taux ne montrent pas une différence significative ($p > 0,05$) (tableau 11). Toutefois, LEFEBVRE-CASES *et al.* (1998a), ont obtenu des taux de dissociations élevés des protéines du gel présure ($75,9 \pm 2,5$ %) et ce uniquement par l'utilisation d'une concentration d'EDTA de 2mM. Cette différence pourrait suggérer l'augmentation en concentration en EDTA, ou encore l'utilisation d'un autre agent chélateur des cations divalents. De plus, CAYOT et LORIENT (1998), rajoute que l'addition de l'EDTA, engendre la désagrégation des caséines de micelles, cependant le rapport Ca^{+2}/Pi micellaire reste en permanence constant. Ceci signifie que la perte de calcium de la micelle s'accompagne d'une perte de phosphate. D'autre part, UDABAGE *et al.*, (2001), montrent que l'addition du citrate, orthophosphate ou EDTA (à raison de 90 g par Kg de solution), au lait reconstitué à pH 6,6 déplace plus de 33% du calcium phosphate colloïdal originaire de la micelle avec une libération approximative de 20% de la caséine à partir de la micelle. Ceci inhibe complètement la coagulation. Toutefois, l'addition de $CaCl_2$, aide à régénérer et à compenser le taux faible du calcium phosphate de la phase colloïdale causé par l'ajout des agents chélateurs suscités et par conséquent déplace l'inhibition et favorise la coagulation.

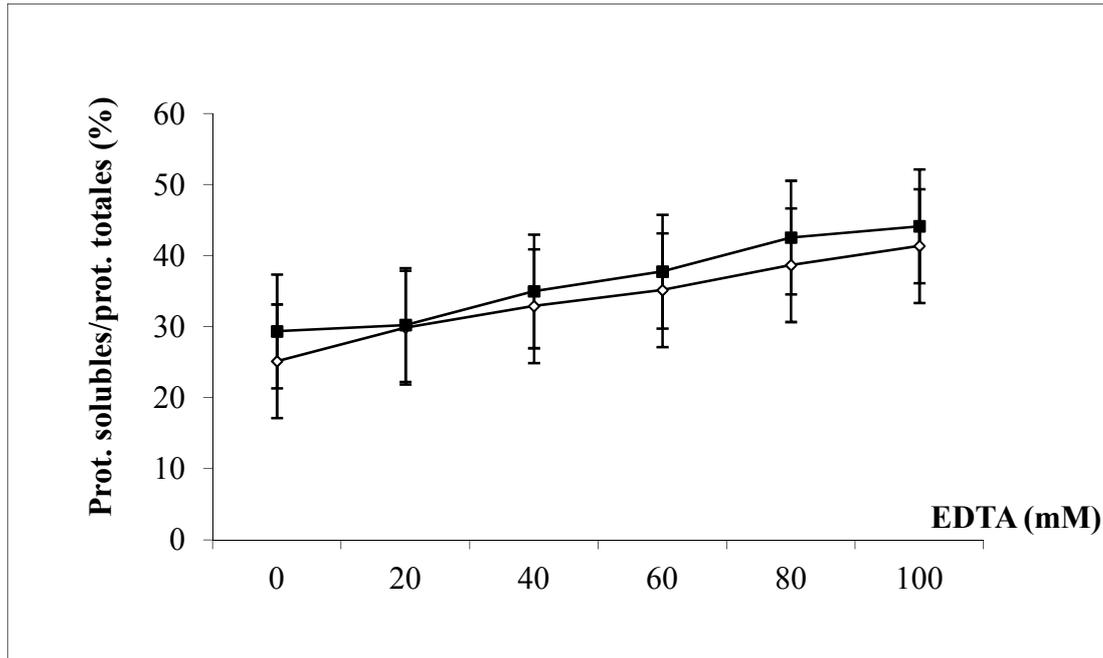


Figure 38: Effet de la molarité de l'EDTA sur la solubilisation des protéines du gel pepsine (◇) et du gel présure (■).

L'effet de SDS seul à 1 g 100 mL⁻¹ sur la dissociation des protéines du gel pepsine et du gel présure (94,9 ± 2,4 et 96,9 ± 1,6 %) respectivement n'était pas significativement différent par comparaison aux effets combinés SDS + 6 M urée (93,9 ± 3,9 et 95,6 ± 2,9 %) ou SDS + 100 mM EDTA (94,4 ± 2,7 et 96,2 ± 2,7 %) (tableau 11). Ainsi, le niveau de dissociation est resté pratiquement inchangé quand l'urée ou EDTA ont été combinés avec SDS. Cela suggère qu'il n'y ait ni synergie, ni antagonisme dans ces types de combinaison.

Tableau 11 : Effets individuels et combinés des agents chimiques dissociants sur la solubilisation des protéines du gel pepsine et du gel présure

(Protéines solubles/protéines totales) x100		
	Gel pepsine	Gel présure
Agent dissociant	$\bar{X} \pm ET$	$\bar{X} \pm ET$
H ₂ O	25,1±2,5 ^a	29,3±2,0 ^a
SDS (g 100mL ⁻¹)	94,9±2,4 ^b	96,9±1,6 ^b
Urée 6M	59,2±1,6 ^c	61,6±0,2 ^c
EDTA 100 mM	41,4±1,5 ^d	44,1±1,7 ^d
SDS (g 100mL ⁻¹) + urée 6M	93,9±3,9 ^b	95,6±2,9 ^b
SDS (g 100mL ⁻¹) + EDTA 100 mM	94,4±2,7 ^b	96,2±2,7 ^b
Urée 6M + EDTA 100 mM	53,9±0,5 ^c	58,6±0,5 ^c

Les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (p>0,05).

Les résultats présentés dans le tableau 11 nous ont permis de classer l'action de chaque agent dissociant. L'effet remarquable du SDS sur la dissociation des protéines du gel pepsine ou du gel présure a montré la contribution importante d'interactions hydrophobes dans la formation et la stabilité de la structure du gel. Ces interactions résultent de l'établissement de liaisons entre les protéines non polaires qui sont particulièrement abondants dans la caséine où ils représentent de 45 % (α_1 et κ) à 53 % (β) des groupes latéraux (ALAIS 1984 ; LEFEBVRE-CASES *et al.*, 1998a ; LUCEY, 2001 ; VIDAL *et al.*, 2002 ; KEIM et HINRICHS, 2003). En outre, la caséine κ qui joue un rôle important dans la stabilité des autres caséines contre l'effet du calcium, génère la

para-caséine κ hautement hydrophobe lors de son hydrolyse par la présure (DALGLEISH, 1998 ; VIERLING, 1999 ; MAHAUT *et al.*, 2003). L'action de l'urée sur la dissociation des protéines des deux gels a suggéré la présence d'un taux faible de liaisons hydrogène. Ces liaisons qui sont responsables de la stabilité structurale et de la fermeté (LEFEBVRE-CASES *et al.*, 1998a, LUCEY *et al.*, 2003 ; MISHRA *et al.*, 2005), semblent avoir la même contribution dans la formation du réseau du gel pepsine et du gel présure. L'EDTA forme des complexes avec les sels calciques ou avec d'autres composants ioniques divalents. En effet, dans le gel présure et à pH 6,7, la micelle de caséine est affectée par les interactions entre le calcium, les groupes carboxyliques et phosphosérines. A pH 4,6, la majorité du calcium est solubilisé. Ces résultats nous conduisent à conclure que les liaisons calciques sont importantes dans la stabilité de la structure du gel présure (LEFEBVRE- CASES *et al.*, 1998a) et probablement du gel pepsine. Cependant, ce type d'interaction semble être le moins abondant suite à la probable présence importante des ions calcium qui devraient être chélatés par une concentration encore plus élevée en EDTA.

D'une manière globale, l'ensemble des forces impliquées dans l'association des micelles et le maintien du gel sont les forces attractives comme les liaisons hydrogène (renforcées durant la réfrigération), les interactions hydrophobes (renforcées à haute température), les attractions électrostatiques, les ponts avec les ions calcium Ca^{++} ou autres sels divalents et les ponts disulfures (HORNE et DALGLEISH, 1980 ; ZOON *et al.*, 1988a ; ZOON *et al.*, 1988b ; LEFEBVRE-CASES, *et al.*, 1998a ; LEFEBVRE-CASES, *et al.*, 1998b ; LEFEBVRE-CASES, *et al.*, 2001). Nos résultats montrent que le taux de dissociation des protéines est fonction de la nature, de l'action et de la concentration de l'agent dissociant. Ainsi, la stabilité de la structure du gel pepsine semble être semblable à celle du gel présure ($p > 0,05$) et est soutenue par les trois types d'interactions dans l'ordre subséquent d'abondance : interactions hydrophobe > liaisons hydrogène > liaisons calciques.

4-7-Observation en microscopie électronique à balayage

Les structures des micelles de caséines natives et leur évolution après coagulation par la pepsine de poulet et par la présure sont visualisées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et sont montrées par la figure 39. Les échantillons sont obtenus à des temps différents (0,5 heure, 6 heures et 24 heures).

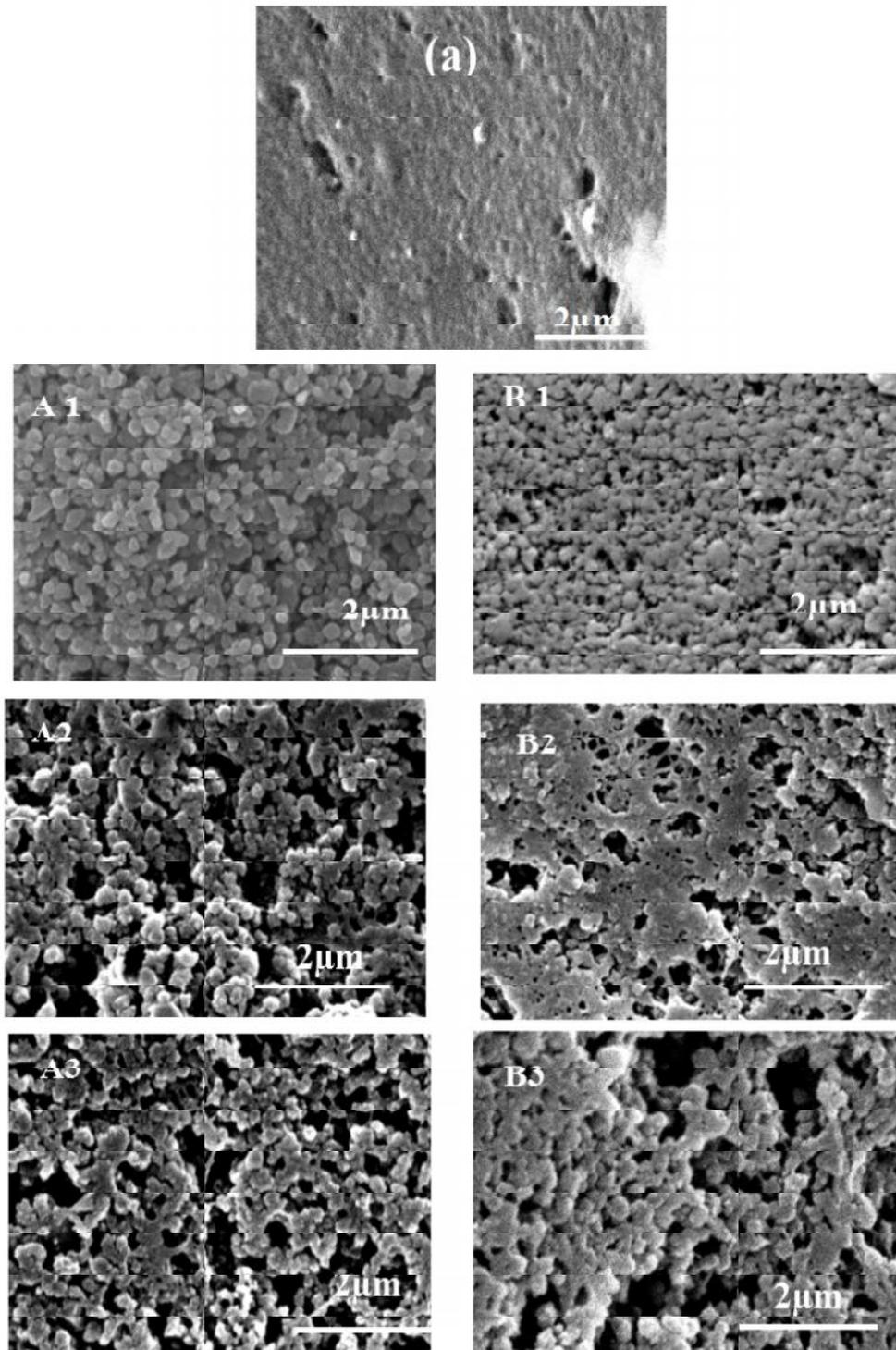


Figure 39 : Micrographies de la structure interne des micelles de caséines du gel pepsine et du gel présure par microscopie électronique à balayage : lait (a), 0,5 heure (A1 et B1), 6 heures (A2 et B2), 24 heures (A3 et B3).

Le micrographe (a), montre des micelles natives individualisées avant agrégation et ceux désignés par “A1, B1, A2, B2 et A3, B3” exposent l’évolution des micelles après fusion. Ces particules protéiques sphériques dont le diamètre est compris entre 50 et 60 nm (CAYOT et LORIENT, 1998).représentent les éléments de base de la microstructure du lait.

