



*Département :*

**Technologies Alimentaires**

N° d'ordre :.....

N° de série :.....

## **Thèse de Doctorat en Sciences**

**Spécialité : Sciences Alimentaires**

**Thème**

---

Attendrissement artificiel des viandes : le cas de l'utilisation de la pepsine du proventricule de poulet et de cystéines protéases de plantes purifiées par le système de répartition triphasique.

---

**Présenté par : Mme HAFID Kahina ep. BOULOUH**

**Soutenue le : 22 /04/ 2021.**

**Devant le Jury composé de :**

<b>Président(e) :</b>	<b>DAHEL C.C.</b>	<b>Pr.</b>	<b>INATAA–UFMC1</b>
<b>Rapporteur :</b>	<b>BECILA-HIOUAL S.</b>	<b>Pr.</b>	<b>ATRBSA -DGRSDT</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>BOUDJELLAL A.</b>	<b>Pr.</b>	<b>INATAA–UFMC1</b>
	<b>KRID-BENYAHIA F. A.</b>	<b>Dr.</b>	<b>INATAA–UFMC1</b>
	<b>BOUDJENAH S.</b>	<b>Pr.</b>	<b>Université Kasdi Merbah Ouargla</b>
	<b>ZALLAGUI A.</b>	<b>Pr.</b>	<b>Université Larbi Ben M'hidi Oum El-Bouaghi</b>

## Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde. En raison, de l'aide et le soutien de nombreuses personnes, que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je souhaite remercier tout d'abord les membres du jury, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail : le professeur DAHEL C. C., en qualité de présidente et valeureuse enseignante d'INATAA–UFMC1. Je la remercie pour l'honneur qu'elle m'a fait, en acceptant de présider la commission d'évaluation de cette thèse. Mes profondes reconnaissances s'adressent à mes enseignants : Pr. BOUDJELLAL A. et Dr. KRID-BENYAHIA F. A. enseignants à l'INATAA–UFMC1, Pr. BOUDJENAH S. de l'université Kasdi Merbah à Ouargla et Pr. ZALLAGUI A. de l'université Larbi Ben M'hidi à Oum El-Bouaghi. C'est un immense privilège que de voir mon travail évalué par des chercheurs reconnus, au niveau international. Soyez assurés, chers professeurs, de mon estime et de ma profonde gratitude.

Cette thèse n'aurait jamais été entreprise, ni achevée, sans la patiente assistance, les conseils et les orientations, et les méticuleux contrôles et suivis, que m'a prodigué ma promotrice le Pr. BECILA-HIOUAL S. Je lui témoigne ici, ma gratitude et ma reconnaissance. Merci de m'avoir prodigué tous ces conseils, ma reconnaissance s'étend à la confiance qu'elle m'a témoignée et à l'autonomie qu'elle m'a très souvent octroyée, pour l'exécution de ces recherches.

En quelques mots, toute ma reconnaissance s'adresse au Dr. Mohammed GAGAOUA, celui qui m'a initié à la recherche, sur la protéomique et la science des viandes et des produits carnés. Il m'a mis sous ses ailes et m'a incité à grandir et à évoluer, dans le domaine de la recherche scientifique. Grâce à son soutien, je suis co-auteure, dans de valeureuses publications. Je le remercie pour sa confiance, son encouragement, son aide scientifique et le temps précieux qu'il m'a accordés, pour mener à bien, mon travail. La confiance que vous m'avez accordée est l'une des plus rares. Je vous remercie, pour m'avoir formé sur la technique TTP que j'ai utilisée, dans mon sujet de thèse. Ce travail a vu le jour, grâce à vous. Nul remerciement ne saura exprimer la grâce de votre aide et de votre soutien.

A mes chers parents, qui ont tant sacrifié, pour la réussite de mes études, nul remerciement ne saura manifester la grâce de votre accompagnement et votre aide. A mon mari BOULOUEH Anwar, qui m'a toujours soutenu et encouragé, et surtout supporté mes caprices et mes états d'âme.

Que le Dr. Thierry ASTRUC, directeur de recherche au sein de l'unité Qualité des produits animaux (QuaPA), Auvergne-Rhône-Alpes -Theix, 63122 de France, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de

## Remerciements

m'avoir apporté son expérience. Je tiens aussi à remercier tout le personnel de son département, plus spécialement Annie VENIEN et Olivier LOISON pour leurs compétences et leurs professionnalismes.

Merci à M. ARFAOUI Saleh, fournisseur en poules pondeuses ainsi que le personnel du poulailler qui ne nous ont pas privés d'aide et d'informations, ainsi que le boucher qualifié, M. BENSARI Ibrahim, pour l'approvisionnement en viande.

Mes sincères reconnaissances vont au Pr. Abdelghani BOUDJELLAL, directeur de l'Institut de Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires., et chef de l'équipe marqueur des qualités des viandes (MaQuaV), du laboratoire des Biotechnologies et Qualité des Aliments (BioQuAl), point de départ de mon parcours atypique. Merci de m'avoir toujours épaulé avec beaucoup de gentillesse, de disponibilité et d'encouragement.

Merci également, à l'ensemble des membres de l'équipe MaQuaV à INATAA, Dr. Hiba Rima BOUDCHICHA, Dr. Anis CHIKHOUN, Mme Ibtissem SANAH et Yasmine BOUDIDA, pour leur présence et leur aide. Je suis particulièrement sensible à la confiance, qu'ils m'ont témoignée et aux excellentes conditions du travail qu'ils m'ont assurées.

Je remercie tous mes brillants étudiants que j'ai encadrés, durant toutes ces années et qui ont participé à la réalisation de plusieurs manipes. Je cite : AYAD Mounir, BOUROUIS Imen, BOUNEB Nahla, EL ACHI Sara, SALAH AYECH Nouhad, JAMES Jhon, SENANI Lamia, SINACER Katar-Ennada, BESSOU Adam Borhan Eddine, TOUATI Sana, LOUAHEM Bisma Amel, CHETTIBI Hala, BOUKHCHIMA Roumaissa, FENCHOUC Chayma et très spécialement, à mon étudiant SAYAH Taha Mensour qui, maintenant, est devenu doctorant, au sein de notre équipe, sur qui j'ai toujours compté. Je lui souhaite de réussir dans sa carrière scientifique.

Enfin, je voudrais remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées et qui ont contribué, de loin ou de près à l'avancement de ma thèse, mes enseignants et mes collègues, qui ont participé à notre formation, durant notre parcours universitaire, le personnel administratif et technique de l'INATAA, pour la dimension humaine inestimable qu'ils ont manifestée à mon égard. Une pensée très particulière au Dr. Djamel TRAD KHOUDJA, un des valeureux et très estimé enseignant de l'INATAA, qui m'a toujours encouragé dans mes études. Que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.

## *Dédicace*

*Je dédie cette modeste thèse accompagné d'un profond amour à :*

*Mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement continu, leur aide, en témoigne de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices*

*A ma mère, celle qui ma arrosé de tendresse et d'espoir à la source d'amour incessible, à ma mère aux sentiments fragiles qui ma bénie par ces prière.*

*A mon respectueux père, mon support dans ma vie, qui m'a appris à persévérer, m'a supporté et ma dirigé vers la réussite. Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point remercier comme il se doit, ton affection me couvre, ta bien vaillance me guide et ta présence à mes cotés à toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Tu as toujours été à mes coté pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*Je vous aime très fort*



---

## Sommaire

### Liste des abréviations

### Liste des figures

### Liste des tableaux

### Introduction .....01

## Synthèse bibliographique

### 1. Définition de la tendreté .....03

### 2. Importance de la tendreté pour le consommateur .....03

### 3. Évolution de la tendreté .....03

### 4. Méthodes de mesure de la tendreté .....04

#### 4.1. Appréciation sensorielle .....04

#### 4.2. Mesure instrumentale de tendreté .....06

#### 4.3. Mesure indirecte de tendreté .....07

### 5. Causes de la variabilité de la tendreté de la viande .....07

#### 5.1. Facteurs biologiques .....07

#### 5.2. Facteurs technologiques .....09

### 6. Attendrissement naturel de la viande .....11

### 7. Attendrissement artificiel de la viande .....13

#### 7.1. Attendrissements physique et mécanique .....13

#### 7.2. Attendrissement chimique .....13

#### 7.3. Attendrissement enzymatique .....15

#### 7.4. Effets de l'utilisation des enzymes sur la texture de la viande .....16

### 8. Enzymes appliquées pour l'attendrissement artificiel de la viande .....17

#### 8.1. Papaine .....20

##### 8.1.1. Description de la plante .....20

##### 8.1.2. Caractéristiques structural et fonctionnel de la papaine .....21

##### 8.1.3. Mécanisme d'action de papaine .....23

##### 8.1.4. Utilisation de la papaye et la papaine .....24

#### 8.2. Ficine .....25

##### 8.2.1. Description de la plante de figuier .....25

##### 8.2.2. Caractéristique et structure de la ficine .....27

##### 8.2.3. Mécanisme d'action de la ficine .....28

##### 8.2.4. Utilisation de la figue et de la ficine .....29

<b>8.3.Pepsine</b> .....	29
8.3.1. Définition.....	29
8.3.2. Activation du pepsinogène en pepsine.....	30
8.3.3. Caractéristiques et structure de la pepsine .....	31
8.3.4. Types de pepsine.....	32
8.3.5. Sources de pepsine .....	33
8.3.6. Utilisation de la pepsine .....	36
<b>8. Extraction et purification des protéases utilisées dans l'attendrissement des viandes</b> ....	38
9.1. Processus de fractionnement en trois phases .....	39
9.2. Effet du sulfate d'ammonium.....	40
9.3. Effet du t-butanol .....	40
9.4. Effet du pH .....	41
9.5. Effet de la température .....	42
9.6. Avantages et inconvénients du système TPP.....	43

## Partie expérimentale

<b>Préambule</b> .....	45
------------------------	----

### Chapitre I: Matériels et méthodes

<b>I. Extraction, purification, caractérisation et application de la papaïne</b> .....	
1. Extraction de la papaïne .....	46
1.1. Matière biologique.....	46
1.2. Préparation de l'extrait brut de papaïne .....	47
2. Purification de la papaïne par le système TPP.....	48
2.1. Mise en place du système TPP .....	48
2.2. Vérification de la pureté de la papaïne.....	49
2.2.1. Électrophorèse monodimensionnelle.....	49
2.2.2. Électrophorèse bidimensionnelle et détermination de pI.....	51
3. Caractérisation de la papaïne purifiée .....	51
3.1. Mesure de l'activité protéolytique de la papaïne .....	51
3.1.1. Dosage des protéines par la méthode Bradford .....	53
3.2. Paramètres cinétiques de la papaïne .....	53
3.3. Effet de la température et du pH sur l'activité et la stabilité de la papaïne .....	53
3.4. Effet des inhibiteurs et des ions métalliques sur l'activité de la papaïne .....	54
3.5. Effet du calcium sur l'activité de la papaïne .....	54

---

3.6. Effet du stockage sur la stabilité de la papaïne .....	54
4. Application de la papaïne sur la viande de dromadaire .....	54
4.1. Matériel biologique .....	55
4.2. Préparation des échantillons de viande .....	55
4.3. Traitements appliqués pour l'attendrissement artificiel .....	56
4.4. Mise en évidence de l'effet attendrisseur de la papaïne .....	58
4.4.1. Mesure instrumentale de tendreté par pénétromètre .....	58
4.4.2. Mesure de pH.....	59
4.4.3. Capacité de rétention d'eau et pourcentage d'eau reléguée .....	60
4.4.4. Pertes en eau à la cuisson .....	61
4.4.5. Indice de fragmentation myofibrillaire .....	62
4.5. Analyses statistiques .....	63
<b>II. Extraction, purification, caractérisation et application de la pepsine .....</b>	<b>64</b>
1. Extraction de la pepsine de poulet .....	64
1.1.Échantillonnage de proventricules de poulet.....	64
1.2. Extraction de pepsinogène à partir de proventricules de poulet .....	65
1.3. Activation du pepsinogène en pepsine .....	66
2. Purification de la pepsine par le système TPP.....	68
2.1. Mise au point du protocole de purification de la pepsine par le système TPP .....	68
2.2. Vérification de la pureté de la pepsine .....	68
2.2.1. Analyse électrophorétique (glycine SDS-PAGE) .....	68
2.2.2. Zymographie.....	69
3. Caractérisation de la pepsine purifiée .....	69
3.1. Détermination de l'activité protéolytique de la pepsine .....	69
3.1.1. Détermination de la teneur en protéines .....	70
3.2. Étude des constantes cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ ) .....	70
3.3. Étude de l'effet de température sur l'activité et la stabilité de la pepsine .....	71
3.4. Étude de l'effet de pH sur l'activité et la stabilité de la pepsine .....	71
3.5. Étude de l'effet des ions métalliques sur l'activité de la pepsine .....	71
3.6. Étude de l'effet des inhibiteurs sur l'activité de la pepsine .....	71
3.7. Effet du stockage sur la stabilité de la pepsine .....	71
4. Application de la pepsine purifiée sur la viande de poules. ....	72
4.1. Matériel biologique .....	72
4.2. Préparation des échantillons de viande .....	73

---

4.3. Traitements appliqués pour l'attendrissement enzymatique artificiel .....	73
4.4. Mise en évidence de l'effet attendrisseur de la pepsine .....	75
4.4.1. Peptides solubles dans l'acide trichloroacétique.....	75
4.4.2. Protéines solubles dans l'eau et le sel.....	75
4.4.3. Hydrolyse des protéines myofibrillaires .....	76
4.4.4. Caractérisation électrophorétique des protéines myofibrillaires .....	76
4.5. Analyse statistique .....	77
<b>III. Extraction et purification de la ficine .....</b>	<b>78</b>
1. Extraction de la ficine à partir de <i>Ficus carica</i> .....	78
1.1. Collecte du latex.....	78
1.2. Préparation de l'extrait brute de ficine .....	78
2. Purification de la ficine par le système TPP .....	78
<b>IV. Études de l'effet des protéases purifiées sur la macro et la microstructure de la viande bovine .....</b>	<b>80</b>
1. Matériel biologique .....	80
2. Traitements appliqués pour l'attendrissement enzymatique artificiel .....	81
3. Analyse en microscopie optique .....	83
3.1. Cryofixation.....	83
3.2. Réalisation des coupes.....	84
3.3. Colorations histologiques .....	84
3.3.1. Coloration avec HES (Hématoxyline Eosine Safran) .....	85
3.3.2. Coloration du collagène avec du Rouge Sirius.....	85
3.4. Marquage immunohistologique .....	86
3.5. Acquisition d'images .....	87
4. Analyse moléculaire : la microspectroscopie infrarouge .....	87
4.1. Acquisition de spectre .....	87
4.2. Prétraitements des spectres.....	88
5. Analyses statistiques .....	89
<b>Chapitre II : Résultats et discussion</b>	
<b>I. Papaïne .....</b>	<b>94</b>
1. Résultat de l'optimisation du protocole de purification de la papaïne .....	94
1.1. Résultats de l'effet de la saturation en sulfate d'ammonium.....	94
1.2. Résultats de l'effet du rapport l'extrait brut :t-BuOH.....	95
1.3. Résultats de l'effet du pH.....	96

---

1.4. Résultats de l'effet de la température.....	98
1.5.Évaluation globale du profil de purification de la papaïne par le système TPP .....	99
2. Caractérisation de la papaïne purifiée .....	103
2.1.Vérification de la pureté des étapes de la purification par SDS-PAGE.....	103
2.2. Résultats de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la papaïne .....	105
2.3. Résultats de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité de la papaïne purifiée.....	107
2.4. Résultats de l'effet de divers effecteurs sur l'activité de la papaïne purifiée.....	108
2.5.Résultats des paramètres cinétiques de la papaïne purifiée.....	110
2.6. Résultats de la stabilité au stockage à différentes températures .....	111
3. Application de la papaïne sur la viande de dromadaire .....	112
3.1. Effets du traitement d'attendrissement sur la profondeur de pénétration .....	112
3.2. Effets du traitement d'attendrissement sur la capacité de rétention d'eau et les pertes en eau .....	116
3.3. Relation entre les paramètres par analyse en composantes principales .....	121
3.4. Appréciation visuelle des échantillons traités.....	122
<b>II. Pepsine</b> .....	124
1. Résultats de l'optimisation du protocole de purification de la pepsine .....	124
1.1. Résultats de l'effet de la saturation en Sulfate d'ammonium.....	125
1.2. Résultats de l'effet du rapport l'extrait brut :t-BuOH.....	126
1.3. Résultats de l'effet du pH.....	127
1.4. Évaluation globale du profil de purification de la pepsine par le système TPP .....	128
2. Caractérisation de la pepsine purifiée .....	132
2.1.Vérification de la pureté des étapes de la purification par SDS-PAGE.....	132
2.2.Résultats de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la pepsine purifiée..	141
2.3. Résultats de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité de la pepsine purifiée .....	142
2.4. Résultats de l'effet de divers effecteurs sur l'activité de la pepsine partitionnée .....	144
2.5. Résultats des paramètres cinétiques de la pepsine purifiée .....	146
2.6. Résultats de la stabilité au stockage à différentes températures .....	147
3. Application de la pepsine sur la viande de poulet.....	148
3.1. Effet de traitement d'attendrissement sur les différents paramètres étudiés .....	148
3.1.1. Effet sur le pH .....	150
3.1.2. Effet sur l'indice de fragmentation myofibrillaire.....	150
3.1.3. Effet sur capacité de rétention d'eau et le pourcentage d'eau reléguée .....	151
3.1.4. Effet sur les pertes à la cuisson.....	153

---

3.1.5. Solubilité des protéines .....	155
3.1.6. Hydrolyse des protéines myofibrillaires .....	159
3.1.7. Visualisation des relations entre les paramètres étudiés .....	159
3.2. Profil électrophorétique de la dégradation des protéines myofibrillaires.....	161
<b>III. Ficine</b> .....	164
1. Résultats de la purification de la ficine par le système TPP .....	164
<b>IV. Études de l'effet des protéases purifiées sur la macro et la microstructure de la viande bovine</b> .....	165
1. Mise en évidence de l'action des plantes protéases sur la macro-structure de la viande par histologique et immunohistologique .....	165
1.1.Pénétration des protéases.....	168
1.2.Effet de la ficine .....	170
1.3.Effet de la papaine.....	171
1.4. Effet du mix .....	172
2. Mise en évidence de l'action des protéases végétales sur la micro-structure de la viande par microspectroscopie infrarouge FT-IR .....	173
3. Mise en évidence de l'action la pepsine sur la macro & microstructure de la viande par histologique et immunohistologique et FT-IR.....	177
<b>Conclusion générale</b> .....	179
<b>Références bibliographiques</b> .....	182
<b>Liste de publications</b> .....	226
<b>Annexes</b>	