De plus, la perte de matériel soluble (protéines sérique, lactose et sels) pendant la déshydratation au point critique de CO₂ rend les micelles de caséine plus facilement observables (GASTALDI-BOUABID, 1994 et LAGOUEPTE, 1994). A 0,5 heure de coagulation (A1, B1), nous notons le début du rapprochement des micelles de caséine aboutissant à un arrangement compact à la limite de coalescence. Les particules de caséine sont reliées entre elles par des zones de jonction résultant de la phase de fusion micellaire. A 6 heures de coagulation, nous assistons à l’évolution du pseudo-réseau micellaire du gel pepsine (A2) et du gel présure (B2) d’une structure dense vers une structure contractée et d’un aspect aéré provenant de la fusion des micelles de caséine. Cette fusion, est caractérisée par un accroissement du nombre de liaisons intermicellaires et une augmentation progressive de la compacité des chaînes et des amas de micelles avec formation d’un réseau protéique présentant des zones plus compactes espacées par des pores. Cette observation s’accorde avec le profil de turbidité (figure 25), montrant que la fusion des micelles des deux gels commence à atteindre son maximum à partir de 6 heures de coagulation. A 24 heures de coagulation, (A3, B3) une similitude entre la structure des deux gels est constatée où le réseau protéique présente de nombreuses cavités de taille hétérogène et le réseau protéique est constitué de zones amorphes qui paraissent prisonnière du maillage protéique semblable pour les deux structures des deux gels. Le profil de la turbidité, (figure 25) montre que le plateau est atteint à partir de 6-9 heures jusqu’à 24 heures de coagulation. Cela suggère que toutes les micelles de caséines des deux gels à ce stade sont regroupées et fusionnées. Ainsi, la coagulation jusqu’à 24 heures, passe progressivement d’un état d’agrégation à un état de fusion micellaire. Le pseudo-réseau de particules fusionnées se resserre et se contracte pour donner naissance au réseau final très réticulé du gel pepsine et du gel présure. Ce réseau est d’un aspect plus compact composé de chaînes et d’amas de particules plus ou moins sphériques de tailles différentes constituant la trame du réseau tridimensionnel et ayant des nœuds linéaires et continus. A la fin de cette étape, une similitude entre la structure du gel pepsine et du gel présure est constatée où la compacité du réseau protéique, le nombre de connections intermicellaires

sont élevés et le réseau protéique présente de nombreuses cavités de taille hétérogène. Cet état de fusion caractérise donc la phase de transition sol-gel du système. C'est au niveau de cet état que se mettent probablement en place les différentes interactions inter-micellaires (forces attractives comme les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, les attractions électrostatiques, les ponts avec les ions calcium Ca^{++} ou autres sels divalents et les ponts disulfures) qui contribueraient à la constitution de la trame du gel. En effet, la ressemblance entre les structures des deux réseaux résulte probablement de la similitude entre les interactions de protéine et donc la structure spatiale semble être homogène.

Les micrographes donnés par GASTALDI, (1994), LAGOUETTE (1994), ATTIA *et al.*, (1991a, 1991b) et CHOI *et al.*(2007), pour les gels présure obtenus après coagulation à pH 6,4-6,6 présentent une similitude avec la microstructure du gel présure analogue étudié notamment celle de 24 heures de coagulation. Ces auteurs décrivent que les micelles qui étaient parfaitement individualisées au pH du lait commencent à se regrouper après coagulation par la présure, sous forme de particules sphériques. Celles-ci sont de tailles variables et elles gardent leur intégrité avec formation d'un réseau protéique qui présente de très nombreuses cavités de taille hétérogène.

5-APPRECIATION DE L'APTITUDE A LA CONSERVATION

La déshydratation des extraits de la pepsine a été réalisée par lyophilisation et par séchage sous vide partiel. Le séchage peut causer une perte d'activité enzymatique. Pour cela, cette activité est vérifiée avant et après chaque traitement. En outre l'aptitude à la conservation de la pepsine de poulet à l'état déshydraté avec ou sans ajout a été étudiée par le suivi de l'activité résiduelle durant le stockage.

5-1- Aptitude de la pepsine de poulet à la déshydratation par lyophilisation et séchage sous vide.

La déshydratation de l'extrait brut de pepsine de poulet (EBPP) par lyophilisation (-60°C, 0,1 m bar, 12 heures) et par séchage sous vide partiel (48°C, 200 mbar, 18h) nous a permis l'obtention d'extraits ayant des caractéristiques distinctes. Ces dernières se résument en l'extrait sec total et en l'activité coagulante résiduelle moyenne en p. 100 de l'activité coagulante de l'extrait frais de pepsine additionné ou non d'agent protecteur (le lactose) présentées dans le tableau 12.

Tableau 12: Caractéristiques des extraits obtenus après déshydratation par lyophilisation et séchage sous vide en extrait sec total (g/100g) et en activité coagulante résiduelle (%)

Type d' EBPP	Extrait sec (g/100 g)		Activité coagulante résiduelle (%)	
	Après lyophilisation	Après séchage sous vide	Après lyophilisation	Après séchage sous vide partiel
Activé lactosé	93,13±0,62	92,35±0,12	48,4 ± 0,5	45,8 ± 0,7
Activé non lactosé	92,66±0,38	91,23±0,14	42,0 ± 0,4	38,2 ± 0,9
*Non activé lactosé	94,40±0,29	93,06±0,51	48,5 ± 0,3	39,1 ± 0,5
*Non activé non lactosé	93,71±0,53	92,17±0,23	44,5 ± 0,7	35,2 ± 0,5

*("non activé" indique que l'extrait brut de pepsine de poulet est non activé avant lyophilisation ou avant séchage sous vide. Son activation a lieu, lors de sa reconstitution, pour l'estimation de l'activité résiduelle après les deux opérations de séchage et pendant le stockage).

Le taux de l'extrait sec est influencé dans notre cas par deux facteurs : ajout ou non du lactose et activation ou non de l'extrait brut. En effet, l'adjonction du lactose entraîne une augmentation du taux de l'extrait sec total (EST); tandis que l'activation et le réajustement (addition de HCl ou de NaOH) sont à la base d'une dilution supplémentaire. Cette dernière a pour conséquence d'abaisser le taux de l'EST. Cela expliquerait le fait que d'une part, les EBPP activés ont une teneur en extrait sec inférieure à celle des EBPP non activés et que d'autre part les EBPP lactosés sont plus concentrés en EST que les non lactosés.

Aussi, il faut souligner que le séchage peut altérer la structure secondaire des protéines et par conséquent l'hydratation des enzymes est partiellement perdue (CARPENTER et CROWE, 1989). De ce fait, l'utilisation de sucres comme agents protecteurs comme le lactose, peut former des liaisons hydrogènes avec les protéines d'où une protection au cours du processus de séchage et même préserver leur stabilité au cours d'un éventuel stockage (PRESTRELSKI *et al.*, 1993 ; GRIEBENOW et KLIBANOV, 1995 ; IZUTSU, *et al.*, 2004).

Les taux d'humidité sont passés après lyophilisation et séchage sous vide à des valeurs suffisamment basses respectivement comprises entre 4,7 et 5,6%. Ces valeurs

semblent être acceptables pour le stockage d'une enzyme vu la réduction significative de la teneur en eau. Cette réduction est estimée en moyenne à 5 % ainsi rapportée par WARD *et al.*, (1999).

Les pertes en activité coagulante par rapport à celle de l'état frais après lyophilisation s'échelonnent entre 51,5% notée pour l'extrait non activé lactosé (NAL) et 58 % pour l'extrait activé non lactosé (ANL). Pour le séchage sous vide partiel, les pertes sont comprises entre 54,2 % relevé pour l'extrait activé lactosé (AL) et 64,8 % pour l'extrait non activé non lactosé (NANL). La lyophilisation a entraîné des pertes en moyenne de 55 % or, pour le séchage sous vide partiel, elles sont de l'ordre de 60%. BOHAK (1970) indique un taux de perte d'activité enzymatique de pepsine de poulet après lyophilisation de 55%. Cette perte peut atteindre pour certaines enzymes jusqu'à 80% de leurs force estimée avant lyophilisation (CARPENTER *et al.*, 1987).

Rappelons que l'activité coagulante de l'état frais est de 60 UP/mL. Cet écart moyen de 5 % entre les deux modes de séchage représente une activité coagulante moyenne de l'ordre de 3UP mL⁻¹. Ceci laisse présager que les deux modes de séchage utilisés pour l'ensemble des différents extraits enzymatiques préparées (tableau 12) semblent aboutir à des taux de pertes avoisinants.

5-2-Estimation de l'activité résiduelle de la pepsine de poulet à l'état déshydraté au cours du stockage

Afin d'apprécier l'effet de la conservation par lyophilisation ou par séchage sous vide partiel, les extraits séchés ont été stockés pendant 135 jours. L'activité coagulante résiduelle a été déterminée pour chaque type d'extrait enzymatique préparé dans un intervalle de 15 jours. L'évolution des activités résiduelles au cours de la période de stockage des EBPP activés ou non activés, lactosés ou non lactosés est montrée par les figures 40 et 41.

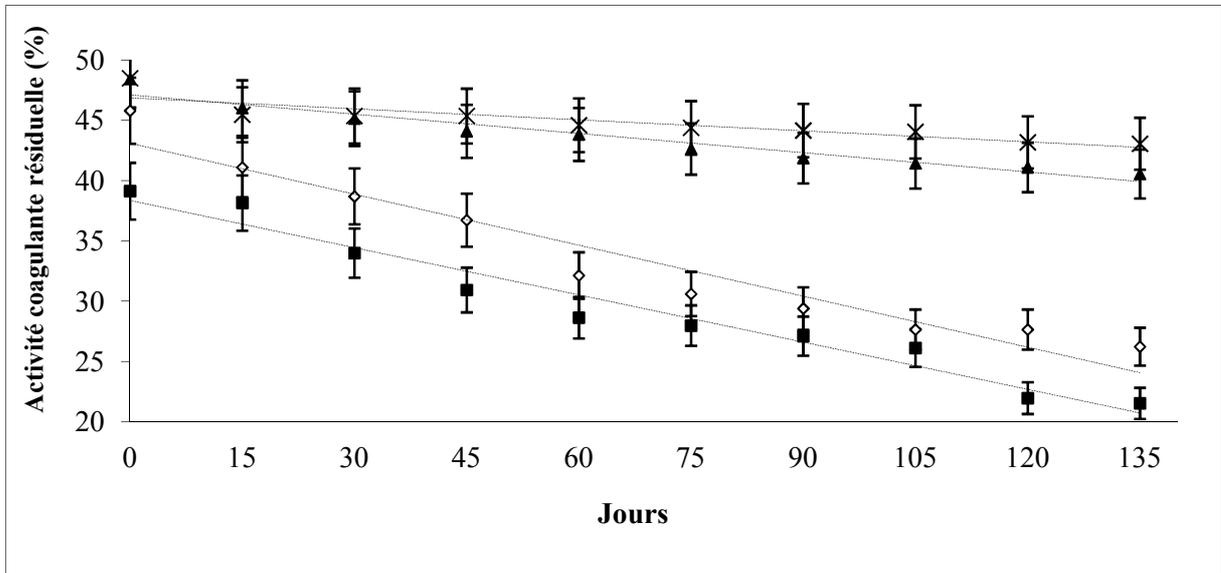


Figure 40 : Expression de la tendance de l'activité coagulante résiduelle de l'extrait brut de pepsine de poulet (EBPP) pendant le stockage (×) EBPP lyophilisé lactosé non activé ($y = -0,0346x + 47,253$; $R^2 = 0,82$); (▲) EBPP lyophilisé lactosé activé; ($y = -0,0565x + 47,402$; $R^2 = 0,94$); (◇) EBPP séché lactosé activé ($y = -0,1299x + 38,303$, $R^2 = 0,97$); (■) EBPP séché lactosé non activé ($y = -0,1353x + 39,566$; $R^2 = 0,94$)

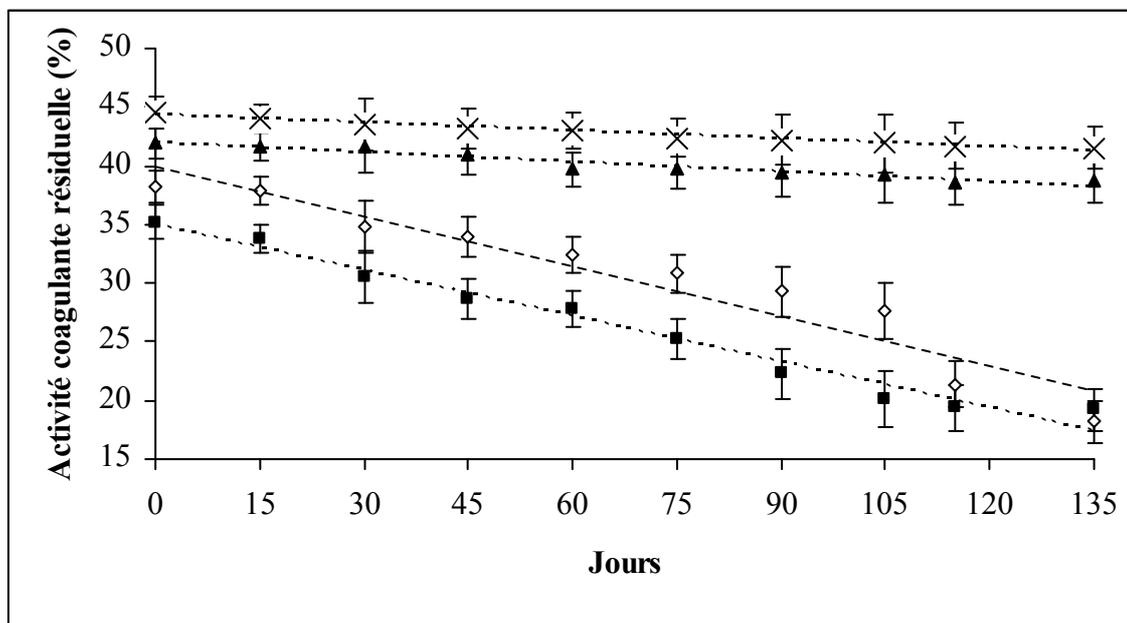


Figure 41 : Expression de la tendance de l'activité coagulante résiduelle de l'extrait brut de pepsine de poulet (EBPP) pendant le stockage. (×) EBPP lyophilisé non lactosé non activé ($y = -0,0227x + 44,321$, $R^2 = 0,98$), (▲) EBPP lyophilisé non lactosé activé; ($y = -0,0276x + 42,012$, $R^2 = 0,94$); (◇) EBPP séché non lactosé activé ($y = -0,1364x + 39,796$, $R^2 = 0,93$); (■) EBPP séché non lactosé non activé ($y = -0,1303x + 34,94$, $R^2 = 0,98$)

Par analyse des figures 40 et 41, et comparaison avec les activités résiduelles des différents extraits soumis à la lyophilisation ou au séchage sous vide partiel, nous constatons que l'activité coagulante résiduelle optimale pour une conservation notable pour la pepsine est constatée pour l'extrait brut non activé lactosé, c'est-à-dire celui qui est additionné de lactose et qui n'a été activé qu'après lyophilisation. Elle est de 48,5 % après lyophilisation et de 43 % au 135^{ème} jour de stockage avec une pente réduite de cinétique de l'activité résiduelle notée de -0,0346 (figure 40). Cependant, cette activité résiduelle est relativement bien notable pour l'extrait brut activé et lactosé après le séchage sous vide partiel (45,8%) et au 135ème jour de son stockage (26,2%) avec une pente négative de -0,1299. En outre, l'activité coagulante résiduelle est constatée relativement réduite pour les extraits enzymatiques non lactosés qu'elle soit après les deux modes de séchage ou pendant le stockage (figure 41).