### Liste des abréviations

- AC** : *Affinity Chromatography* (Chromatographie d'affinité) ;
- AP**: Aspartylprotéase;
- AS** : Sulfate d'ammonium;
- ATP** : Adenosine triphosphate;
- ATPS** : *Aqueous Two-Phase Systems* (Système à deux phases aqueuse) ;
- BSA** : Bovin Serum albumine;
- CLM** : Chaînes lourdes de myosine ;
- CRE** : Capacité de rétention d'eau ;
- DO** : Densité optique ;
- DTT** : Dithiothréitol ;
- EAE**: *enzyme-assisted extraction* (Extraction enzymatique assisté);
- EC** : *Enzyme commission* commission d'enzymes :
- EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique ;
- EGTA** : Acide Ethylène Glycol-bis Tétracétique ;
- FTIR** *Fourier transform infrared*;
- GFC**: *Gel Filtration Chromatography* (Chromatographie par gel de filtration) ;
- GRAS** : *generally recognized as safe* en français généralement reconnus comme sûrs ;
- IEC**: *Ion Exchange Chromatography* (Chromatographie échangeuse d'ion) ;
- IEF** : *Isoelectric focusing* (Focalisation isoélectrique) ;
- IFM** Indice de fragmentation myofibrillaire ;
- IPG** : *Immobilized pH gradient* (Gradient de pH immobilisé) ;
- J**: Joule;
- kDa** Kilo Dalton;
- MAE**: Extraction par microonde assisté (*microwave-assisted extraction*) ;
- MCA** : *Milk Clotting Activity* (Activité coagulante);
- MCE** :  $\beta$ -mercapto-éthanol;
- MM** : Masse molaire ;
- NF** : Nanofiltration ;
- OCT** : *Optimal cutting temperature* Température de coupe optimale ;
- PAGE** : Polyacrylamide gel Electrophoresis;
- PC** : Pertes de cuisson ;

**PCMB** : P-chloro mercuri benzonate;

**PER** pourcentage d'eau reléguée ;

**PG**: Pepsinogène ;

**PLE** : *Pressurized liquid extraction* (Extraction de liquide sous pression);

**PM** : *post mortem* ;

**PMSF** : Florure de phényl méthyl sulphonyl ;

**Ppm** : La partie par million (le ppm), terme beaucoup utilisé en sciences (toxicologie, formulation, chimie, métallurgie, électronique, géochimie, etc. ), est la fraction valant  $10^{-6}$ , c'est-à-dire un millionième. On utilise surtout le ppm pour exprimer une fraction massique ( $1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg/kg}$  ) ;

**rpm**: Tour par minute (*round per minute*);

**SDS** : Sodium Dodécyl Sulfate

**SE**: *Solvent extraction* (Extraction par solvant ) ;

**SFE**: *Supercritical fluid extraction* (Extraction de fluide supercritique);

**SWE** : *Subcritical water extraction* (Extraction d'eau sous-critique) ;

**TCA**: *Tri Chloroacetic Acid*;

**TPP** : Three phase partitionning

**TEMED** : N, N , N',N'-tétraméthyléthylène diamine ;

**U**:  $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$  ;

**UAE**: *Ultrasonic-assisted extraction* (Extraction ultrasonique assisté) ;

**UF** : Ultrafiltration ;



---

**Liste de figures**

<b>Figure 01 :</b> Différentes phases de transformation du muscle en viande	<b>04</b>
<b>Figure 02 :</b> Arbre et fruit, Latex, feuilles, Graines et Fleurs de <i>Carica papaya</i> .	<b>20</b>
<b>Figure03:</b> Représentation des structures primaire et tridimensionnelle de la papaine.	<b>22</b>
<b>Figure 04 :</b> Mécanisme enzymatique de l'hydrolyse protéique par les protéases à cystéine.	<b>23</b>
<b>Figure 05 :</b> Arbre et fruit, Latex et feuilles, de <i>Ficus carica</i> .	<b>26</b>
<b>Figure 06 :</b> Structure tertiaire du pepsinogène de porc.	<b>31</b>
<b>Figure 07 :</b> Appareil digestif chez le poulet	<b>36</b>
<b>Figure 08:</b> Représentation graphique à barres du nombre de travaux associés sur le système de répartition en trois phases publiée, au cours des 20 dernières années.	<b>39</b>
<b>Figure 09 :</b> Représentation du système de répartition en trois phases TPP.	<b>39</b>
<b>Figure 10 :</b> Base de partitionnement des macromolécules sous le système de répartition en trois phases.	<b>42</b>
<b>Figure 11:</b> Collecte du latex frais à partir de fruits de papaye ( <i>Carica papaya</i> )	<b>47</b>
<b>Figure 12:</b> Protocole résumant les étapes clés de l'extraction de la papaine à partir du fruit non mûr du papayer ( <i>Carica papaya</i> )	<b>48</b>
<b>Figure 13:</b> Diagramme résumant les étapes du protocole adopté pour la mesure de l'activité protéolytique de la papaine	<b>52</b>
<b>Figure 14:</b> Anatomie des muscles du dromadaire présentant la position des muscles <i>longissimus</i> et <i>semi tendinosus</i> .	<b>55</b>
<b>Figure 15:</b> Protocole expérimental utilisé pour l'étude des différents traitements d'attendrissement artificiel sur les caractéristiques biochimiques de la viande de dromadaire	<b>57</b>
<b>Figure 16:</b> Image montrant le principe d'utilisation du pénétromètre sur un morceau de viande.	<b>58</b>
<b>Figure 17 :</b> Illustration de la localisation de la mesure au pénétromètre	<b>58</b>
<b>Figure 18:</b> Etapes de mesure de la capacité de rétention d'eau et pourcentage d'eau reléguée	<b>61</b>

---

<b>Figure 19</b> : Proventricule de poulet.	<b>64</b>
<b>Figure 20</b> : Diagramme résumant les différentes étapes entreprises afin d'extraire et d'activer la pepsine à partir de proventricules de poulet	<b>67</b>
<b>Figure 21</b> : Etapes de préparation des échantillons de viande pour traitement.	<b>73</b>
<b>Figure 22</b> : Différents traitements d'attendrissement enzymatique artificiel effectués	<b>73</b>
<b>Figure 23</b> : Images représentant les traitements d'attendrissement enzymatique appliqué	<b>74</b>
<b>Figure 24</b> : Diagramme représentant les étapes d'extraction et de purification de la ficine	<b>79</b>
<b>Figure 25</b> : Traitement d'attendrissement par injection	<b>82</b>
<b>Figure 26</b> : Étapes de préparation et application de protéases sur le muscle semi tendineux de la vache charolaise	<b>83</b>
<b>Figure 27</b> : Effet de la concentration de sel de sulfate d'ammonium sur le rendement et le facteur de purification de la papaïne par le système TPP	<b>95</b>
<b>Figure 28</b> : Effet du rapport extrait brut : t-butanol sur le rendement et le facteur de purification de la papaïne par le système TPP	<b>96</b>
<b>Figure 29</b> : Effet du pH sur le rendement et le facteur de purification de la papaïne par le système TPP	<b>97</b>
<b>Figure 30</b> : Effet de la température sur le rendement et le facteur de purification de la papaïne par le système TPP	<b>98</b>
<b>Figure.31</b> : Structure tridimensionnelle de la papaïne.	<b>99</b>
<b>Figure 32</b> : Protocole optimisé de la purification de la papaïne du latex de papaye par le système de répartition en trois phases.	<b>100</b>
<b>Figure 33</b> . Fractionnement en trois phases (TPP) et analyse du poids moléculaire et de la pureté de la papaïne	<b>103</b>
<b>Figure 34</b> : Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la papaïne purifiée par le système TPP	<b>105</b>
<b>Figure 35</b> : Demi-vie de la papaïne du latex de <i>carica papaya</i> purifié par le système TPP.	<b>106</b>
<b>Figure 36</b> : Effet de la température sur la stabilité de la papaïne purifiée récupérée à différents temps	<b>106</b>
<b>Figure 37</b> : Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la papaïne purifiée par le système TPP	<b>107</b>

---

<b>Figure 38:</b> Effet pH sur la stabilité de la papaïne purifiée récupérée à différents temps	<b>108</b>
<b>Figure 39 :</b> Effet des ions métalliques sur l'activité et la stabilité de la papaïne purifiée par le système TPP.	<b>109</b>
<b>Figure 40 :</b> Effet des inhibiteurs sur l'activité et la stabilité de la papaïne purifiée par le système TPP	<b>109</b>
<b>Figure 41:</b> Cinétique (Courbes de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk) de la papaïne purifiée.	<b>110</b>
<b>Figure 42:</b> Effet de la température de stockage sur l'activité protéolytique de la papaïne.	<b>111</b>
<b>Figure 43:</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique et/ou physique sur la profondeur de pénétration mesurée par pénétromètre sur le muscle <i>Longissimus</i> .	<b>113</b>
<b>Figure 44:</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique et/ou physique, sur la profondeur de pénétration mesurée par pénétromètre sur le muscle <i>Semi tendinosus</i> .	<b>114</b>
<b>Figure 45:</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique et/ou physique sur la profondeur de pénétration, mesurée par pénétromètre, des deux muscles <i>Longissimus thorasis</i> et <i>Semi tendinosus</i> .	<b>114</b>
<b>Figure 46:</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique et/ou physique sur la capacité de rétention d'eau (%) sur le muscle <i>Longissimus</i> du dromadaire	<b>117</b>
<b>Figure 47:</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique et/ou physique sur la capacité de rétention d'eau (%) sur le muscle <i>Semitendinosus</i> du dromadaire	<b>118</b>
<b>Figure 48:</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique et/ou physique sur la capacité de rétention d'eau des deux muscles <i>Longissimus thorasis</i> et <i>Semi tendinosus</i> .	<b>118</b>
<b>Figure 49:</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique et/ou physique sur le pourcentage d'eau reléguée du muscle <i>Longissimus thorasis Semi tendinosus</i> .	<b>119</b>
<b>Figure 50:</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique et/ou physique sur A) les pertes en eau à la cuisson du muscle <i>Longissimus thorasis</i> et <i>Semi tendinosus</i> .	<b>120</b>
<b>Figure 51:</b> Images représentant des morceaux de viande traitée par la papaïne avant et après cuisson 1h à 80°C.	<b>121</b>
<b>Figure 52 :</b> Analyse en composantes principales montrant la projection des différents traitements pour les deux muscles ( <i>Longissimus</i> et <i>Semi tendinosus</i> ) en fonction des variables physico-chimiques étudiées	<b>122</b>

---

<b>Figure 53:</b> Images des différents morceaux pour chaque traitement d'attendrissement artificiel effectué.	<b>124</b>
<b>Figure 54:</b> Effet de la concentration de sel de sulfate d'ammonium sur le rendement et le facteur de purification de la pepsine de proventricules de poulet par le système TPP.	<b>125</b>
<b>Figure 55:</b> Effet du rapport extrait brut : t-butanol sur le rendement et le facteur de purification de la pepsine de proventricules de poulet par le système TPP.	<b>127</b>
<b>Figure 56:</b> Effet du pH sur le rendement et le facteur de purification de la pepsine de proventricules de poulet par le système TPP.	<b>128</b>
<b>Figure 57:</b> Représentation des différentes étapes employées pour extraire, activer et purifier la pepsine à partir de proventricules de poulet en utilisant un système de partitionnement en trois phases.	<b>129</b>
<b>Figure 58 :</b> Fractionnement en trois phases (TPP) et analyse du poids moléculaire et de la pureté de la pepsine récupérée à partir de proventricules de poulet.	<b>132</b>
<b>Figure 59 :</b> Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la pepsine de proventricules de poulet par le système TPP	<b>141</b>
<b>Figure 60 :</b> Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la pepsine de proventricules de poulet purifiée par le système TPP	<b>143</b>
<b>Figure 61 :</b> Effet des ions sur l'activité et la stabilité de la pepsine de proventricules de poulet purifiée par le système TPP	<b>144</b>
<b>Figure 62 :</b> Effet des inhibiteurs sur l'activité et la stabilité de la pepsine de proventricules de poulet purifiée par le système TPP	<b>145</b>
<b>Figure 63:</b> Cinétique (Courbes de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk) de la pepsine purifiée à partir de proventricules de poulet en utilisant le système TPP.	<b>146</b>
<b>Figure 64:</b> Effet de la température de stockage sur l'activité protéolytique de la pepsine de proventricules de poulet purifiée par le système TPP.	<b>147</b>
<b>Figure 65 :</b> Courbe de l'effet de la dilution sur l'activité protéolytique de pepsine purifiée	<b>148</b>
<b>Figure 66 :</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique par la pepsine sur l'indice de fragmentation myofibrillaire sur le muscle <i>pectoral</i> du poulet.	<b>151</b>
<b>Figure 67 :</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique par la pepsine, sur la capacité de rétention d'eau (%) sur le muscle pectorale du poulet.	<b>152</b>

---

<b>Figure 68 :</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique par la pepsine sur les pertes en eau reléguée (%) sur le muscle pectoral du poulet	<b>153</b>
<b>Figure 69 :</b> Impact des traitements d'attendrissement enzymatique par la pepsine sur la perte à la cuisson du muscle pectoral du poulet	<b>154</b>
<b>Figure 70:</b> Teneur en protéines solubles du TCA dans les échantillons de viande traités et non traités, exprimée en mg par g de viande.	<b>156</b>
<b>Figure 71:</b> Teneur en protéines solubles dans l'eau dans les échantillons de viande traités et non traités, exprimée en mg par g de viande.	<b>158</b>
<b>Figure 72:</b> Teneur en protéines solubles dans le sel dans les échantillons de viande traités et non traités, exprimée en mg par g de viande.	<b>158</b>
<b>Figure 73 :</b> Effets relatifs de la pepsine et la papaïne purifiées par le système TPP sur les protéines myofibrillaires	<b>159</b>
<b>Figure 74:</b> Analyse en composantes principales: Projection des variables étudiées dans les deux premiers axes.	<b>160</b>
<b>Figure 75:</b> Projection des données de qualité de la viande des sept traitements étudiés dans le plan défini par les deux composantes principales	<b>161</b>
<b>Figure 76 :</b> Gel de glycine SDS-PAGE des protéines myofibrillaires du muscle pectoral de poulet après traitement enzymatique par différentes méthodes.	<b>162</b>
<b>Figure 77 :</b> Coupes (magnification x4) des échantillons de viande traités par la ficine, papaïne et le mélange équivalent de la ficine et la papaïne avec trois modes d'introduction (Immersion, pulvérisation et injection) colorées à l'HES, RS et marquage immunologique par des anticorps de la laminine, le collagène et la myosine.	<b>166</b>
<b>Figure 78 :</b> Analyse en composantes principales montrant la projection des différents traitements d'attendrissement pour les trois solutions enzymatiques, (papaïne, ficine et le mix), en fonction de leur effet sur les fibres musculaires.	<b>167</b>
<b>Figure 79:</b> Effet de la méthode d'attendrissement et la protéase appliquée sur les constituants musculaires.	<b>168</b>
<b>Figure 80:</b> Épaisseur de pénétration de l'enzyme en fonction de la méthode d'attendrissement et de la protéase utilisée	<b>169</b>
<b>Figure 81:</b> Effet de la ficine sur les tissus musculaires par histochimie et immunohistofluorescence. .	<b>170</b>

- 
- Figure 82:** Effet de la papaïne sur les tissus musculaires par histochimie et immunohistofluorescence. **171**
- Figure 83:** Effet du mélange (1: 1, ficine: papaïne) sur les tissus musculaires par histochimie et immunohistofluorescence. **173**
- Figure 84:** Image des cartographies et des spectres acquis à l'aide du logiciel OMNIC Picta des coupes des échantillons traités ou pas par les protéases, avec les différents traitements d'attendrissement artificiel. **174**
- Figure 85 :** Analyse en composantes principales montrant la projection des différentes solutions enzymatiques pour les trois traitements d'attendrissement enzymatique artificiel en fonction de leur effet sur les fibres musculaires et le tissu conjonctif **175**
- Figure 86 :** Coupes des échantillons de viande traités par la pepsine de proventricules de poulet par injection colorées à l'HES, RS et marquage immunologique par des anticorps de la laminine, le collagène et la myosine. **177**
- Figure 87 :** Cartographies des coupes obtenues après traitement d'attendrissement par injection de la pepsine. **178**
- Figure 88 :** Analyse en composantes principales montrant la projection des zones de contact pour le traitement d'attendrissement enzymatique artificiel par injection de la pepsine de proventricules de poulet en fonction de leur effet sur les fibres musculaires et le tissu conjonctif **178**

---

**Liste de tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Forces intervenant dans la mesure instrumentale de la viande	<b>07</b>
<b>Tableau 02</b> : Synthèse des résultats antérieurs sur les protéases utilisées dans l'attendrissement de la viande.	<b>18</b>
<b>Tableau 03</b> : Protéases à cystéine du latex de <i>Carica papaya</i> (Feijoo-Siota & Villa 2011).	<b>22</b>
<b>Tableau 04</b> : Comparaison des paramètres optimaux d'activité températures et pH de la ficine dans la littérature	<b>28</b>
<b>Tableau 05</b> : Paramètre et conditions appliqués pour l'attendrissement enzymatique	<b>89</b>
<b>Tableau 06</b> : Profil de purification global de la papaïne du latex de <i>C. papaya</i> par le système TPP	<b>101</b>
<b>Tableau 07</b> : Comparaison de plusieurs protocoles d'extraction et de purification de la papaïne à partir de diverses parties de la papaye	<b>102</b>
<b>Tableau 08</b> : Caractéristiques de certaines protéases à cystéine extraite de plantes	<b>104</b>
<b>Tableau 09</b> : Propriétés des enzymes (protéase à cystéine) d'attendrissement d'origine végétales (Payne 2009).	<b>115</b>
<b>Tableau 10</b> : Comparaison entre les différents paramètres de mise en place de la purification par le système TPP, de différentes enzymes d'origines variées	<b>126</b>
<b>Tableau 11</b> : Profil de purification global de la pepsine de proventricules de poulet par le système TPP	<b>130</b>
<b>Tableau 12</b> : Comparaison de plusieurs protocoles d'extraction et de purification de la pepsine à partir de diverses espèces aviaires	<b>131</b>
<b>Tableau 13</b> : Principales caractéristiques de pepsines extraites et purifiées d'origines diverses.	<b>134</b>
<b>Tableau 14</b> : Analyse de variance sur les paramètres mécaniques et biochimiques des trois muscles étudiés	<b>149</b>
<b>Tableau 15</b> : Effet du traitement d'attendrissement par la pepsine sur les protéines solubles dans le TCA, l'eau et le sel.	<b>155</b>

# Introduction



Les qualités sensorielles des viandes dépendent de nombreux facteurs, qu'ils soient liés à l'animal (espèce, race, âge, sexe, génotype), au mode d'élevage (vitesse de croissance, alimentation) ou aux facteurs technologiques *post mortem* (vitesse et intensité du refroidissement, stimulation électrique). Ils induisent des modifications dans les caractéristiques biologiques du muscle, et par conséquent, des variations dans la flaveur, la jutosité, la couleur et la tendreté des viandes (Istrati 2012, Ouali *et al.* 2013).

Il va sans dire que la tendreté est la qualité organoleptique la plus recherchée par les consommateurs et joue un rôle majeur dans la commercialisation des viandes rouges (Mancini & Hunt 2005). Plusieurs études ont montré que les consommateurs la considèrent comme un critère d'acceptabilité du produit, étant prêts à payer plus cher, quand la tendreté est garantie (Bekhit *et al.* 2014a). En effet, la variabilité de cette qualité, et la non maîtrise de la qualité finale de la viande, par les acteurs de la filière, constitue un motif récurrent d'insatisfaction des consommateurs, (Gicquel *et al.* 2016) et demeure une préoccupation, pour l'industrie des viandes rouges (Koochmaraie & Geesink, 2006 ; Istrati 2012).