Ainsi, l'ajout du lactose, semble préserver au mieux l'activité de l'enzyme. En effet, les enzymes en milieu aqueux sont instables. Pour cela, le séchage sous vide poussé (lyophilisation) ou sous vide partiel est souvent recommandé. Cependant, le processus en lui-même peut causer des dommages au niveau des différentes structures de la protéine (WARD *et al.*, 1999). L'utilisation des sucres, comme agents protecteurs des enzymes lors des processus de déshydratation en l'occurrence les diholosides (ex : lactose) est largement recommandée. Ils les protègent durant la déshydratation et même au cours du stockage (IZUTSU, 2004 ; VASILJEVIC et JELEN, 2003). Cette protection est déterminée par l'interaction directe avec les protéines et le remplacement de l'eau perdue lors du séchage par la formation de liaisons hydrogènes avec les groupements polaires. Le lactose va établir des liaisons hydrogènes en leur conférant une nouvelle hydratation. Ceci préserverait la structure native de la protéine contre la perte de l'eau. Cependant, il faudrait signaler que la concentration optimale des saccharides permettant la protection des protéines est comprise entre 100 mM et 200 mM correspondant à 3,76 % et 7,52 % (m/v) de lactose monohydraté. A des concentrations plus élevées, les sucres tendent à se cristalliser (CARPENTER *et al.*, 1986 ; CARPENTER *et al.*, 1987 ; CARPENTER et CROWE, 1988 ; CARPENTER et CROWE, 1989 ; IZUTSU *et al.*, 1991 ; CARPENTER *et al.*, 1993 ; VASILJEVIC et JELEN, 2003). Le choix d'utiliser le lactose a été basé sur le fait qu'il soit le sucre naturel du lait. Néanmoins il serait intéressant d'essayer d'autres cryoprotecteurs pouvant être plus spécifiques à la pepsine de poulet.

En outre, cette étude a montré que l'activité coagulante résiduelle est intéressante si le pepsinogène n'est pas activé avant lyophilisation, mais plutôt après. En effet, BOHAK (1972) et KAGEYAMA (1988), rapportent que le changement de conformation qui a lieu lors de l'activation du pepsinogène entraîne le démasquage d'un groupe sulfhydryl dans la molécule et la formation d'un peptide (pro-segment) constitué de 44 résidus d'acides aminés. Ce dernier joue un rôle protecteur vis-à-vis du site actif de l'enzyme. Dans des conditions neutres ou peu alcalines, le zymogène inactif est stabilisé contre toutes interactions électrostatiques entre les résidus d'acides aminés basiques présents dans le pro-segment et les résidus acides présents dans le fragment de l'enzyme.

En récapitulatif et dans les conditions de notre travail, l'effet de conservation par lyophilisation sur l'activité coagulante d'extraits de pepsine de poulet, semble être adéquat. La lyophilisation confère aux enzymes une stabilité remarquable. Elle occupe une place originale au regard des techniques de séchage. Elle permet d'obtenir des produits finaux de haute qualité. La forme et l'aspect des produits sont bien conservés. La transition du produit de l'état congelé à l'état déshydraté, en l'absence d'une forte proportion d'eau liquide, réduit les possibilités de développement des réactions d'altération. Un autre avantage technologique majeur de la lyophilisation repose sur la capacité du produit lyophilisé à se réhydrater instantanément, c'est-à-dire solubilité rapide et totale (SCHWEGMAN *et al.*, 2005).

CONCLUSION

La stabilité des micelles de caséines natives est contrôlée par la balance des attractions électrostatiques et les répulsions stériques entre les micelles de caséines. Cependant, beaucoup de changements biochimiques se développent dans le réseau protéique après action d'une enzyme coagulante sur le lait pour la formation d'un gel. Ces modifications se résument en la concentration différentielle de caséine, la réduction de sa voluminosité, la diminution de la teneur en eau et la solubilisation de certains sels minéraux. Le développement de ces phénomènes physicochimiques dépend en effet, du taux de lactosérum expulsé lors de la synérèse qui lui-même dépend étroitement de la nature de l'agent coagulant, des facteurs de coagulation principalement la température, le pH, et de la concentration en CaCl_2 ainsi que de la composition initiale du lait.

Des méthodes physiques telles que la turbidimétrie et la conductimétrie ont été appliquées pour suivre l'évolution du phénomène de la coagulation. La déstabilisation de

la caséine kappa par la pepsine et par la présure a été interprétée par l'augmentation des unités de turbidité et par la diminution de la conductivité électrique pour les deux gels.

La protéolyse des protéines totales et des caséines par la pepsine ou par la présure a permis d'apprécier les taux de NPN et de NCN libérés. Le taux de NPN a montré une ressemblance entre l'action de la pepsine et de la présure, néanmoins, le taux de NCN a marqué une dissemblance.

Aussi, l'étude séparative par électrophorèse sur urea-PAGE a révélé la présence d'hydrolysats issus des caséines α et β présentés sous forme de bandes de différente intensité montrant ainsi l'action protéolytique divergente et dissemblable des deux enzymes. La SDS-PAGE a principalement montré le profil de l'hydrolyse de la caséine κ soit par la pepsine ou par la présure sous les conditions opératoires utilisées.

L'étude rhéologique a permis de caractériser le gel pepsine et le gel présure et d'approcher leur quasi macrostructure. Ceci a été procédé par la détermination des seuils d'écoulement, par le suivi de la cinétique de coagulation (en mode permanent), par l'étude du comportement viscoélastique (en mode harmonique) ainsi que par la détermination des points de rupture.

L'étude de la nature des interactions inhérentes aux protéines du gel pepsine et du gel présure a montré que les interactions hydrophobes sont majoritaires, suivies par les liaisons hydrogène puis par les liaisons calciques. Ces liaisons sont responsables du maintien du réseau protéique et de la stabilité de la structure des deux gels.

L'observation microscopique a permis de présenter l'état des caséines depuis leur état natif jusqu'à la formation du gel. En effet, la microstructure du gel pepsine ou du gel présure a montré l'agrégation micellaire, suivie par une formation d'un pseudo réseau constitué de micelles fusionnées et ensuite une étape de transition sol-gel qui s'achève par la formation d'un gel. Après 24 heures de coagulation, une proximité de structure du gel pepsine et du gel présure caractérisée par la compacité et par l'apparition de nombreuses cavités de tailles hétérogènes et de zones amorphes a été visualisée.

Ainsi, les approches macroscopiques et microscopiques ont permis le suivi de transformation du lait depuis son état de micelles de caséines dispersées (avant l'addition de pepsine ou de présure) jusqu'à l'état d'un système agrégé (après protéolyse de la κ -

caséine) où des modifications physico-chimiques, rhéologiques et structurales ont été observées.

Pour mieux préserver son activité enzymatique et sa stabilité, deux modes de séchages sous vide poussé (lyophilisation) et sous vide partiel de l'extrait brut de la pepsine de poulet ont été étudiés et comparés. Alors que le séchage sous vide partiel engendre une activité résiduelle de 45,8 % qui baisse encore à 26,2 % au bout de 135 jours de stockage, la lyophilisation assure de meilleurs résultats avec 48,5 % en fin d'opération et plus de 41% durant la même période de conservation. L'ajout du lactose à l'extrait de pepsine assure une activité coagulante résiduelle plus intéressante. De plus, il s'avère que l'activité résiduelle est meilleure si le pepsinogène n'est pas activé avant lyophilisation, mais plutôt après.

CONCLUSION
GENERALE

Conclusion générale

Cette étude nous a permis de caractériser la pepsine de poulet et son gel correspondant sur les plans biochimique, chromatographique, rhéologique et microstructural. L'objectif était de vérifier son aptitude à coaguler le lait en vue d'assurer son utilisation comme substitut de présure.

Le protocole d'extraction appliqué a permis d'obtenir un rendement de 168,168 unités présure totales par gramme de proventricules frais. Un litre de l'extrait brut de pepsine de poulet obtenu pourrait coaguler environ 13142 litres de lait avec une activité aspartyl protéase ($\mu\text{g mL}^{-1} \text{h}^{-1}$) de $8,38 \pm 0,22$ et un rapport activité coagulante /activité aspartyl protéase de 7,23.

La purification partielle de l'extrait brut de pepsine de poulet par séparation de protéines en chromatographie liquide rapide (FPLC) sur colonne mono Q sépharose (20 à 50 mg de protéines) a donné 45 fractions dans nos conditions de travail. La fraction 18 a présenté des activités coagulante ($12,33 \pm 0,05 \text{ UP mL}^{-1}$) et protéolytique ($0,36 \pm 0,03 \text{ Unités mL}^{-1}$) considérables et notables comparativement à celles des autres fractions obtenues. L'activité coagulante par rapport à l'activité protéolytique (AC/AP) de l'extrait brut de pepsine est passée de 7,15 à 34,25 après purification partielle. Cette augmentation en rapport (AC/AP) est largement recherchée en fromagerie.

Les variations des facteurs, température, pH et concentration en CaCl_2 sur la coagulation pepsine et présure ont été étudiées. Les optima de température, de pH et de concentration en CaCl_2 étaient entre 50°C et 55°C , 5,0 et 5,6 et 0,04 M respectivement.

La coagulation a été estimée en outre, par turbidimétrie et conductimétrie où les variations du paramètre de turbidité a exprimé une similitude ($p > 0,05$) pour les deux gels, contrairement au paramètre de la conductivité qui a exprimé une différence ($p < 0,05$) entre les deux gels

L'étude rhéologique a permis de décrire et de caractériser le gel pepsine et le gel présure. La viscosité apparente des deux gels évolue dans le même sens. Les courbes d'écoulement ont montré un comportement de liquides non Newtonien à caractère plastique (liquide de Bingham) pour les deux gels. Ces corps ne s'écoulent qu'à partir d'une valeur de la contrainte notée τ_c . Cette contrainte correspond au seuil d'écoulement et représente l'ordonnée à l'origine de la courbe. D'autre part, la viscoélasticité a été approchée par le mode non destructif. Le gel présure semble présenter un comportement viscoélastique ($\delta = 0,55$) relativement notable que celui du gel pepsine ($\delta = 0,60$). Les forces de rupture du gel présure et du gel pepsine ont été estimées à 0,34 N et 0,38 N respectivement. Aussi, la synérèse des deux gels a montré une expulsion rapide du

Conclusion générale

lactosérum au début de la coagulation qui tend à former un plateau pour la présure mais pour la pepsine de poulet elle tend à augmenter.

Ainsi, la diminution de la viscosité des gels traduit par leurs seuils d'écoulement, leurs comportements viscoélastiques, leurs ruptures en des points de forces distinctes ainsi que la différence de vitesse dans l'expulsion du lactosérum renseignent sur la nature de liaisons et d'interactions impliquées dans la formation du réseau protéique. Celles-ci sont responsables des comportements des deux gels vis-à-vis des différentes contraintes extérieures qui leurs sont appliquées.

La protéolyse étudiée a été évaluée par l'estimation des fractions azotées libérées du gel pepsine ou du gel présure dans un intervalle de temps déterminé. Ces fractions exprimées en Non Protein Nitrogen (NPN) n'ont pas montré une différence significative ($p > 0,05$). Néanmoins, les fractions du Non Casein Nitrogen (NCN) ont présenté des valeurs divergentes ($p < 0,05$) pour les deux gels. La libération des fractions NPN et de NCN pourrait être commentée par l'activité protéolytique de chacune des enzymes qui est liée étroitement à leurs structures tridimensionnelles.

L'activité protéolytique de la pepsine et de la présure a été aussi estimée par séparation électrophorétique en urea-PAGE et en SDS-PAGE. En urea-PAGE, les produits de dégradation α_1 I et β I-CN issus de la dégradation de la caséine α_1 -CN et β -CN respectivement par la pepsine de poulet ont été observés en premiers à partir de 0,5 h. jusqu'à 24 heures d'incubation. Ceux de la présure, ils ont commencé à apparaître tardivement à partir de 6 heures d'incubation. La caséine γ a été principalement observée à 0,5h d'incubation pour les deux enzymes. En SDS-PAGE, la seule bande visible sur l'électrophorégramme obtenue selon nos conditions de travail, correspondait à la para caséine kappa, produit de dégradation de la caséine kappa par la pepsine ou par la présure.

L'utilisation des agents dissociants au niveau du gel pepsine ou du gel présure a permis de mettre en évidence les interactions hydrophobes interrompues par le sodium dodécyl sulfate (SDS), les liaisons hydrogène interrompues par l'urée et les liaisons ioniques avec les sels de calcium cassées après complexation par l'acide éthyle diamine tétra acétique (EDTA). Le taux de dissociation des protéines du gel pepsine et du gel présure a montré une abondance dans les interactions hydrophobes, suivi par les liaisons hydrogène puis par les liaisons calciques.