Conscients de ce problème, les acteurs de la filière ont développé des stratégies pour améliorer cette qualité, essentiellement pour les viandes rouges et les viandes issues d'animaux de réforme, en se basant sur plusieurs investigations à savoir : des méthodes d'attendrissement artificiel, par l'utilisation de moyens mécaniques (Garcia & Woodall 2001 ; Bowker *et al.* 2011), physiques (Bajovic *et al.* 2012; Barekat & Soltanizadeh 2017), chimiques (Deyonge-Freeman *et al.* 2000; Brooks 2007), ou enzymatiques (Bhaskar *et al.* 2006; Akpan & Omojola 2015). Plusieurs travaux de recherche décrivent les connaissances et les processus d'attendrissement artificiel, par l'utilisation d'enzymes protéolytiques, issues de différentes sources (animales, végétales, et microbiennes) (Arshad *et al.* 2016; Bhat *et al.* 2018). Les enzymes les plus étudiées et utilisées comme attendrisseurs de la viande sont la papaïne extraite du latex de la papaye, la bromélaïne extraite de l'ananas, et la ficine extraite du latex de figuiers (Gerelt *et al.* 2000 ; Ashie *et al.* 2002). Ces dernières ont été utilisées largement comme attendrisseurs de la viande. Leurs modes d'action sont basés principalement sur des clivages spécifiques, au niveau des protéines de structure des viandes jugées dures (Bekhit *et al.* 2014b).

Vu que la majorité de ces végétaux ne sont pas disponibles, en Algérie, à l'exception des figuiers, nous avons jugé utile d'étudier, d'autres protéases d'origines animales et végétales et disponibles dans notre pays. Nous avons opté pour la pepsine de poulet, qui est une aspartyl protéase, extraite à partir des proventricules du poulet considérés comme un sous-produit d'abattage. La pepsine a été largement étudiée et employée, en fromagerie pour

la coagulation du lait (Adoui2007; AL-Mzaien 2007; Krid 2013), et qui servira dans l'attendrissement enzymatique artificiel des viandes, pour la toute première fois. Nous nous sommes penchés sur les protéases d'origine végétale, à savoir la ficine, à partir du latex de figue, très abondante dans les régions du Nord algérien. Par ailleurs, notre pays regorge de variétés de figes. La papaine, reste également une enzyme de référence, pour l'attendrissement des viandes (Ha *et al.* 2012; Akpan & Omojola 2015). Elle est originaire des pays tropicaux, elle est, maintenant, cultivée dans notre pays, à Zéralda et à El oued (Loualiche2020).

Avant de pouvoir appliquer ces protéases sur la viande, des étapes d'extraction et de purification de ces enzymes sont nécessaires, basées principalement sur des méthodes chromatographiques qui utilisent des produits coûteux et restent difficiles à reproduire, à grande échelle (Ward 2009 ; Dennison, 2011 ; Chew *et al.* 2018). Pour notre étude, nous avons opté pour l'utilisation du système de répartition en trois phases (*Three Phase Partitioning*, TPP), mis en place pour la première fois par Rex Lovrien, de l'Université du Minnesota (Tan & Lovrien 1972). C'est une technique simple et rapide utilisée, pour la séparation et la purification des enzymes et des protéines et peut être employée, directement sur la suspension brute, d'un extrait enzymatique ou protéique (Rawdkuen *et al.* 2010, Gagaoua 2018).

Nous avons réussi, au niveau de notre équipe MaQuaV (Marqueurs de la Qualité de la Viande) à établir, un protocole spécifique pour les enzymes utilisées, dans notre étude. Il a fait l'objet de plusieurs publications (Gagaoua *et al.* 2014 ; Gagaoua *et al.* 2015 ; Bouanane-Darenfed *et al.* 2016 ; Gagaoua *et al.* 2016 ; Zerizer *et al.* 2016 ; Ait Kaki El-Hadef El-Okki *et al.* 2017 ; Gagaoua *et al.* 2017). Cette méthode est peu onéreuse et de meilleure productivité (Gagaoua & Hafid 2016 ; Gagaoua 2018).

Cette contribution a pour but, l'étude de protéases susceptibles, d'améliorer la texture de la viandes dure, provenant d'animaux de réformes ou âgés. À ce titre, nous nous sommes fixés trois objectifs :

- Extraire, purifier et caractériser des protéases, à savoir : la pepsine, la papaine et la ficine, par le système de répartition en trois phases ;
- Tester l'effet attendrisseur des protéases purifiées sur la viande dure (poule pondeuse, dromadaire et vache de réforme) ;
- Comparer l'impact des différents modes d'application, des extraits enzymatiques purifiés (marinade, injection, pulvérisation) sur la texture de la viande.

# Synthèse bibliographique

Dans cette revue bibliographique, nous allons nous pencher sur la tendreté de la viande. En premier, nous aborderons les différentes méthodes de mesure de la texture de la viande. Ensuite, nous allons présenter les différents facteurs affectant la qualité de la viande. Par la suite, nous allons exposer les mécanismes impliqués dans l'attendrissement naturel et les techniques d'attendrissement artificiel des viandes. Une autre partie sera réservée aux enzymes appliquées, dans l'attendrissement artificiel de la viande, avec les protéases utilisées, dans notre recherche. Le dernier volet de cette partie portera sur les techniques d'extraction et de purification des protéases attendrissantes. Vu que nous allons purifier nos protéases avec le système de répartition en trois phases TPP, nous allons nous attarder, sur ce système de purification.

### **1. Définition de la tendreté**

La tendreté d'une viande traduit la facilité avec laquelle les fibres musculaires sont coupées, déchirées, broyées, pendant la mastication. La viande qui, sous la dent, offre de la résistance à cette destruction est dure (Dumont 1952). Mais c'est une caractéristique qui présente la variabilité la plus importante et la moins maîtrisée, source d'insatisfaction des consommateurs (Ouali 1991).

### **2. Importance de la tendreté pour le consommateur**

La tendreté est la qualité sensorielle, d'un très grand intérêt pour les consommateurs de viande. Beaucoup d'entre eux classent ce paramètre en premier lieu, parmi tant d'autres, déterminant, ainsi la qualité de la viande. Non seulement, le consommateur exige que la viande soit tendre, mais plus encore, qu'elle soit toujours tendre (Dransfield 1994).

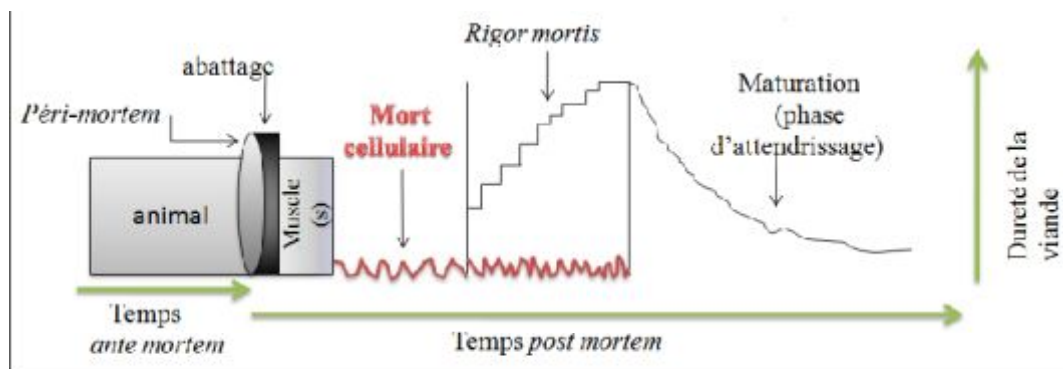
Ils sont demandeurs d'un système de prédiction fiable de la qualité de la viande qui pourrait, avec d'autres facteurs, contribuer à enrayer la chute de la consommation (Verbeke *et al.* 2010), et ils sont prêts à payer plus cher, des pièces de viande de tendreté garantie, tout en ayant des attentes diverses (Boleman *et al.* 1997).

### **3. Évolution de la tendreté**

Les changements *post-mortem*, qui se mettent en place, dans le muscle, et après l'abattage de l'animal ont une importance considérable, dans l'évolution de la tendreté (Figure 01). C'est d'ailleurs au cours de la phase de maturation, que le processus d'attendrissement de la viande se produit (Pouliot 2015). Cette étape se caractérise par d'importantes modifications de la structure et de la nature des composantes musculaires.

L'augmentation de la tendreté de la viande au cours de la maturation est liée à un affaiblissement de la structure myofibrillaire. A l'origine de cet affaiblissement, on trouve une dégradation des protéines de structure et des liaisons intra et intermoléculaires, sous l'action d'enzymes protéolytiques endogènes (caspases, calpaïnes, cathepsines, métalloprotéases...etc.), dont leurs activités sont influencées par le pH de la viande, la température ou les ions calcium. Ces dernières agissent selon des mécanismes différents de par leur site d'action, ou encore leur régulations (ions, inhibiteurs) (Guillemin *et al.* 2009).

En revanche les propriétés thermiques et mécaniques du collagène, principal constituant du tissu conjonctif, ne sont pas affectées par ce processus et définissent de ce fait, une dureté de base, de la viande (Gilka & Hornich 1975).



**Figure 01** : Différentes phases de transformation du muscle en viande (Ouali *et al.* 2006a)

#### 4. Méthodes de mesure de la tendreté

L'étude de la texture sera possible grâce à deux grands types de méthodes : l'évaluation sensorielle (méthode subjective), où l'instrument de mesure est le jury de dégustateurs. Les méthodes instrumentales (méthode objective), dont le principe est soit, une déformation du produit avec mesure des forces mise en jeu (mesure directe), soit un dosage des composés responsables des variations de texture (mesure indirecte).

##### 4.1. Appréciation sensorielle

L'analyse sensorielle ou évaluation sensorielle permet de définir, mesurer, analyser et interpréter les caractéristiques d'un produit perçu, par l'intermédiaire des organes des sens. Certaines normes définissent simplement l'analyse sensorielle comme suit : examen des propriétés organoleptiques d'un produit, par les organes des sens. Dans ce cadre, l'homme, appelé jury ou répondant, est considéré comme instrument de mesure chargé de décrire les sensations qu'il perçoit au cours de l'observation ou de la consommation du produit (Claustrioux 2001).

Ces sensations peuvent être classées, selon trois aspects (Touraille 1986):

- Qualitatif : définit la sensation perçue ;
- Quantitatif : évalue l'intensité de cette caractéristique ;
- Hédonique : traduit la réponse affective du sujet à cette sensation.

Quatre points importants sont à considérer pour la mise en œuvre des techniques sensorielles : les dégustateurs, la préparation des échantillons, les épreuves et le vocabulaire.

L'analyse sensorielle fait appel à deux types de jury : un jury d'experts (profil sensoriel), ou un jury constitué de consommateurs naïfs (test hédonique). Ces tests restent cependant, subjectifs. La fidélité, la justesse, la sensibilité de l'analyse sensorielle sont dépendantes d'un nombre suffisant de membres et d'un échantillonnage représentatif de la population testée (Harris & Shorthose 1988).

La constitution d'un jury est le point le plus délicat de toute évaluation sensorielle. En effet, l'expérimentateur doit chercher à obtenir les résultats les plus justes avec un nombre de sujets aussi restreint que possible (Touraille 1986). Le recours à un jury composé de 10 à 12 experts constitue la méthodologie, souvent considérée comme une référence, pour obtenir des données proches de la perception des consommateurs (Blanchet 2010). Une fois la sélection réalisée, la deuxième phase consiste à entraîner les dégustateurs.

Le choix et la préparation des échantillons sont toujours des points cruciaux pour l'évaluation sensorielle, les résultats seront influencés par le mode et le degré de cuisson ; il est donc impératif de choisir un mode de préparation standard (Touraille 1986).

Deux types d'épreuves peuvent être utilisés :

- Épreuves de différence, qui visent à répondre à la question « Existe-t-il une différence perceptible entre ces deux produits ? » Comme exemple, on peut citer l'épreuve triangulaire où l'un des échantillons est doublé et l'autre pas ; les dégustateurs doivent identifier l'échantillon unique (Touraille 1986);

- Épreuves d'intensité, il s'agit, dans ce cas, d'évaluer l'intensité de diverses caractéristiques. La quantification peut se faire par classement des échantillons, les uns par rapport aux autres. Ou, par l'utilisation d'un terme descriptif ou d'une note. Dans ce dernier cas, plusieurs types d'échelles sont utilisables : échelles structurées ou non, en définissant des intervalles égaux ou des rapports (%) (Touraille 1986). Sur une échelle structurée, la signification de chaque barreau de l'échelle est indiquée, sur le questionnaire au moyen d'un chiffre (d'une note) ou d'un terme. Alors qu'une échelle non structurée est formée par un

segment de droite dont les deux extrémités sont définies par des références explicites ; le sujet est invité à sectionner ce segment par un trait à l'endroit correspondant à l'intensité de la sensation perçue (Depledt 2009).

Il existe d'autres méthodes sensorielles indirectes, d'évaluation de la tendreté dont la réalisation est plus simple, parmi lesquelles :

- La méthode d'évaluation au pouce qui est une méthode ancestrale de boucher. La tendreté est évaluée, en effectuant une pression sur la surface de la viande. Cette méthode basée sur le savoir-faire de l'opérateur est cependant subjective et peu précise (Evrat-Georgel 2008).
- Une méthode basée sur la vue et le toucher, l'évaluation du grain de viande, est utilisée par les professionnels. La finesse du grain est supposée être liée à la tendreté potentielle de la viande. Une grille de notation de cet indicateur a été construite et validée (Oury *et al.* 2010; Ellies-Oury *et al.* 2014).

Les techniques sensorielles sont toujours lourdes, à mettre en œuvre, coûteuses en personnes et en produit, aussi de nombreuses techniques instrumentales ont été développées, afin de s'affranchir de ces contraintes (Touraille 1986).

#### **4.2. Mesure instrumentale de tendreté**

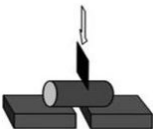
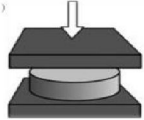




Le développement de technologies pour la mesure de la texture de la viande remonte à l'année 1907 où le scientifique allemand Lehmann (Lehmann 1907), s'est intéressé au problème de la dureté de la viande. Il a élaboré deux dispositifs scientifiques, pour étudier objectivement ce phénomène. Ces instruments consistent en : (1), un dispositif qui mesure la force requise pour mordre un échantillon de viande, et (2), un dispositif qui mesure la résistance à la rupture d'un muscle (Szczeniak & Torgeson 1965). Depuis les premiers travaux de Lehmann, un développement considérable s'est fait, dans ce domaine.

La plupart des méthodes instrumentales de l'évaluation de la texture sont basées, sur des tests mécaniques, qui incluent les mesures de la résistance aux forces plus grandes que la force de gravité. Les méthodes mécaniques de mesure de texture sont généralement destructives, parce que les forces appliquées dépassent la force de l'échantillon testé, causant, ainsi, sa destruction (Saláková 2012). La texture de la viande peut être mesurée ou évaluée par différents tests, qui sont classés selon le mode de déformation en : cisaillement, pénétration, compression, tension, torsion et mastication (Tableau 01) (Barbut 2009).

Les outils qui ont été développés pour la mesure instrumentale de la texture de la viande peuvent être les suivants :

- Le test de cisaillement: Allo-Kramer shear, Warner-Bratzler shear force WBSF, Slice shear force, Razor blade;
- Le test de compression : Texturomètre développé à l'INRA, Star-shaped probe ;
- Le test de pénétration : Tendéromètre d'Armor, pénétromètre ;
- Le test de mastication (écrasement) : Tendéromètre de Volodkevich ou MIRINZ, Texturomètre denture.

**Tableau 1** : Les forces intervenant dans la mesure instrumentale de la viande

Force	Démonstration	Principe	Résultat
<b>Cisaillement</b>		Faire passer une arrête tranchante à travers un morceau de viande perpendiculairement aux fibres musculaires.	Le produit testé est tranché en deux parties restant dans leur position originelle.
<b>Compression</b>		Compression de l'échantillon axialement entre deux plaques plates	Le produit testé reste entier mais occupe un volume moindre.
<b>Pénétration</b>		Pénétration de l'échantillon avec une sonde ou un corps pénétrant.	Une pénétration partielle ou totale d'une sonde dans le matériel examiné
<b>Tension</b>		Étirement de la viande en se servant de poignées d'extension (l'application d'une force sur sa surface extérieure)	Le produit testé est étiré jusqu'à la rupture de ce dernier.
<b>Torsion</b>		Tortillement un échantillon (l'application d'une force de rotation inversé des deux extrémités de l'échantillon)	Le produit va être découpé en deux, les changements du volume sont minimisés et la libération d'eau est évitée.
<b>Mastication</b>		Deux poinçons arrondis qui ressemblent à la géométrie d'une dent, un étant fixe et l'autre mobile se déplacent vers la précédente.	Le produit est en premier comprimé puis cisailé.



### 4.3. Mesure indirecte de tendreté

La tendreté étant un critère multifactoriel, il est possible de l'expliquer partiellement, par des méthodes indirectes, estimant certaines des composantes, de son déterminisme. Le dosage du collagène, est un bon indicateur de la dureté de base (Gicquel *et al.* 2016). On mesure également la longueur des sarcomères (indiquant l'état de contraction du muscle), le nombre, la taille des fibres musculaires (Allais 2011), la fragmentation des myofibrilles musculaires (IFM) directement reliée à la tendreté du muscle (Roudot 2002). Des dosages d'enzymes impliquées ou supposées avoir un rôle potentiel dans le processus de maturation peuvent également être réalisés. On peut ainsi doser l'activité des calpaïnes, de la calpastatine (inhibiteur de calpaïnes), des cathepsines, des sérines peptidases, des caspases (Evrat-Georgel 2008).

## 5. Causes de la variabilité de la tendreté de la viande

La tendreté de la viande dépend de nombreux facteurs tels que les facteurs biologiques liés à l'animal (l'espèce, la race, l'âge, le sexe, et le type de muscle) et les facteurs technologiques (conditions d'abattage, conservation et cuisson), responsables d'une grande variabilité, qu'il convient de maîtriser au plus haut degré.

### 5.1. Facteurs biologiques

#### 5.1.1. Espèce

La vitesse de maturation ou d'attendrissage des viandes est très différente, selon l'espèce animale. Ainsi, l'attendrissage à 4°C, est complet en 2 jours pour le poulet, 5 jours pour le porc, 7 jours pour le mouton et 10 jours pour le lapin et le bœuf (Blanchard & Mantle 1996). Les raisons de ces différentes vitesses de maturation ne sont pas encore bien assimilées. Le potentiel enzymatique, qui se traduit par une dégradation plus ou moins rapide des protéines musculaires, serait responsable de cette variation (Ouali & Talmant 1990).

#### 5.1.2. Race

Une variabilité individuelle importante existe au sein de chaque race. Plus un animal possède une part génétique d'une race donnée, plus la viande a des caractéristiques d'un point de vue dureté, spécifique à cette race (Dransfield *et al.* 2003), suite à un développement musculaire et une maturité physiologique qui lui sont propres (Oury *et al.* 2007; Micol *et al.* 2010).