L'étude microscopique des gels a montré l'évolution de la fusion des micelles du gel pepsine et du gel présure au cours du temps. Après 24 heures de coagulation, une proximité de structure du gel pepsine et du gel présure est visualisée par la ressemblance du réseau protéique qui se resserre davantage avec apparition de nombreuses cavités de

Conclusion générale

tailles hétérogènes et de zones amorphes qui paraissent prisonnière du maillage protéique. Ainsi, les approches macroscopiques et microscopiques ont permis le suivi de transformation du lait depuis l'état de micelles de caséines dispersées (avant l'addition de pepsine ou de présure) jusqu'à l'état d'un système agrégé. Ceci a mené à la caractérisation du gel pepsine et du gel présure sur les plans physico-chimique, rhéologique et structural.

En vue d'assurer la stabilité de l'extrait brut de la pepsine de poulet au cours d'un stockage, deux modes de séchage ont été étudiés et comparés, la lyophilisation et le séchage sous vide partiel. L'ajout ou non du lactose ainsi que l'activation du pepsinogène avant ou après séchage ont été aussi étudiés. L'effet de conservation par lyophilisation sur l'activité coagulante d'extraits de pepsine de poulet, semble être approprié et adapté.

Les résultats obtenus montrent la possibilité d'utilisation de pepsine de poulet dans la coagulation du lait. Cependant, elle nécessite la connaissance et la bonne maîtrise principalement de la concentration en enzyme, du pH et de la température liés à son action coagulante et protéolytique sur les caséines. Aussi, la compréhension des différentes interactions impliquées dans la formation du gel conduit à mieux analyser et particulariser ses propriétés rhéologiques qui influent considérablement sur sa fermeté. Cet ensemble de connaissance permettrait de savoir à quel niveau faut-il intervenir pour pouvoir diminuer de son activité protéolytique signifiante et considérable. Néanmoins, cette activité pourrait être contrôlée et modérée par l'utilisation de la pepstatine « A » un inhibiteur compétitif pour la plupart des protéases aspartique auxquelles il se lie au site actif de façon non covalente.

Cette étude a tracé les principaux axes relatifs à la caractérisation du gel pepsine en comparaison avec l'enzyme de référence. Des recherches ultérieures plus diversifiées méritent d'être entreprises et poursuivies pour mieux développer la connaissance des différents aspects de la pepsine de poulet. Elles visent principalement :

- l'optimisation des conditions d'extraction pour améliorer le rendement ;
- l'évaluation et la comparaison des activités enzymatiques de la pepsine provenant de proventricules de poulets ayant différents stades d'âges, alimentation dissemblable et d'espèces hétérogènes. Cette détermination permettrait de dévoiler des données vectorielles et indicatrices pour caractériser l'activité coagulante de la pepsine dans chaque situation et pour chaque condition ;
- l'application de méthodes encore plus performante pour la purification de la pepsine de poulet comme la chromatographie d'affinité par fixation sélective de l'enzyme sur un ligand hautement spécifique et ce pour des résultats encore plus concluante ;

Conclusion générale

- l'essai d'application de la tricine-SDS-PAGE comme méthode de séparation électrophorétique pour pouvoir visualiser les peptides de faibles poids moléculaires (<20 KDa) libérés après hydrolyse enzymatique ;
- l'optimisation de la production de la pepsine de poulet et sa valorisation sur le plan industriel ;
- l'essai de séchage du proventricule entier présenté sous différentes préparations en vue de sa conservation, avec étude d'autres agents de protection autres que le lactose.

Enfin, l'utilisation de la pepsine, n'est pas uniquement limitée dans l'industrie laitière. Elle peut être employée dans d'autres secteurs industriels. Ceci par un essai de son application dans la préparation des hydrolysats caséiniques et sa recommandation comme agent de la tendreté pour la viande par remplacement de la papaïne, l'enzyme communément utilisée. Aussi, elle peut être employée dans la modification de la protéine de soja sous traitement thermique pour détruire les facteurs antinutritionnels, dans la préparation d'hydrolysats et de poudres d'hydrolysats de poissons et de légumes, ainsi que dans la fabrication de certaines boissons. Cette enzyme pourrait être utilisée pour la production de peptides d'intérêts biologique ou technologique. En outre, elle peut contribuer à la diminution de l'allergénicité causée par les protéines du lait par hydrolyse de la β -lactoglobuline principalement.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

ALAIS C., (1984). Sciences du lait, principes des techniques laitières, 4^{ème} édition, SEPAIC, 818 p.

ALAM SI., DUBE S., REDDY GSN, BHATTACHARYA BK., SHIVAJI S et SINGH L., (2005). Purification and characterization of extracellular protease produced by *clostridium sp.* From Schirmacher oasis, Antartica. Enzyme Microb Technol. : 824-831.

ALAMARGOT J. (1982). Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaires. Edition du point vétérinaire, Maisons-Alfort, 289 p.

AL-JANABI J., HARTSUCK J.A. and TANG J. (1972). Kinetics and mechanism of pepsinogen activation. *J. Biol.Chem.*, 247 : 4628-4632.

ANDREEVA N. S. and. RUMSH L. D (2006). Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: On the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Science* 10: 2439-2450.

ANIFANTAKIS E. M. and KANDARAKIS J. G. (1983). Use of bovine pepsin in the manufacture of Feta cheese from sheeps' milk. *Lait* 63, 632 : 416-417.

ANONYME, (1993). **Recueil de normes françaises AFNOR-DGCCRF.** Contrôle de la qualité des produits alimentaires, lait et produits laitiers, analyses physico-chimiques, 4^{ème} édition, 561 p.

ATTIA H., BENNASAR M. and TARODO DE LA FUENTE B. (1991a). Study of the fouling of inorganic membranes by acidified milks using scanning electron microscopy and electrophoresis. I. Membrane with pore diameter 0.2 µm. *J. Dairy Res.*, 58 : 39-50.

ATTIA H., BENNASAR M. and TARODO DE LA FUENTE B. (1991b). Study of the fouling of inorganic membranes by acidified milks using scanning electron microscopy and electrophoresis. II. Membrane with pore diameter 0.8 µm. *J. Dairy Res.*, 58 : 51-65.

AUSAR S. F., BIANCO I., D., BADINI R. G., CASTAGNA L. F. and MODESTI N. M. (2001). Characterization of casein micelle precipitation by chitosans. *J. Dairy Sci.* 84 : 361-369.

Références bibliographiques

AWORH O. C. and NAKAI S. (1986). Extraction of milk enzyme from Sodom apple (*Calotropis procera*). Journal of Food Science, 51 (6), pp : 1569–1570.

AWORH O. C. and MULLER H.G. (1987). Cheese making properties of vegetable rennet from Sodom apple *Calotropis procera*. Food chemistry, 26(1), pp : 71-79.

AYACHE J., BEAUNIER L., BOUMENDIL J., EHRET G., ET LAUB D., (2007). Guide de préparation des échantillons pour la microscopie électronique en transmission Tome 1 Méthodologie. Edition TEM. Publications de l'Université de Saint-Etienne, 270 p.

AZUMA N., FURUUCHI S., TAKAHARA H., SUGAWARA K. and KANNO C. (1998). Electron microscopic deimination on casein micelle casein formation. J.Dairy Sci. 81: 64-68.

BANON S. and HARDY J.(1992). A colloidal approach of milk acidification by glucono-delta-lactone. J. Dairy Sci. 75 : 935-941.

BARBANO D. M. and RASMUSSEN R. R. (1992). Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. Journal of Dairy Science 75 : 1-12.

BARROS RM., FERREIRA CA., SILVA SV. and MALCATA FX., (2001). Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought by cardosins precipitated by ammonium sulfate. Enzyme Microb Technol. 29 : 541-547.

BAUDYS M. and KOSTKA V. (1983). Covalent structure of chicken pepsinogen. Eur. J. Biochem. 136 : 89-99.

BAYLISS R. S., KNOWLES J. R. and WYBRANDT G. B. (1969). An aspartic acid residue at the active site of pepsin. Biochem. J. 113: 377-386.

BERTOLA N.C., BEVILACQUA A.E. and ZARITZKY N.E. (1992). Proteolytic and rheological evaluation of maturation of Tybo Argentino cheese. J. Dairy Sci 75 : 3273-3281.

BOHAK Z., (1969). Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. Journal Biological Chemistry, Vol. 244, N :17, : 4638-4648.

BOHAK Z., (1970). Chicken pepsinogen and chicken pepsin, In : Methods in enzymology vol XIX protéolytic enzymes pp. 347-358, (Eds G.E. Perlmann and L.Lorand) ; Academic press, New York, 1042 p.

BOHAK Z., (1972). The kinetics of the conversion of chicken pepsinogen to chicken pepsin. Eur. J. Biochem. 32 : 547-554.

BOHLIN L., HEGG P.O. and WAHREN H.L. (1984). Viscoelastic properties of coagulating milk. J. Dairy Sci 67 : 729-734.

BROWN J.A., FOEGEDING E.A. and DAUBERT C.R. (2003). Relationships among rheological and sensorial properties of young cheeses. J. Dairy Sci.86 : 3054-3067.

BRULE G., LENOIR J. ET REMEUF F. (1997). La micelle de caséine et la coagulation du lait, In : Le fromage. Ed. A. Eck, et Gillis J.C. (coordonateurs), pp 7-41, 3^{ème} édition, Lavoisier Tec & et Doc. Paris 891 p.

CALABRESI M., ANDREOZZI P. and LA MESA C. (2007). Supra-molecular association and polymorphic behaviour in systems containing acid salts. Molecules, 12 : 1731-1754.

CALVO M.M. and BALCONES E. (2000). Some factors influencing the syneresis of bovine, ovine and caprine milks. J. Dairy Sci 83 : 1733-1739.

CALVO M.M. (2002). Influence of fat, heat treatments and species on milk rennet clotting properties and glycomacropptide formation. Eur Food Res Technol, 214 : 182–185.

CĂPRIȚĂ R., CĂPRIȚĂ A. and BENCSIK I. (2003). The electric conductivity as a parameter for milk quality appreciation, Acta Veterinaria Scandinavica, Suppl., 98 : 264-268.

CĂPRIȚĂ R. and CĂPRIȚĂ A. (2008). Monitoring the milk acidification by the conductometric method. Lucrări Științifice - vol. 52, Seria Zootehnie : 635-638.

Références bibliographiques

CARPENTER J.F., HAND S.C., CROWE L.M. and CROWE J.H. (1986). Cryoprotection of phosphofructokinase with organic solutes: Characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Arch.Biochem.Biophys.* (250) : 505-512.

CARPENTER J.F., CROWE L.M. and CROWE J.H. (1987). Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying : characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochimica & Biophysica Acta.* (923) : 109-125.

CARPENTER J.F and CROWE J.H (1988). The mechanism of protection of proteins by solutes. *Cryobiology*, 25, 244–255.

CARPENTER J.F. and CROWE J.H. (1989). An infrared spectroscopy study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Journal of Biochemistry.* vol 28 : 3916-3922.

CARPENTER J.F., PRESTRELSKI S.J. and ARAKAWA T. (1993). Separation of freezing and drying induced denaturation of lyophilised protein using stress specific stabilization. *Archives of biochemistry and biophysics*, Vol. 303, (2) : 456-464.

CASTILLO M., PAYNE F.A., HICKS C.L. and 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.

CAVALCANTI MTH., TEIXEIRA MFS., LIMA FILHO J.L. and PORTO ALF. (2004). Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardioopsis* sp. *Bioresour Technol.* 93: 29-35.

CAVALLI S. V., CLAVER S., PRIOLO N. and NATALUCCI C. (2005). Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research* 72 : 271-275.

CAYOT P. et LORIENT D. (1998). Structures et technofonctions des protéines du lait. *Arilait Recherches*, Lavoisier Tec. et Doc. 363 p.

CAYOT P., FAIRISE J.F., COLAS B., LORIENT D. and BRULE G. (2003). Improvement of rheological properties of firm acid gels by skim milk heating is conserved after stirring. *J. Dairy Research*, 70 : 423-431.

CHEFTEL J. C., CHEFTEL H. et BESANÇON P. (1992). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, Volume 2, Lavoisier, Tec. et Doc., 7^{ème} tirage, 420 p.

CHOI J., HORNE D.S. and LUCEY J.A. (2007). Effect of insoluble calcium concentration on rennet coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.* 90 : 2612-2623.

CHOISY C., DESMAZEAUD M., GRIPON J. C., LAMBERET G. et LENOIR J. (1997). La biochimie de l'affinage in « Le fromage, Eck, A., et Gillis J.C.(coordonnateurs), pp : 87-161, 3^{ème} édition, Lavoisier Tec. & Doc. 891 p.

CLAVERIE-MARTÍN F. and VEGA-HERNÁNDEZ M.C. (2007). Aspartic Proteases Used in Cheese Making pp : 207-221, In : *Industrial Enzymes* edited by Polaina J. and MacCabe A. P. p : 656

COGAN U., KOPELMAN I. J, and SCHAB R. (1982). Combined Temperature-Concentration Effects on the Clotting Rate of Chicken Pepsin. *J Dairy Sci.* 65:1130-1134.

COUARRAZE G. et GROSSIORD J.L. (1991). Initiation à la rhéologie, 2^{ème} édition, Lavoisier Tec. & Doc., : 272 p.

CUVELIER G. F. (1993). Production des enzymes In : *Biotechnologie*, Ed., Scriban R.(coordonnateur), 4^{ème} édition, Lavoisier Tec et Doc, , 904 p.

DALGLEISH D.G. (1980). A mechanism for the chymosin induced flocculation of casein micelles, *Biophys. Chem*, 11 : 147-155.

DALGLEISH D.G. (1983). Coagulation of renneted bovine casein micelles : dependence on temperature, calcium ion and ionic strength. *J. Dairy Res.*, 50 : 331-340.

DALGLEISH D.G. (1997). The enzymatic coagulation of milk, In : *Advanced in Dairy Chemistry -1, proteins*, pp. 579-619, Ed., Fox P.F., Blackie and Son Ltd, 1088 p.