### 5.1.3. Sexe

Le sexe de l'animal influe sur la tendreté. La viande de mâles est généralement considérée, comme plus dure que celle des femelles (Kim *et al.* 2007; Jeleníková *et al.* 2008). Cette différence est liée à la teneur en collagène plus élevée chez les mâles (Clinquart *et al.* 2000) car l'augmentation de la testostérone des mâles augmente le taux de collagène (Beriaïn *et al.* 2000).

### 5.1.4. Âge

Selon Clinquart *et al.* (2000), la dureté de la viande augmente avec l'âge de l'animal, en raison de la diminution de la solubilité du collagène. La teneur en collagène des muscles augmente de 18 à 20 %, entre 9 et 13 mois d'âge, au-delà de 13 mois, les muscles présentent de faibles variations de cette teneur. Cependant, la solubilité du collagène, reflet de son degré de polymérisation, diminue progressivement et explique la diminution de la tendreté des muscles avec l'âge de l'animal (Micol *et al.* 1993).

### 5.1.5. Type de muscle

Le type de muscle est très important pour la tendreté de la viande. Le temps optimum de maturation varie, selon les muscles. En fonction de leur position dans les carcasses et leur rôle physiologique, *in vivo*, les muscles sont plus au moins riches, en tissu conjonctif et présentent donc, une dureté de base plus au moins importante (Valin 1995).

## 5.2. Facteurs technologiques

Les facteurs technologiques influencent de façon certaine l'attendrissement de la viande et le niveau final de tendreté. Ainsi, la préparation et la conservation de la carcasse sont des éléments qui conditionneront le bon déroulement du phénomène de maturation *post mortem* du muscle, en viande. De même, la tendreté sera dépendante de la méthode de cuisson de la viande. Celle-ci varie, par ailleurs selon les études et les pays, et en fonction des habitudes de consommation. Ainsi, une cuisson ou une conservation à des températures inappropriées détériorera les qualités gustatives de la viande.

### 5.2.1. Influence de l'alimentation

L'alimentation des animaux, est un facteur non négligeable de variabilité de la tendreté. Selon le type d'alimentations fournies, le développement et la croissance des animaux, les caractéristiques musculaires seront modifiées (Picard *et al.* 1995). Les conditions nutritionnelles donc, sont susceptibles de modifier le type de fibres musculaires, la teneur ou

la solubilité du collagène, la teneur en réserves énergétiques musculaires (glycogène), ainsi que l'activité des systèmes protéolytiques. Elles influencent donc la tendreté de la viande (Coibion 2008).

### 5.2.2. Conditions de transports et d'abattage

Lors du transfert des animaux du lieu d'élevage jusqu'au poste d'abattage, les animaux sont soumis à un certain nombre de traitements liés aux opérations indispensables qui sont : la mise à jeun, le chargement, le transport, le déchargement, l'amenée au poste d'abattage, les changements d'environnement physique et social (Berri *et al.* 2001), le mélange d'animaux provenant de différents élevages (Ouali, 1991). Même conduites avec soin, ces opérations sont à l'origine de traumatismes et de stress importants. Ces réactions de stress entraînent des modifications du métabolisme musculaire avant et après la mort de l'animal, et par ce biais, un impact direct sur les qualités sensorielles des viandes. En effet, le stress, avant l'abattage accélère la chute du pH, en augmentant l'activité ATPasique du muscle, accompagné par l'épuisement des réserves en glycogène, conduisant à des viandes dures (Berri *et al.* 2001).

### 5.2.3. Température de conservation

La température *post mortem* de la carcasse a un effet primordial sur le développement de la *rigor mortis*. Schneider *et al.* (2012). Ils rapportent que les carcasses exposées à des températures *post mortem* élevées (>30°C) présentent une glycolyse musculaire plus rapide et donnent des viandes moins tendres, alors qu'une température *post mortem* basse (< 10°C) ralentit la glycolyse, mais ne diminue pas la tendreté.

La congélation semble avoir un rôle bénéfique sur le processus de maturation, si elle a lieu *post rigor*. Cet effet bénéfique de la congélation est probablement, lié aux altérations de la structure musculaire induites, lors de la formation des cristaux de glace dans le muscle. Ces altérations amplifient le processus de fragilisation de la structure contractile, due à la maturation elle-même (Daudin 1988).

### 5.2.4. Stimulation électrique

La stimulation électrique après l'abattage accélère le développement de la *rigor mortis* (Dickens & Lyon 1995). Sams *et al.* (1991) démontrent un effet positif de cette stimulation, sur la tendreté de la viande de poulet, lorsqu'elle est associée à un désossage, à chaud. Ils suggèrent que les filets non stimulés électriquement ne doivent pas être désossés avant 6 heures *post mortem*. Alors qu'une application de la stimulation électrique réduit le temps critique de désossage, jusqu'à 3 heures *post mortem*.

En effet, la stimulation électrique après abattage accélère la déplétion de l'ATP, empêche ou réduit la contraction du muscle lors du refroidissement précoce et rapide et donc réduit le durcissement de la viande. Il s'agit d'une prévention du durcissement du muscle et non d'un attendrissement de la viande (Birkhold *et al.* 1992; Lyon & Dickens 1993).

#### **5.2.5. Effet de la cuisson sur la tendreté**

La température et la durée et le mode de cuisson ont un grand effet sur les propriétés physiques et sensorielles de la viande (Combes *et al.* 2000). De fait, les traitements thermiques influencent fortement la texture, les changements protéiques et le rendement de cuisson (Wattanachant *et al.* 2005). Les propriétés mécaniques de la viande sont affectées par les protéines myofibrillaires, sarcoplasmiques et le tissu conjonctif (principalement le collagène). Pendant le chauffage, les différentes protéines dénaturent, et causent des changements structurels dans la viande, tels que la destruction des membranes cellulaires, le rétrécissement des fibres, l'agrégation et la formation de gel des protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques ainsi que le rétrécissement et la solubilisation du tissu conjonctif (Li *et al.* 2013). En effet, la chaleur solubilise le tissu conjonctif, causant l'attendrissement, mais aussi le durcissement des protéines myofibrillaires, d'où la dureté de la viande (Obuz *et al.* 2004).

La quantité de collagène détermine le mode de cuisson des viandes (viande à bouillir ou à griller). Ainsi, des viandes pauvres en collagène sont plutôt à griller, tandis que des muscles riches en collagène donnent des viandes dures, classées comme des viandes à bouillir et nécessitant un temps et une température de cuisson plus importants (Blanchet 2010).

### **6. Attendrissement naturel de la viande**

La maturation *post-mortem* du muscle en viande est un processus enzymatique qui conduit à la dégradation, par des protéases, des structures myofibrillaires, et, dans une moindre mesure, des collagènes présents dans le tissu conjonctif (Ouali 1992). Elle résulte de l'action des protéases endogènes sur les protéines contractiles et sur les constituants du cytosquelette (Huff-Lonergan & Lonergan 1999). Les systèmes protéolytiques identifiés dans le muscle comprennent les calpaïnes, les cathepsines, le protéasome, les métallopeptidases (Matrix Metallopeptidases ou MMP's) et les sérines peptidases (Ouali *et al.* 2006b). Deux d'entre eux ont été particulièrement étudiés, s'agissant des calpaïnes (Goll *et al.* 2003) et des cathepsines (Sentandreu *et al.* 2002). Selon Cheftel & Cheftel (1992), sous l'action de ces enzymes, il se produit des changements physiques, suite à une fragilisation de la structure de

la myofibrille, une altération des protéines filamenteuses (actine et myosine), la solubilisation des protéines et la rupture des liaisons.

La dégradation myofibrillaire débute, après l'activation du système enzymatique et comprend les protéines troponine-1, troponine-t, desmine, vinculine, méta-vinculine, dystrophine, nébuline et titine (Koochmaraie 1996). Lorsque l'attendrissement de la viande se produit entre les attachements de la ligne z à la ligne z et les attachements de la ligne M dans le sarcolemme, à l'aide de protéines costamériques (signifiant qu'une protéine présente une distribution sous-sarcolemmale hétérogène, discontinue et répétitive (Couchoux 2007)) et de la protéine élastique titine, se produit, alors la dégradation de trois structures importantes du cytosquelette, (Taylor *et al.* 1995). Dans les muscles, ces enzymes protéolytiques jouent un rôle important dans la protéolyse *post-mortem* et l'attendrissement de la viande (Koochmaraie & Geesink 2006). Les cathepsines ont été les premières enzymes utilisées dans l'attendrissement de la viande, après quoi la calpaïne a été introduite, en raison de son efficacité, à changer la densité de la ligne Z, observée en *post-mortem*, bien qu'elle n'était pas initialement liée à l'attendrissement de la viande (Taylor *et al.* 1995).

Ouali *et al.* (2006a) ont proposé un nouveau concept impliquant des enzymes de la famille des caspases, ayant également un rôle important dans les processus d'apoptose (mort cellulaire programmée). Ces derniers pourraient constituer une première étape du phénomène de maturation. Ainsi, lors de la transformation *post-mortem* du muscle en viande, des enzymes protéolytiques endogènes vont cliver les liaisons peptidiques des protéines contractiles musculaires et structurales, conduisant ainsi à la déstructuration de la structure myofibrillaire. C'est donc la cinétique de protéolyse qui va conditionner l'attendrissement de la viande et par la suite sa tendreté (Taylor *et al.* 1995).