DALGLEISH D. G. (1998). Casein micelles as colloids : Surface, structures and stabilities. *J. Dairy Sci.*, 81 : 3013-3018.

DALGLEISH D.G. (2007). The casein micelle and its reactivity. *Lait* (87): 385-387.

DALGLEISH D.G. and HOLT C. (1988). A geometrical model to describe the initial aggregation of partly renneted casein micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 123: 80-84.

DALGLEISH D.G., SPAGNUOLO P.A., and GOFF H.D. (2004). A possible structure of the caseine micelle based on high resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal* : 14, 1025–1031.

DANLEY D.E. and GEOGHEGAN F. (1988). Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C*. *The journal of Biological Chemistry*, Vol 263 : 9785-9789.

DAVE R.I., McMAHON D. J., OBERG C. J. and BROADBENT J. R. (2003). Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of Mozzarella cheeses made using direct acidification. *J. Dairy Sci.*86: 114-116.

DAVIAU C., PIERRE A., FAMELART M. H., GOUEDRANCHE H., JACOB D., GARNIER M., MAUBOIS J.L. (2000a). Residual amount of water in a draining curd of Camembert cheese and physicochemical characteristics of the drained curd as modified by the pH at renneting, the casein concentration and the ionic strength of milk. *Lait* 80 : 555–571.

DAVIAU C., PIERRE A., FAMELART M. H., GOUEDRANCHE H., JACOB D., GARNIER M. and MAUBOIS J.L. (2000b). Whey drainage during soft cheese manufacture and properties of drained curd as modified by casein concentration, whey protein to casein ratio, and pasteurisation of milk. *Lait* 80 : 573–587.

DAVIAU C., FAMELART M. H., PIERRE A., GOUEDRANCHE H. and MAUBOIS J.L. (2000c). Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: Effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Lait* 80 : 397–415.

DAVIAU C., PIERRE A., FAMELART M. H., GOUEDRANCHE H., JACOB D., GARNIER M. and MAUBOIS J.L. (2000d). Characterisation of whey drainage kinetics during soft cheese manufacture in relation with the physicochemical and technological factors, pH at renneting, casein concentration and ionic strength of milk. *Lait* 80 : 417–432.

De KRUIF C. G. (1998). Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Sci.*, 81 : 3019-3028.

De KRUIF C.G. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal* 9 : 183-188.

DICKINSON E. and ELIOT C. (2003). Aggregate casein gels : interactions, rheology and microstructure. 3rd International Symposium on food rheology and structure.

DOLGIKH T.V., LOBZOV K.L., VOLIK V.G., KOZLOVA L.V. and KHABAROVA E.D. (1976). Production of chicken pepsin by an extraction method. *Vsesoyuznyi Nauchno Issledovatel'skii*, 20 : 109-115.

DONTA S.T. and VAN VUNAKIS H. (1970a). Chicken pepsinogens In : *Methods in enzymology proteolytic enzymes* Ed. G.E. Perlmann G.E. and Lorand L., Academic press, Inc., New york, vol XIX p. 358-363, 1042 p.

DONTA, S.T. and VAN VUNAKIS, H. (1970b) (2). Chicken pepsinogens and pepsins. Their isolation and properties. *Biochemistry* 9 : 2791-2797.

EL-ABBASY F.M. and WAHBA A.A. (1988). Milk clotting and proteolytic activities of chicken pepsin. *Alexandria Journal of Agricultural Research* 31 (1) : 173-181.

EL-BELTAGY AE., EL-ADAWY TA., RAHMA EH. and EL-BEDAWAY AA. (2004). Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chem.* 86: 33-39.

EL-SHAMEI Z.A. and GOUDA, A. (1990). Studies on chicken pepsin I-isolation and purification. *Egypt J. Food Sci.* 18, 245-252

ERSKINE P.T., COATES L., MALL S., GILL R.S., WOOD S.P., MYLES D.A.A and COOPER J.B. (2003). Atomic resolution analysis of the catalytic site of an aspartic

proteinase and an unexpected mode of binding by short peptides. *Protein Sci.* 12 : 1741-1749.

ESTEVEES C.L.C., LUCEY J. A. and PIRES E.M.V. (2001). Mathematical modelling of the formation of rennet-induced gels by plant coagulants and chymosin. *Journal of Dairy Research* 68 : 499-510.

EVERETT D. W. and OLSON F. (2000). Dynamic rheology of renneted milk gels containing fat globules stabilized with different surfactants. *J. Dairy Sci.* 83 : 1203-1209.

FAERBER J., (2004). Microscopie électronique à balayage, microanalyse X par sonde électronique, IPCMS, 53 p.

FINDLAY C.J., STAINLEY D.W. and EMMONS D.B. (1984). Chicken pepsin as a rennet substitute. *Food Science and Technology Journal*, 17 (2), 97-101.

FOX P.F, SINGH T.K. and McSWEENEY P.L.H. (1994). Proteolysis in cheese during ripening. The proceedings of a symposium by food chemistry group : 1-32.

FUSEK M. and VĚTVIČKA V. (2005). Dual role of cathepsin D: Ligand and protease. *Biomed. Papers* 149 (1) : 43–50.

GARRET R.H et GRISHAM C.M. (2000). Biochimie édition De Boeck Université S.A, 1^{ère} édition, 1254 p.

GASTALDI-BOUABID E. (1994). Etude de l'évolution des micelles de caséine au cours de l'acidification : mise en évidence d'un état de transition entre pH 5,5 et pH 5,0. Thèse de Doctorat en Biochimie et Biologie Moléculaire. Université Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, 176 p.

GASTALDI E., LAGAUE A. and TARODO DE LA FUENTE B. (1996) Micellar transition state in casein between pH 5.5 and 5.0. *J. Food Sci.* 61, 59-64.

GASTALDI E., PELLIGRINI O., LAGAUE A. and TARODO de LA FUENTE B. (1994). Functions of added calcium in acid milk coagulation. *J. Food Sci.*, 59 : 310-320.

GHOSAL S. and SRIVASTAVA A.K.(2009). Fundamentals of bioanalytical techniques and instrumentation. Published by ASOKE K. Ghosh, New Delhi, 130-163, 308 p.

GOODHEW P. J., HUMPHREYS J., and BEANLAND R. (1998). Electron microscopy and analysis, 3rd edition, Press or Chapman & Hall, 264 p.

GORDIN S. and ROSENTHAL I. (1978). Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. Journal of Food Protection ; Vol. 41, N° 9 ; 684-688.

GORDIN S., and KOSIKOWSKI, F.V. (1979). Chicken pepsin as a coagulant in cheddar cheesemaking. Journal of Dairy Science, 62 (suppl. 1) : 56-57.

GORDIN S., ROSENTHAL I., BERNSTEIN S., NAVROT C., BALABAN N., and FRANK M., (1978). Chicken pepsin as a substitute for calf rennetin cheese production. XX-International Dairy Congress, E) : 441-442.

GOUDA A., EL-ZAYAT A.T., EL-SAFY M.S. and GENIED R.H., (1988). Utilization of chicken pepsin in cheese making. I-Extraction and some properties. Egyptian Journal of Dairy Science, 16(2) : 215-221.

GOUDA A. and EL-SHAMEI, Z. (1990). Studies on chicken pepsin III-Parameters affecting activities and properties of two chicken pepsins. Egypt J. Food Sci. 18, 201-210.

GREEN M.L. and LLEWELLIN J. M. (1973). The purification and properties of a single chicken pepsinogen fraction and the pepsin derived from it. Biochem. J.(133) : 105-115.

GREEN M.L., VALLER M. J.and KAY J (1984). Assessment of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparations. Journal of Dairy Research, 51: 331-340.

GRIEBENOW K., and KLIBANOV A., (1995). Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. Vol N° 92, pp: 10969–10976.

GROSSIORD J.L. et QUEMADA D. (2002). Des concepts aux outils In « Comprendre la rhéologie, coordinateurs : Coussot P. et Grossiord J.L. (2002), édition EDP Sciences, pp : 9-34, 221p.

Références bibliographiques

GUERARD F., (1987). Une utilisation des enzymes protéolytiques extraites des viscères de poissons, Rev. Trav. Inst. Pêches marit, 49 (3 et 4) : 199-203.

GUILLOU H., PELISSIER J.P. et GRAPPIN R. (1986). Méthodes de dosage des protéines du lait de vache, Le lait 66 : 143-175.

GUTHY, M.L., AVERSWALD, D. and BUCHHEIM, W. (1989). Electron microscopic and viscosimetric studies of the primary phase of rennet coagulation of milk, Milchwissenschaft, 44 : 560-563.

HASHEM A.M., (2000). Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum*. Bio Resour Technol. 75 : 219-222.

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

HORNE D.S. AND DALGLEISH D. G., (1980). Electrostatic interaction and the kinetics of protein aggregation α_s_1 casein. Int. J. Biol. Macromol., vol 2, 154-160.

HOUINS G., EROANNE C. AND COPPENS R. (1973). Etude comparative de l'activité coagulante et du pouvoir protéolytique de la présure animale et de trois de ses succédanés. Le lait, N° 529-530 : 610-624.

IDF, (1991). Chemical methods for evaluation of proteolysis in cheese maturation. Bulletin 261. International Dairy Federation, Brussels.

IDF, (1999). Chemical methods for evaluation of proteolysis in cheese maturation. Bulletin 337. International Dairy Federation, Brussels.

IZUTSU K., YOSHIOKA S., TAKEDA Y., (1991). The effects of additives on the Stability of freeze-dried b-galactosidase stored at elevated temperature. Int. J. Pharm. 71, : 137-146.

IZUTSU K., AOYAGI N. and KOJIMA S., (2004). Protection of protein secondary structure by saccharides of different molecular weights during freeze drying. Chem. Pharm.Bull. 52 (2) 199-203

Références bibliographiques

JARMUL I., REPS A., POZNANSKI S. and ZELAZOWSKA H. (1982a). Utilisation du mélange de la pepsine avec la préparation microbienne " Fromase " dans la fabrication des fromages Edam et Kortowski. Lait 62, 612 : 75-86.

JARMUL I., REPS A., POZNANSKI S. (1982b). Usage du mélange de la pepsine avec des préparations (Fromase) ou (Milcozyme) pour la fabrication des fromages Tilsit et Camembert. Le Lait (62) : 166-176.

JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P. et BRULE G., (2007). Sciences des aliments, Tome 2 : Technologie des produits alimentaires. Tec. & Doc., Lavoisier, 456 p.

JUOZAITIENE V., ŠLAPKAUSKAITE J., TUSAS S., BRAZAUSKAS A., JAPERTIENE R. (2010). VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA ISSN 1392-2130. (*Vet Med Zoot*). T. 51 (73).

KAGEYAMA T., (1988). Analysis of the activation of pepsinogen in the presence of protein substrates and estimation of the intrinsic proteolytic activity of pepsinogen. Eur.J. Biochem. 176 : 543-549.

KALIT S., LUKAC HAVRANCK J., KAPS M., and PERKO B. (2005). Proteolysis and the optimal ripening time of Tounj cheese. International Dairy Journal 15: 619-624.

KAMOUN P., LAVOINNE A., ET VERNEUIL H., ET LA COLLABORATION DE DARMON M., ET DEMOTES-MAINARD J. (2003). Biochimie et biologie moléculaire, chapitre 7 : structure et mécanisme d'action, pp : 75-85, édition Flammarion, 473 p.

KEIL, B. (1992). Specificity of proteolysis. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg New York p: 335.

KEIM S. AND HINRICHS J., (2003). Rheological characteristics of milk protein gels : influence of stabilizing bonds. The third International Symposium on Food Rheology and Structure.

KENNEDY J.F. (1987). Biotechnology, Enzyme Technology, Volume 7a. VCH Publishers, 761 p.

KLANDAR A.H., LAGAUE A. AND CHEVALIER-LUCIA D. (2007). Assessment of the rennet coagulation of skim milk: A comparison of methods. *International Dairy Journal*, Volume 17, Issue 10 : 1151-1160.

KONUKLAR G. AND GUNASEKARAN S. (2002). Rennet-induced milk coagulation by continuous steady shear stress. *Journal of Colloid and Interface Science* 250 : 149–158.

KOROLCZUC, MAUBOIS J.L., CARDENAS R., GROSCLAUDE G. (1986). Computerized rheometric method for studying rennet coagulation of milk. *Le Lait*,66 (2) : 99-115.

KUDRYASHOV E.D., HUNT N.T., ARIKAINEN E.O. AND BUCKIN V.A. (2000). Monitoring of acidified milk gel formation by ultrasonic shear wave measurements. High frequency viscoelastic moduli of milk and acidified milk gel. *J. Dairy Sci.*84 : 375-388.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

LAGAUE A., FERNANDEZ L.,CUQ J. L., AND MARCHESSEAU S. (2004). Characterization of curd formation during the rennet coagulation of milk by an optical microscopic method. *International Dairy Journal* 14 : 1033-1039.

LAGOUILLE N. (1994). Microstructure et rhéologie des coagulums de type présure : action de la température et de l'addition du phosphate de calcium. Thèse de Doctorat en Biochimie et Biologie Moléculaire. Université Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, 161 p.

LAMAS EM., BARROS RM., BALCAO VM. ET MALCATA FX., (2001). Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme Microb Technol.* 28 : 642-652.

LARBIER M., ET LECLERCQ B., (1992). Nutrition et alimentation des volailles. INRA, Paris, 347 p.

LARSSON, K.I AND ANDRÉN, A. (1997). Affinity between chymosine and individual caseins at varying pH-values, *Int. Dairy J.*, 7 : 61-68.

Références bibliographiques

LAW, B. A. (2009). Enzymes in Dairy Product Manufacture, In : Enzymes in Food Technology”, pp : 90-96, second edition (eds Whitehurst R. J. and Van Oort M.), Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 245 p.

LECOQ.R. (1965). Manuel d’analyses alimentaires et d’expertises usuelles, tome II, éditions DOIN-DERENET Cie, France, 1240 p.

LEFEBVRE-CASES E., GASTALDI E., VIDAL V., MARCHESSEAU S., LAGAUE A., CUQ J-L., and TARODO de LA FUENTE B. (1998a). Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. J. Dairy Sci. 81 : 932-938.

LEFEBVRE-CASES E., GASTALDI E., and TARODO DE LA FUENTE B. (1998b). Influence of chemical agents on interactions in dairy products : Effect of SDS on casein micelles. Colloids and surfaces B : Biointerfaces 11 : 281-285.

LEFEBVRE-CASES E., TARODO DE LA FUENTE B. and. CUQ J. L (2001). Effect of SDS on casein micelles : SDS-induced milk gel formation. Journal of food Science 66 : 38-42.

LEHNER D., WORNING P., FRITZ G., ØGENDAL L., BAUER R., and GLATTER O, (1999). Characterization of enzymatically induced aggregation of casein micelles in natural concentration by *in situ* static light scattering and ultra low shear viscosimetry. Journal of colloid and interface Science 213, 445-456.

LEITE R.S.R., PRADO H., F.,A.,CABRAL H., PAGNOCCA F.,C., GOMES E., and DA-SILVA R. (2008). Production and characteristics comparaison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullants* in agricultural wastes. Enzyme and Microbial Technology 43 : 391-395.

LENOIR J. (1963). Note sur la dégradation des protides au cours de la maturation du camembert. Extrait de la revue Le Lait, 48, 3 : 1-11.

LENOIR J., REMEUF F. et SCHNEID N (1997). L’aptitude du lait à la coagulation par la présure, In « Le fromage », Eck, A., et Gillis J.C. (coordonnateurs), pp : 229-256, 3^{ème} édition, Lavoisier Tec.& Doc. 891 p.

LI J. and DALGLEISH D.G., (2006). Mixed coagulation of milk – gel formation and mechanism, *J. Agric. Food Chem.* 54, 4687–4695.

LIM J.W. and GORDIN S., (1979). The effect of three different temperatures on the protein breakdown of Edam cheese made with chicken pepsin. *Korean Journal of Animal Science*, 21 (1) : 29 -39.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. and Randall R. J, (1951). Proteins measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological chemistry*, 193, 265 – 275.

LUCEY, J. A. TEO, C. T., MUNRO P.A. and SINGH H., (1997). Rheological properties at small dynamic and large yield deformations of acid gels made from heated milk. *J.Dairy Res.* 64 : 591-600.

LUCEY J.A. (2001). The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gel. *Food Hydrocolloids* 15 : 603-608.

LUCEY J., A., (2002). Formation and physical properties of milk protein gels. *J. Dairy Sci.* 85 : 281-294.

LUCEY, J.A. (2002a). Rennet coagulation In : *Encyclopedia of dairy sciences*, Roginski H., Fox P.F. and Fuquay J.W., eds. Academic Press San Diego, CA pp : 286-293.

LUCEY, J. A. (2002b). Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85, 281–294.

LUCEY, J.A., TEO C.T., MUNRO P.A., and SINGH H., (1997). Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. *J Dairy Res.* 64 : 591-600.

LUCEY, J.A., and SINGH H., (1997). Formation and physical properties of acid milk gels : a review, *Food Res.Int.* 30 : 529-542.

LUCEY, J.A., TAMEHANA M., SINGH H. and MUNRO P.A, (2000). Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono- δ -lactone. *J. Dairy Res.* 66 : 415-427.

Références bibliographiques

- LUCEY, J. A., JOHNSON, M. E., and HORNE, D. S. (2003).** Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 2725–2743.
- LUQUET F. M. et BOUDIER J. F. (1981).** Lexique des termes utilisés en industrie laitière, 2^{ème} édition, Lavoisier Tec. et Doc., 185 p.
- MACEDO A., MALCATA F.X. and OLIVEIRA J.C. (1993).** The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese : A review, *J. Dairy Sci.* 76 : 1725-1739.
- MADADLOU A., KHOSROSHANI A., and MOUSAVI M. E. (2005).** Rheology, microstructure, and functionality of low-fat iranian white cheese made with different concentrations of rennet. *J. Dairy Sci.* 88 : 3052-3062.
- MAFART P., (1991).** Génie industriel et alimentaire, les procédés physiques de conservation, tome I. Edition Lavoisier Tec. et Doc., 341 p.
- MAHAUT M., JEANTET R., et BRULE G. (2000).** Initiation à la technologie fromagère. Techniques et Documentation, Lavoisier, 2^{ème} tirage, 194 p.
- MANDY J., DORIS J., and HARALD R. (2011).** Recent advances in milk clotting enzymes. Review, *International Journal of Dairy Technology* Vol 64, 1 : 14-33.
- MARSHALL, R.J. (1982).** An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action of milk. *J. Dairy Res.*, 49 : 329-336.
- MARTIN P., COLLIN J.C., CARNOT P., RIBADEAU-DUMAS B. et MOCQOT C., (1982).** Méthode d'analyse quantitative des extraits de présure et de pepsine bovine, détermination des teneurs en enzymes actives, In : *Utilisation des enzymes en technologie alimentaire ; Symposium International, Versailles, les 5, 6, et 7 mai, 1982.* Ed., Dupuy P., Lavoisier Tec. et Doc., pp. 287-292, 555 p.
- MATHIEU J., (1998).** Initiation à la physicochimie du lait, Tec et Doc., Lavoisier, 220 p.
- McMAHON D.J. and Brown R.J. (1984).** Enzymic coagulation of casein micelles. *J. Dairy Sci* 67 : 919-929.

Références bibliographiques

McMAHON, D.J., Richardson G.H. and Brown R. J. (1984). Role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *J. Dairy Sci.* 67:1185-1193.

McSWEENEY P.L.H., Pochet S., Fox P.F. and Healy A. (1994). Partial identification of peptides from the water-insoluble fraction of cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 61, 587-590.

Mc SWEENEY P.L.H., FOX P.F. and OLSON N.F. (1995). Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D : preliminary observations and comparaisn with chymosin. *Int Dairy J.* 5 : 321-336.

MECHAKRA A., AUBERGER B., REMEUF F., et 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.

MISHRA R., GOVINDASAMY-LUCEY S., and 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.

MOATSOU G., SAMOLADA M., PANAGIOTOU P. and ANIFANTAKIS E. (2004). Casein fraction of bulk milks from different caprine breeds. *J. of Food Chemistry* (87): 75-81.

MOSCHOPOULOU, E., KANDARAKIS, I., ANIFANTAKIS, E., (2004). Effect of extraction conditions on the characteristics of the traditional lamb rennet. *Greek J. Dairy Sci. Technol.* Issue 1 : 27–42.

MOSCHOPOULOU E., KANDARAKIS I., ALICHANIDIS E., and E. ANIFANTAKIS (2006). Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *Journal of Dairy Research* 73 : 49–57.

MOSCHOPOULOU E., KANDARAKIS I. and ANIFANTAKIS E. (2007). Characteristics of lamb and kid artisanal liquid rennet used for traditional feta cheese manufacture. *Small Ruminant Research* 72 : 237-241.

MOSCHOPOULOU, E., ONOUFRIOU, E., KANDARAKIS, I., (2009). Effects of diet and abomasums part on enzymic properties of liquid lamb rennet. *Ital. J. Food Sci.* 21 : 73–80.

MOSCHOPOULOU E., (2011). Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Ruminant Research* 101 : 188– 195.

MUCCHETTI G., GATTI M. and. NEVIANI E. (1993). Electrical Conductivity Changes in Milk Caused by Acidification: Determining Factors. *Journal of Dairy Science*, 77 (4) : 940-944.

MURPHY D. B. (2001). *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*, Publisher Wiley-Liss, 386 p.

NAJERA AI, De RENOBALLES M., and BARRON L.J.R., (2002). Effect of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk : A multifactorial study. *Food Chem.* 80 : 345-352.

NIELEN M., DELUYKER H., SCHUKKEN and BRAND A., (1992). Electrical conductivity of milk : Measurement, modifiers and meta anlysis of mastitis detection performance. *J. Dairy Sci.* 75 : 606-614.

O'CALLAGHAN D.J., O'DONNELL C.P., and PAYNE F.A. (2000). On-line sensing techniques for coagulum setting in rennet milks. *J.Food Eng.* 43 : 155-165.

ÖSTERLUND B. and JANSON J. C., (1998). A strategic approach to protein purification: Part II, *Science Tools from Amersham Pharmacia Biotech* 3, 1 : 20-22

OULD ELEYA M. M., KO S. and GUNASEKARAN S. (2004). Scaling and fractal analysis of viscoelastic properties of heat-induced protein gels. *Food Hydrocolloids* 18 : 315-323.

PAQUETON H. ET RUSTE J. (2006). *Microscopie électronique à balayage : images, applications et développements.* Techniques de l'Ingénieur, Paris France, 866 p.

PARK Y.W., JU'AREZ M., RAMOS M., and HAENLEIN G.F.W (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68 : 88–113.

Références bibliographiques

PAVIA M., TRUJILLO A.J., GUAMIS B. and FERRAGUT V. (2000). Proteolysis in Manchego cheese salted by brine vacuum impregnation. *J. Dairy Science*, 83 : 1441-1447.

PEARSE M. J. and MACKINLAY A. G.(1989). Biochemical aspect of syneresis. *J. Dairy Sci* 72 : 1401 1407.

PELMONT J., (1993). Les enzymes. Presses Universitaires de Grenoble, Collection : Grenoble Sciences, 605 p.

PETSKO G.A., RINGE D., SANLAVILLE C. et BENSIMON D.C. (2008). Structure et fonction des protéines, édition De Boeck Université, 212 p.

PHADUNGATH C., (2005). The mechanism and properties of acid –coagulated milk gels. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 27 (2) : 433-448.

PHELAN J. A. (1973). New coagulants for cheese making. *Farm and Food Research*: 68-71.

PICHOVA I. and KOSTKA V. (1990). Molecular characteristics of pepsinogen and pepsin from duck glandular stomach. *Comp. Biochem. Physiol. (B 97)* : 89-94.

PRESTRELSKI S.J., ARAKAWA T. and CARPENTER J.F., (1993). Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilisation II: structural studies using infrared spectroscopy. *Journal of Biochem, Biophys.*303 : 465–473.

QI, W., SU R. X., HE Z. M., ZHANG Y.B and JIN F.M (2007). Pepsin-induced changes in the size and molecular weight distribution of bovine casein during enzymatic hydrolysis. *American Dairy Science Association* 90 : 5004-5011.

QIN W., BULCA S. and KULOZIK U. (2007). A comparison of low-intensity ultrasound and oscillating rheology to assess the renneting properties of casein solutions after UHT heat pre-treatment. *International Dairy Journal* 17: 50-58.

RAMET J. P., (1997a). Propriétés physiques du coagulum In : Le fromage, de la science à l'assurance de qualité Eck A., et Gillis J.C. (coordonnateurs) pp. 324-333, 3^{ème} édition, Lavoisier Tec. & Doc, 891 p.

Références bibliographiques

RAMET, J.P (1997b). L'égouttage du coagulum in « Le fromage », Eck A., et Gillis J.C. (coordonnateurs) pp : 42-60, 3^{ème} édition, Lavoisier Tec. & Doc. 891 p.

RAMPILLI M., LARSEN R. ET HARBOE M., (2005). Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *Int Dairy J.* 15 :1130-1137.

RIBADEAU DUMAS, B., (1991). Physicochimie et biochimie des protéines de lait. Données récentes ; *Lait* 71 : 133-139.

RICHTER C., TANAKA T. and YADA R.Y.(1998). Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases : pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem J.*, 335, 481-490.

ROA I., LOPE MB. ET MENDIOLA FJ., (1999). Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena chesse. *Food Res Intern.* 32 : 413-419.

ROSEIRO L.B., GARCIA-RISCO M., BARBOSA M., AMES M.J., and WILBEY A R. (2003). Evaluation of Serpa cheese proteolysis by nitrogen content and capillary zone electrophoresis. *International Journal of Dairy Technology*, Vol 56, N° 2 : 99-104.

ROSENTHAL A.J. (1999). Food texture measurement and perception. ASPEN Publishers, Inc., 296 p.

ROUDOT A. C., (2002). Rhéologie et analyse de texture des aliments. Edition Lavoisier Tec. & Doc., 199 p.

SALVADOR A. and FISZMAN S.M., (1998). Textural characteristics and dynamic oscillatory rheology of maturation of milk gelatin gels with low acidity. *J.Dairy Sci* 81 : 1525-1531.

SCHWEGMAN J.J, HARDWICK L.M. and AKERS M.J. (2005). Practical formulation and process development of freeze dried products. *Pharmaceutical Development and Technology*, 10 : 151-173.

SHAMMET K. M., BROWN R.J. and MCMAHON D. J. (1992). Proteolytic activity of some milk clotting enzymes on κ casein. *J.Dairy Science*, 75 : 1373-1379.

Références bibliographiques

SHEEHAN D., (1996). Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) methods In : Protein purification protocols : methods in molecular biology ,editor Shawn Doonan, Humana press Inc. 59 (26) : 269-275 ; 405 p.

SHEEHAN D. and O’SULLIVAN S. (2004). Fast Protein Liquid Chromatography Protein pp 253-258 In : Protein purification protocols, Methods in Molecular Biology, by CUTLER P, 2nd edition,. volume 244, Humana Press, Totowa, NJ, 484 p.

SILVA SV, ALLMERE T., MALCATA FX. and ANDREN A., (2003). Comparative studies on the gelling properties of cardosins extracted from *Cynara cardunculus* and chymosin on cow’s skim milk. Int Dairy J. 13 : 559-564.

SILVA, S.V., BARROS R. M. and MALCATA F. X. (2002). Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulfate. Journal of Food Science 67: 1746-1751.

SIMPSON W.T., (1987). Vacuum drying northern red oak, forest products journal vol. 37, : 33-38.

SKOOG D.A., HOLLER F.J., et NIEMAN T. A. (2003). Principes d’analyse instrumentale. Traduction et révision scientifique de la 5^{ème} édition américaine par Claudine Buess-Herman et Freddy Dumont. Edition de Boeck, 968 p.

SOUSA M.J. and Mc SWEENEY P.L.H., (2001). Studies on the ripening of Cooleeney, an Irish farmhouse Camembert-type cheese. Irish J. Agric. Food Res. 40, 83-95.

SOUSA M.J., ARDÖ Y and Mc SWEENEY P.L.H., (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. Int. Dairy J., 11, 327-345.

SOUSA M. J. and MALCATA F. X. (1997). Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of *Cynara cardunculus*. Z. Lebensm. Unters. Forch, 205, 104-107.

SOUSA M. J. and MALCATA F. X. (1998). Identification of peptides from ovine milk cheese manufactured with animal rennet or extracts of *Cynara cardunculus* as coagulant. J. Agric.Food Chem., 46 : 4034-4041.

SOUSA M. J. and MALCATA F. X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) *in vitro* and during ripening of cheese from several milk species. Lait 82 : 151-170.

SRINIVASAN M. and LUCEY J.A. (2001). Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. J. Dairy Sci. 85 : 1070-1078.

STANLEY D. W., EMMONS D. B., MODLER H.W. and IRVINE D. M. (1980). Cheddar cheese made with chicken pepsin. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 13, (2) : 97-102.

STORRY J.E. and FORD G.D (1982). Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in renneted milk. J. Dairy Res., 49 : 469-477.

SWAISGOOD H.,E., (1982). Chemistry protein, In : Developments in dairy chemistry-1, Ed., Fox P.F., Applied Science Publishers Ltd, p. 1-60, 409 p.

TARODO DE LA FUENTE B. and ALAIS C. (1975). Physico-chemical studies on the enzymatic coagulation of milk. Chimia, 9 : 379-383.

TARODO DE LA FUENTE, B., LABLEE, J. et CUQ, J.L. (1999). Le lait-coagulation et synérèse. I.A.A, 116 : 19-26.

TAVARES J.-F.-P., BAPTISTA J.A.B. and MARCONE M. F. (1997). Milk coagulating enzymes of tuna fish waste as a rennet substitute. International Journal of Food Sciences and Nutrition 48 : 169 – 176.

TAVARIA F.K., SOUSSA M. J., DOMINGOS A., MALCATA F. X., BRODELIUS P., CLEMENTE A., and PAIS S. (1997). Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 45: 3760-3765.

TEMIZ H., AYKUT U., OKUMUS E. and TURHAN S. (2007). The partial purification and properties of pepsin obtained from turkey proventriculus. Biotechnology and Bioprocess Engineering 12: 450-456.

TEMIZ H., OKUMUS E., AYKUT U., DERVISOGLU M., and YAZICI F. (2008). Partial purification of pepsin from turkey proventriculus. *World J Microbiol Biotechnol* , 24 : 1851–1855.

TETRA PAK PROCESSING SYSTEM (1995). Dairy processing hand book, Suède, 436 p.

TRUJILLO A. J., GUAMIS B., LAENCINA J., and LÓPEZ M.B. (2000). Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. *Food Chemistry* 71 : 449-457.

TSOULI J., FAVRE-BONVIN G., POLICARD CH. et VILLE A. (1975). Mesure par la méthode conductimétrique, de l'activité enzymatique de trois variétés de présure sur du lait frais de mélange et du lait reconstitué à partir de poudre dégraissée. *Le lait*, N° 545-546 : 289-294.

TSYRLOV, I. GROMOVA O. and LYAKHOVICH V. (1976). Mechanism of inhibition by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone and sodium deoxycholate of cytochrome P-450-catalysed hepatic microsomal drug metabolism. *Biochem. J.* 160 : 75-83.

TUNICK MH, (2000). Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *J Dairy Sci.*; 83(8) : 1892-8.

UDABAGE P., MCKINNON I.R. and AUGUSTIN M.A. (2001). Effects of mineral salts and calcium chelating agents on the gelation of renneted skim milk. *J. Dairy Sci.*, 84 : 1569-1575.

UMAR DAHOT M., YAKOUB KHAN M. and. MEMON A. N (1990). *Journal of Islamic Academy of Sciences* 3: 4, 284-286.

UPADHYAY V.K., MCSWEENEY P.L.H., MAGBOUL A.A.A., and FOX P.F, (2004). Proteolysis in cheese during ripening, chapter 14.4, pp : 391-434, In : *cheese : Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition-Volume I : General aspects 3651 p.

VASILJEVIC T., and JELEN P. (2003). Drying and storage of crude β -galactosidase extracts from *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* 11842. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4 : 319-329.

Références bibliographiques

VEISSEYRE R. (1979). Technologie du lait. Maison rustique, 3^{ème} édition, refondue de techniques laitières, 715 p.

VÉTIER N, BANON S., RAMET J.P. and HARDY J. (2000). Hydratation des micelles de caséine et structure fractale des agrégats et des gels de lait. Lait (80) 237-246.

VIDAL V., MARCHESSEAU S., and CUQ J. L. (2002). Physicochemical properties of acylated casein micelles in milk . Journal of Food Science Vol 67, n°1 : 42-47.

VIERLING, E., (1999). Aliments et boissons, filières et produits CRDP d'Aquitaine, édition DOIN, 270 p.

VIGNOLA C.L., (2002). Science et technologie du lait ; édition Montréal, 600 p.

VLIET T.V., LAKEMOND C.MM., and VISSCHERS R.W. (2004). Rheology and structure of milk protein gels. Colloid and Interface Science 9 (5) : 298-304.

VOET D. et VOET J.G., (2005). Biochimie, DeBoeck université s.a., 2^{ème} édition, pp : 127-207, 1600 p.

VIOQUE M., GÓMEZ R., SANCHEZ E., Mata C., TEJADA L. and FERNÁNDEZ-SALGUERO J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewe's milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis*. J. Agric.Food Chem. 48 : 451-456.

VON JAGOW G. and SCHÄGGER H, (1994). A practical guide to membrane protein purification : separation detection and characterization of biological macromolecules, 1st edition, Academic press, 161 p.

WAHBA A.A. and EL-ABBASY F.M. (1984). Studies on the use chicken pepsin on Domiati, cheese making. Egyptian Journal of Dairy Science. 12 (1) : 77-82.

WALLACH J. (1997). Les enzymes. Edition Nathan, 130 p.

WALSTRA, P. and VAN VLIET, T. (1986). The physical Chemistry of curd making. Neth. Milk Dairy J., 39 : 209-246.

Références bibliographiques

WANGO J., FARAH Z. and PUHAN Z. (1993). Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract. *Milchwissenschaft* 48 (6) : 322-325.

WARD K.R., ADAMS G.D.J., ALPAR H.O. and IRWIN W.J. (1999). Protection of the enzyme L-asparaginase during lyophilisation-a molecular modelling approach to predict required level of lyoprotectant. *International Journal of Pharmaceutics* 187 : 153-162.

YOSHIMASU M.A., AHN J.K., TANAKA T. and YADA R.Y., (2002). Soluble expression and purification of porcine pepsinogen from *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 25 : 229-236.

YOUSIF BASHIR H., MC MAHON DONALD J. and SHAMMET KHALID M. (1996). Milk clotting enzyme from *Solanum dohium* plant. *Int. Dairy Journal* 6 : 637-644.

YUN J. J., BARBANO D. M., KINSTEDT P. S. and LAROSE L. (1995). Impact of whey pH at draining on chemical composition, proteolysis and fonctionnal properties on mozzarella cheese. *J Dairy Sci* 78 : 1-7.

ZHANG, F.X. and WANG, B.N., (2007). Optimization of processing parameters for the ultrasonic extraction of goat kid rennet. *Int. J. Dairy Technol.* 60 : 286–291.

ZHOU N. and MULVANEY J. (1998). The effect of milk fat, the ratio of casein to water and the temperature on the viscoelastic properties on rennet casein gels. *J. Dairy Sci* 81 : 2561-2571.

ZOON P.T., VLIET V. and WALSTRA P. (1988a). Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 1-Introduction *Neth.Milk Dairy J.* 42 : 249-269.

ZOON P., VLIET V. and WALSTRA P. (1988b). Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 3-The affect of calcium and phosphate. *Neth. Milk Dairy J.* 42 : 295-312.

SITES CONSULTES

WWW.FAOSTAT.FAO.org consulté le 2 mars 2013

WWW.ONS.DZ consulté le 5 mai 2013

***PRODUCTION
SCIENTIFIQUE***



Universal Academic Services

http://www.universalacademicservices.org/wp-content/uploads/2013/09/header_3-png.png

Journal of Agriculture, Biotechnology & Ecology, 3(1), 75-86, 2010

ISSN: 2006-3938

Comparative Study of Milk Coagulation With Chicken Pepsin or Rennet: Interactions and Microstructure

F. A. Benyahia-Krid , H. Attia , and M. N. Zidoune

*a Institut de la Nutrition, de l'Alimentation, et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA) Université de Constantine, Algérie Laboratoire d'Analyses Alimentaires. Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Tunisie
Corresponding author: E-mail address : ferialaziza@yahoo.fr*

ABSTRACT

The interactions involved in gelification of milk with chicken pepsin were studied and compared to those with rennet gel using different dissociating agents – sodium dodecyl sulfate (SDS), urea and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). Destabilization and aggregation of micelles were determined by turbidimetry and gel microstructure with the aid of scanning electron microscopy (SEM). Results showed that hydrophobic binding was the dominant force in protein gelification but there were no significant differences in protein interactions between the two types of gel. Turbidity and microstructure analyses also showed a similarity in gel micelles aggregation for milk coagulated by chicken pepsin and rennet.

Keywords : Pepsin, rennet, milk coagulation, protein interactions, micelles aggregation, microstructure.

Journal of Agriculture, Biotechnology & Ecology, 4(2), 51-63, 2011

**Milk Coagulation With Chicken Pepsin: Proteolytic Benefits
of Substituting Rennet in Cheese Making and Recycling of
Forestomachs in Algeria**

F. A. Benyahia-Krid*†, H. Attia and M. N. Zidoune***

** Institut de la Nutrition, de l'Alimentation, et des Technologies Agro-
Alimentaires (INATAA) Université de Constantine, Algérie*

***Laboratoire d'Analyses Alimentaires. Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax,
Tunisie*

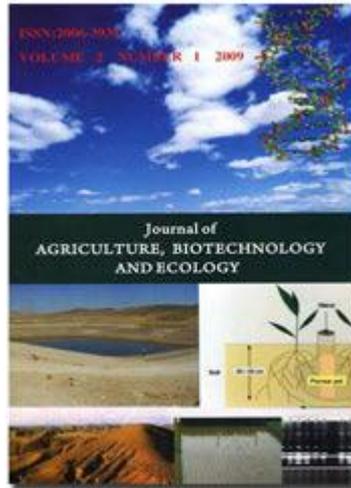
*†Corresponding author: E-mail address: ferialaziza@yahoo.fr
Adress: Université Mentouri Constantine INATAA, route Ain El Bey,
Constantine, Algeria*

TEL/FAX: 00213 31 66 18 83/ 84

ABSTRACT

We compared the proteolytic characteristics of milk coagulation with chicken pepsin versus commercial rennet by 1) -precipitation at pH = 4.4 and in TCA solution to determine changes in non casein nitrogen (NCN) and non protein nitrogen (NPN) and 2)-characterization of the degradation products of caseins by urea-PAGE and SDS-PAGE. There was no significant change in NPN production but a considerable difference ($p < 0.05$) was noted in the rates of NCN evolution between chicken pepsin and rennet. The end products of casein hydrolysis by chicken pepsin were α_1 I CN and β -I CN and this occurred earlier than those hydrolysed by rennet in urea-PAGE. From the SDS-PAGE, only κ casein was degraded by pepsin or rennet, whereas, α s and β casein were recalcitrant. The output from poultry farming in Algeria is about 250,000 tons/year. Forestomachs from, could potentially be used to coagulate about 24.6 billions liters of milk/ year whereas the estimated milk production in 2014 is 3.2 billions of liters.

Keywords: Proteolysis and chicken forestomachs, milk coagulation, pepsin, potential coagulation.



The Journal of Agriculture, Biotechnology and Ecology publishes papers in all aspects of agriculture, biotechnology and ecology with emphasis on tropical and subtropical regions. The journal provides a platform for rapid and timely dissemination of the most recent and significant information on all aspects of agriculture and forestry, including crop production, soil management, animal science, agricultural economics and extension, agricultural and environmental biotechnology and ecosystems. Papers arising from original research (experimental or descriptive) or forming significant reviews will be considered for publication.

Site Developed by [basatek](#) | [Entries \(RSS\)](#) | [Comments \(RSS\)](#) | © 2013 [Universal Academic Services](#). [Journals Published](#) by [Universal Academic Services](#)

RESUMES

RESUME

Cette étude a pour objectif l'extraction de la pepsine à partir du proventricule de poulet et sa caractérisation pour pouvoir assurer son utilisation comme substitut de présure dans la coagulation du lait. A cette fin, nous avons approché l'étude de ses activités coagulante et protéolytique ainsi que les aspects biochimique, rhéologique et microstructural du gel pepsine et sa comparaison au gel présure.

L'extrait brut de pepsine de poulet est de force de 13142. La purification partielle par FPLC a donné 45 fractions. La fraction 18 a présenté le maximum d'activité coagulante (AC) et d'activité protéolytique (AP). Le rapport AC/AP de l'extrait brut de pepsine est passé de 7,15 à 34,25 après sa purification partielle. Cette augmentation est largement recherchée en fromagerie.

Les activités coagulantes maximales pour la pepsine de poulet et la présure ont été définies pour les intervalles de température compris entre 50°C et 55 °C, de pH de 5,0 et 5,6 et pour la concentration en CaCl₂ de 0,04 M.

La coagulation a été estimée en outre, par la turbidimétrie et la conductimétrie. La turbidimétrie a montré une similitude ($p > 0,05$) entre l'évolution de la fusion des micelles au cours de la formation du gel pepsine ou du gel présure. Cependant, la conductimétrie a montré une différence ($p < 0,05$) entre la conductivité des minéraux répartis entre la phase aqueuse et la phase micellaire au cours de la gélification.

L'approche rhéologique a permis d'étudier le comportement du gel pepsine et du gel présure par application de différentes vitesses de cisaillement. La viscosité apparente en mode non destructif montre une allure semblable de l'évolution du caractère visqueux des deux gels. Les courbes de l'écoulement ont montré un comportement de liquide non Newtonien à caractère plastique (liquide de Bingham) pour les deux gels. D'autre part, le gel présure semble présenter un comportement viscoélastique ($\delta = 0,55$) relativement notable que celui du gel pepsine ($\delta = 0,60$). Les points de rupture du gel présure et du gel pepsine sont atteints respectivement à des forces de 0,34 N et de 0,38 N.

La synérèse des deux gels a montré au début de la coagulation une expulsion rapide du lactosérum. Celle-ci tend à augmenter pour le gel pepsine et à former cependant, un plateau pour le gel présure et ce, pour le même temps de coagulation.

La protéolyse étudiée a été évaluée par l'estimation des fractions azotées NPN et NCN libérées des deux gel rapportées à TN. Les fractions NPN n'ont pas montré une différence significative ($p > 0,05$). 11,4 % contre 11 % pour la pepsine et pour la présure respectivement. Néanmoins, les fractions NCN ont présenté des valeurs divergentes ($p < 0,05$) qui sont de 58,4 % pour le gel pepsine et 49,8 % pour le gel présure.

En urea-PAGE, les produits α_1 I CN et β I-CN issus de la dégradation de la caséine α_1 -CN et β -CN respectivement par la pepsine de poulet ont été observés aux premiers temps d'incubation. Ceux de la présure, ils ont commencé à apparaître tardivement à partir de 6 heures d'incubation. En SDS-PAGE, seule la para κ -CN provenant de la dégradation de la κ -CN a été obtenue comme produit d'hydrolyse par la pepsine ou par la présure.

L'étude des interactions a révélé le type de liaisons impliquées dans la formation des deux gels. Le taux de dissociation de leurs protéines a montré une abondance dans les interactions hydrophobes, suivi par les liaisons hydrogène puis par les liaisons calciques. La différence entre les taux de protéines dissociées des deux gels n'est pas significative ($p > 0,05$).

L'étude microscopique des gels a montré l'évolution de la fusion des micelles et la transition sol-gel du système. Une similitude de structure des réseaux protéiques du gel pepsine et du gel présure est visualisée. Cette ressemblance est caractérisée par la compacité et par l'apparition de nombreuses cavités de tailles hétérogènes et de zones amorphes. La structure spatiale des deux gels semble être homogène.

En vue d'assurer la stabilité de l'extrait brut de la pepsine de poulet au cours d'un stockage d'une durée de 135 jours, deux modes de séchage ont été étudiés et comparés, la lyophilisation et le séchage sous vide partiel. Alors que le séchage sous vide partiel engendre une activité résiduelle de 45,8 % qui baisse encore à 26,2 % au bout de 135 jours de stockage, la lyophilisation assure de meilleurs résultats avec 48,5 % en fin d'opération et plus de 41% durant la même période de conservation. L'activité résiduelle s'avère meilleure si le pepsinogène n'est activé qu'après lyophilisation. De plus, l'ajout du lactose à l'extrait de pepsine assure une activité coagulante résiduelle plus intéressante.

Les résultats obtenus tendent et convergent vers la possibilité de substitution de la présure par la pepsine de poulet dans la coagulation du lait. Aussi, il serait possible de l'employer dans d'autres domaines pour des intérêts biologiques ou à des fins techno-industrielles.

Mots clés : pepsine de poulet, coagulation, protéolyse, rhéologie, microstructure, conservation.

ABSTRACT

This study aimed the extraction of the pepsin from chicken proventriculus and characterization in order to ensure its use as a rennet substitute in the milk coagulation. For this purpose, we approached the study of its coagulant, proteolytic activities and biochemical, rheological and microstructural pepsin gel aspects with comparison to the rennet gel.

The chicken pepsin crude extract presented a strength coagulation of 13142. The partial purification by FPLC gave 45 fractions. The 18 fraction presented maximum coagulant activity (AC) and proteolytic activity (PA). The ration AC/AP of the pepsin crude extract increased from 7.15 to 34.25 after its partial purification. This increase is widely appreciated in cheese making.

The coagulant activity for chicken pepsin and rennet have been defined for temperature intervals included between 50 ° C and 55 ° C, pH 5.0 and 5.6 and 0.04 M CaCl₂ respectively.

The coagulation was further estimated by the turbidimetry and the conductimetry. The turbidimetry showed similarity ($p > 0.05$) between the micelles fusion evolution in the formation of the pepsin or rennet gel. However, the conductimetry has shown a difference ($p < 0.05$) between the minerals conductivity distributed between the aqueous and the micellar phase during gelation. Rheological approach allowed to study the pepsin and rennet gel behavior by application of different shear rates. The apparent viscosity in non-destructive mode showed a similar viscous character evolution after, it tended to its maximum to indicate the formation of the two gels. Flow curves showed a plastic character for the two gels (Bingham liquid). On the other hand, the rennet gel seems to be viscoelastic ($\delta = 0.55$) relatively notable than gel pepsin ($\delta = 0.60$). The rennet and pepsin gels breaking points are reached respectively to 0.34 N and 0.38 N. Syneresis of the two gels showed at the beginning of coagulation rapid expulsion of whey. This expulsion tends to increase for gel pepsin but for rennet gel a stabilisation is shown for the same time of coagulation.

Proteolysis study was evaluated by the estimation of NPN/TN and NCN/TN fractions. NPN fractions have not shown a significant difference ($p > 0.05$) ; 11.4% versus 11% for pepsin and rennet respectively. Nevertheless, the NCN fractions have presented differences ($p < 0.05$) of 58.4 % for the pepsin gel and 49.8 % for the rennet gel.

In urea-PAGE, pepsin degradation products α s1I-CN and β I-CN of α s1-CN and ϵ β -CN caseins respectively were observed in the early stages of incubation. Those of rennet appeared late from 6 hours of incubation. In SDS-PAGE, only para κ -CN was obtained as a κ -CN degradation product after pepsin or rennet hydrolysis.

The interactions study revealed the bonds type involved in the formation of two gels. The rate of their proteins dissociation showed an abundance in hydrophobic interactions, followed by hydrogen and calcium bonds. The difference between the rate of dissociated proteins of two gels is not significant ($p > 0.05$).

The microscopic study of gels showed the evolution of the micelles fusion and the sol - gel system transition. Similarity of pepsin and rennet gels protein structure networks is visualized. This resemblance is characterized by compactness and the appearance of many cavities of heterogeneous size and amorphous zones. The spatial structure of two gels seems to be homogeneous.

To ensure stability of the chicken pepsin crude extract during a 135-day storage, two modes of drying were studied and compared, freeze-drying (lyophilization) and drying under reduced vacuum. While the partial vacuum drying generated residual activity of 45.8% which decreased to 26.2% after 135 days of storage, freeze-drying ensured better results with 48.5% at the end of drying operation and more than 41% for the same conservation period. The residual activity seems to be better if the pepsinogen is activated after lyophilization. Furthermore, the addition of lactose to the pepsin extract provides more interesting residual coagulant activity.

Theses results tend and converge towards the rennet substitution possibility by chicken pepsin in the milk coagulation. Also, it would be possible to use it in other areas for biological interest or industrial technology purposes.

Key words : chicken pepsin, coagulation, proteolysis, rheology, microstructure, conservation.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو استخلاص إنزيم البيبسين من المعدة الكيميائية (proventricules) للدجاج ودراسة مميزاتا لإمكان ضمان استعمالها في عملية تخثير الحليب كبديل لروبة العجل (présure)، لهذا المبتغى، تطرقنا إلى دراسة النشاطات الإنزيمية المتعلقة بتخثير الحليب، بهدم البروتينات والمظاهر البيوكيماوية، الريولوجية والبنية المجهرية لهلام البيبسين ، ومقارنته بهلام نفحة العجل. قوة تأثير المستخلص الخام لبيبسين الدجاج قدر بـ: 13142.

أعطت التنقية الجزئية باستعمال FPLC ، 45 جزءا ، حيث قدم الجزء 18، أقصى نشاط للتخثر (Activité coagulante) ولتهديم البروتينات (Activité peptique) وانتقلت النسبة (AC/AP) لمستخلص البيبسين الخام من 7,15 إلى 34,25 بعد عملية التنقية الجزئية، هذا الارتفاع جد مرغوب فيه في صناعة الجبن. أقصى نشاطات التخثر لبيبسين الدجاج وروبة العجل كانت في مجال 50 و55°م بالنسبة لدرجة الحرارة 5,0 و5,6 بالنسبة لـ pH ، 0,04 مولارية بالنسبة لتركيز $CaCl_2$.

قدرت عملية التخثر من جهة أخرى ، عن طريق قياس درجة التعكر (Turbidité) و الناقلية الكهربائية (Conductimétrie). بينت درجة الكدر تشابه ($p < 0.05$) بين عملية التحام مذيلات الكزيين خلال تخثير الحليب باستعمال بيبسين الدجاج وروبة العجل غير أن الناقلية الكهربائية بينت اختلاف ($p < 0.05$) بين ناقلية المعادن المقسمة بين الوسط المائي والوسط الكازيني خلال عملية التخثير الناجمة من كلا الإنزيمين.

سمحت الدراسة الريولوجية بدراسة سلوك الحليب المخثر ببيبسين الدجاج أو روبة العجل عن طريق تطبيق سرعات القص (Cisaillement) المختلفة. بينت اللزوجة الظاهرية في المجال الغير المهدم لكلا الحليبين المخثرين تشابه في تطور مظهر اللزوجة الذي ينتهي إلى أقصاه دالا بذلك على التخثير الكامل للحليب. أظهر منحني التدفق (Ecoulement) السلوك الغير النيوتوني ذو مظهر بلاستيكي (سائل Bingham) لكلا الحليبين المخثرين من جهة أخرى تبين أن الحليب المخثر بروبة العجل ذو طبيعة viscoélastique ($\sigma = 55$) معتدرة نسبيا للحليب المخثر ببيبسين الدجاج قوى تهديم الحليب المخثر ببيبسين الدجاج أو روبة العجل ، بلغة بالترتيب 0,34 ن و 0,38 ن. لوحظ تدفق سريع لمصل الحليب (Lactosérum) في بداية عملية تخثير الحليب عن طريق بيبسين الدجاج ، وصل التدفق في الارتفاع لكن بروبة العجل سجل ثبوت ، وهذا لنفس زمن التخثر .

دراسة عملية تهديم البروتينات تمت بتقدير النيتروجين الغير البروتيني (NPN) والنيتروجين الغير كازيني (NCN) لم يسجل اختلاف بين قيمة NPN المحررة سواء من طرف الحليب المخثر عن طريق بيبسين الدجاج أو الروبة حيث بلغت بالترتيب مقدار 11,4% و 11% من الأوزن الكلي. بينما سجل اختلاف بين قيمة NCN المحررة المقدر بـ 58,4% بالنسبة للحليب المخثر بالبيبسين ، و 49,8% بالنسبة للمخثر بالروبة .

باستعمال Urea-PAGE تمت ملاحظة النواتج α_1 ICN و β ICN الناجمة من تهديم الكازيين α_1 -CN و- β CN بالترتيب عن طريق البيبسين في أوائل زمن التخثير بينما نفس النواتج لوحظت بعد 06 ساعات من بداية التخثير بالنسبة للروبة. أما باستعمال SDS-PAGE فقد لوحظت Para- κ -CN كناتج من تهديم κ -CN عن طريق البيبسين أو الروبة . دراسة العلاقات المسببة لتكوين الروابط المسؤولة عن إنشاء الحليب المخثر أوضحت أن التجاذب الهيدروفوبي تساهم بقسط كبير متنوع بوجود الروابط الهيدروجينية ثم يلي بعد ذلك مساهمة ورايط الكالسيوم.

بينت البنية المجهرية الدقيقة (microstructure) التحام المذيلات والانتقال من الحال السائلة (حالة الحليب) إلى الحالة المخثرة. لاحظنا تشابها بين بنيان الشبكة البروتينية للحليب المخثر بالبيبسين أو بالروبة ، حيث خصص هذا بالتماسك المماثل وظهور عدة فجوات بقياسات مختلفة ومناطق غير محددة الشكل . هذا ما يدفع إلى القول باحتمال وجود تشابه بين البنية الفضائية لكل من الحليب المخثر بالبيبسين ونظيره المخثر بالروبة.

من أجل تحقيق استقرار المستخلص الخام لبيبسين الدجاج ، خلال مدة حفظ تقدر بـ 135 يوم تمت دراسة التجفيف تحت فراغ جزئي (séchage sous vide partiel) وتجفيف تحت فراغ شبه كلي المتمثل في عملية التجفيد (Lyophilisation). بين هذا الأخير أن عملية التجفيف أدت إلى نتائج معتبرة حيث تم استرجاع 48,5% من النشاط الإنزيمي بعد عملية التجفيف مباشرة ، وأكثر من 41% بعد 135 يوم من التخزين لكن التجفيف تحت الضغط الجزئي حقق استرجاع 45,8% الذي انخفض أكثر إلى 26,2% خلال نفس مدة التخزين . كما تبين أن النشاط الإنزيمي يكون معتبر إذا تم تنشيط البيبسينوجين (pepsinogène) بعد عملية التجفيف زيادة على ذلك تبين أن إضافة اللاكتوز لمستخلص البيبسين قبل التجفيف تمكنه من الحصول على نشاط إنزيمي معتبر.

جملة النتائج المحصل عليها تؤول إلى إمكانية استبدال الروبة ببيبسين الدجاج في عملية تخثير الحليب كما يمكن استخدامها في مجالات أخرى ذات أهداف بيولوجية وصناعية.

الكلمات الدالة : بيبسين الدجاج – تخثير الحليب – هدم البروتينات - ريولوجيا – حفظ البيبسين – البنية المجهرية الدقيقة.