La maturation conduit au développement des propriétés organoleptiques favorables, telles que la jutosité, la saveur, et la tendreté. En outre, l'action de nombreuses hydrolases, autres que les protéases, contribuent également à l'apparition de faibles quantités de substances aromatisantes, telles que les diacytéyles, l'acétone, le sulfure d'hydrogène, l'acétaldéhyde, et l'ammoniaque (Cheftel & Cheftel 1992).

La tendreté est un facteur important de la qualité. C'est la qualité sensorielle la plus recherchée et la plus appréciée par le consommateur de viande (Dransfield & Zamora 1997). C'est aussi l'un des critères de qualité d'origine multifactorielle le plus variable, et donc le plus difficile à maîtriser ou à prédire (Culioli *et al.* 1990). Cette caractéristique est d'une importance majeure pour le consommateur, et vu la difficulté dans la maîtrise, de sa

forte variabilité, par les acteurs de la filière, nous allons nous intéresser aux techniques d'attendrissement artificiel de la viande.

## **7. Attendrissement artificiel de la viande**

La tendreté de la viande présente une variabilité élevée et incontrôlée qui est l'une des raisons de l'insatisfaction du consommateur. Pour cela, des techniques d'amélioration de la tendreté ont fait l'objet de nombreuses études permettant de développer des techniques simples, rapides et efficaces pour maximiser et améliorer la tendreté des viandes bovines, qualité étant la plus appréciée et recherchée par le consommateur (Istrati 2008). Les interventions post-mortem peuvent être classées, sur la base du mode de processus, en trois catégories principales : physique, chimique et enzymatique.

### **7.1. Attendrissements physique et mécanique**

Les interventions physiques ou actions mécaniques provoquent une altération dans le tissu conjonctif et les réseaux de protéines myofibrillaires et stimulent la protéolyse par des interactions directes entre les enzymes endogènes, les cofacteurs, et les substrats qui peuvent réduire la tangibilité (Payne 2009). Les interventions physiques sont celles qui provoquent des changements structurels, dans la viande en appliquant une force ou un stimulus physique, incluant la stimulation électrique des carcasses, le conditionnement à haute température, les cycles de congélation, la décongélation, les traitements sous pression, les ultrasons et la pression hydrostatique élevée (Bekhit *et al.* 2014).

Quant à l'attendrissement mécanique qui repose sur l'obtention d'une meilleure texture, par l'application d'une force (compression ou cisaillement), il provoque une déformation ou un endommagement du réseau de protéines structurales de la viande (Bekhit *et al.* 2014). Il existe deux principaux types d'attendrissement mécanique utilisés, par l'industrie de la viande : aiguille (lame), cubage (macération) (Davis 1975).

### **7.2. Attendrissement chimique**

L'attendrissement chimique peut se faire par perfusion, marinade ou injection de sels de calcium (chlorure, lactate, ascorbate et carbonate), le sodium (chlorure, acétate, citrate et ascorbate), des sels de phosphate. Des préparations commerciales contiennent de la maltodextrine, plus de l'amidon ou des combinaisons de ces composés, et la vitamine D. Elles modifient le taux de glycolyse, le taux et l'état de contraction et le taux de protéolyse ainsi que les interactions protéine-protéine, et la solubilité des protéines (Amin *et al.* 2014). Ces procédés peuvent améliorer la texture de la viande et la palatabilité par stimulation de la

protéolyse ( $\text{Ca}^{2+}$  activation des Calpaines), la solubilisation des protéines myofibrillaires (sodium et phosphate), et améliorer la capacité de rétention d'eau (sels de phosphate) (Bekhit *et al.* 2014). Selon Sun (2009), les interventions chimiques, bien qu'elles améliorent la texture de la viande et la sapidité, parfois elles augmentent la quantité de sel ajoutée et peut devenir malsaine.

### **7.2.1. Injection**

L'injection a pour rôle principal de forcer la pénétration de la saumure, au cœur du produit et de réduire ainsi, le temps nécessaire à l'homogénéisation. D'après certains auteurs, elle améliorerait la tendreté des viandes (McGee *et al.* 2003). L'injection est réalisée à l'aide d'une injecteuse dont le nombre et le type d'aiguilles (Diamètre, nombre de trous) varient d'un modèle à un autre. La pression d'injection est réglable, de même que la vitesse du tapis, sur lequel sont positionnés les produits à injecter. Le taux d'injection peut donc être maîtrisé et constant en fonction des deux paramètres précédents. Des réglages sont toutefois nécessaires, à chaque changement de produit. Pour une parfaite maîtrise du procédé, les taux d'injection ne doivent pas dépasser certaines valeurs, de l'ordre de 10 à 15 % du poids du produit, mis en œuvre. (Lapendrie & Parafita 2009). Selon Uttaro & Aalhus (2007), l'injection réalisée parallèlement aux fibres permettrait une meilleure diffusion du sel.

### **7.2.2. Marinade**

Quant au marinage qui représente le processus le plus utilisé, ainsi que par les consommateurs. Il améliore la tendreté, l'ajout du goût et à la variété, à la composante viande des repas. Il consiste à tremper la viande, dans une solution contenant des ingrédients tels que, le vinaigre, le jus de citron, le vin, la sauce de soja, la saumure, les huiles essentielles, les sels, les attendrisseurs, les herbes, les épices et les acides organiques, pour aromatiser et attendrir les muscles riches en tissus conjonctifs, de coût moindre. Son effet attendrissant offre un outil commercialement important qui permet de les mettre à niveau (Bekhit *et al.* 2013). Les marinades sont particulièrement impliquées, sur des muscles riches en tissu conjonctif. (Gault 1991).

### **7.2.3. Perfusion**

Kerth *et al.* (1995) ont amélioré la tendreté d'échantillons de viande bovine par perfusion de  $\text{CaCl}_2$ , à 48 heures *post mortem*. Takahashi *et al.* (1987) avaient émis l'hypothèse d'une action non enzymatique du calcium, qui localement concentré solubiliserait l'a-actinine et affaiblirait la strie Z. Koohmaraie *et al.* (1989) ont démontré par perfusion de NaCl et de

CaCl<sub>2</sub> (respectivement 0,6 et 0,3 molaires), que l'effet du calcium était bien d'origine enzymatique. En effet, son action sur l'attendrissement est immédiate (1jour pm), alors que le NaCl entraînait une intensification de la maturation, relativement tardive (6jour pm). Le NaCl agirait donc, en augmentant la force ionique et le CaCl<sub>2</sub>, en activant le système enzymatique calcium dépendant (Feidt 1996).

#### 7.2.4. Pulvérisation

La pulvérisation est réalisée à l'aide d'un pulvérisateur, sur la suspension enzymatique, appliquée, sur toute la surface du muscle.

### 7.3. Attendrissement enzymatique

Aujourd'hui les technologies d'attendrissement artificielles et plus particulièrement, faisant appel à des enzymes exogènes ayant des origines différentes (animales, végétales, microbiens ou fongiques), suscitent un intérêt majeur, d'où leurs applications aux fins suivantes : diminuer la dureté des viandes d'animaux âgés, de réforme ou laitiers, et accélérer le processus de maturation (Payne 2009). Ces attendrisseurs naturels exogènes sont définis comme étant des produits naturels tels que : les différents fruits et légumes qui contiennent des enzymes protéolytiques, les plus couramment utilisées sont les : papaïne, zingbaine, ficaine, Actinidine, bromelaine etc. (Maiti *et al.* 2008). Également, les attendrisseurs exogènes peuvent avoir d'autres origines : animales (pancréas porcine, pepsine) (Pietrasik *et al.* 2010; Jamdar & Harikumar 2016) ou microbienne (collagénase) (Foegeding & Larick 1986). Ces enzymes ont été utilisées sous diverses formes : marinade, injection en saumure, injection veineuse avant l'abattage de l'animal, et par incorporation de diverses épices(Ashie *et al.* 2002). Selon le but recherché, une de ces enzymes, un mélange adapté, ou autres de ces protéases sera utilisé.

L'injection *ante mortem* d'enzymes attendrissantes a été utilisée dans le commerce, pour distribuer environ 2 à 5 ppm d'enzyme, à toutes les parties de la carcasse en utilisant le système circulatoire sanguin de l'animal. Cette méthode a été développée à l'origine pour le bœuf et brevetée par *Swift and Company* sous le nom de système Proten™ (Beuk *et al.* 1959). Rhodes & Dransfield (1973) ont également étudié cette méthode, chez les moutons et ont déterminé, également l'augmentation de la sensibilité des animaux plus âgés. L'inconvénient majeur de ce système était que les muscles de la ronde ou de la jambe, et des organes comme le foie, recevaient des doses plus élevées, en raison de leurs systèmes vasculaires plus étendus. Cela a entraîné un attendrissement excessif de ces tissus. Cette



méthode a été utilisée commercialement, pendant une courte période, mais son utilisation est limitée aujourd'hui (Payne 2009).

#### **7.4. Effets de l'utilisation des enzymes sur la texture de la viande**

L'utilisation de protéases exogènes est récemment, devenue un centre d'intérêt croissant, du fait de l'aptitude de ces dernières, à améliorer la tendreté de la viande, tout en entraînant la décomposition des protéines musculaires, l'hydrolyse du collagène et de l'élastine, permettant l'attendrissement de la viande (Istrati *et al.* 2012).

Les effets de l'utilisation des enzymes dans la viande, en vue d'obtenir une tendreté désirée, dans le produit peuvent être réalisés par deux mécanismes. Tout d'abord, les enzymes peuvent catalyser la rupture des liaisons covalentes des protéines, générant des fragments peptidiques plus petits ou des acides aminés, modifiant ainsi, la structure de la viande. Le second mécanisme implique l'utilisation de certaines enzymes, qui peuvent favoriser la formation de nouvelles ou différentes liaisons covalentes, dans la structure de la protéine native, modifiant la tendreté de la viande (Weissman *et al.* 2010).

Les enzymes exogènes d'origine végétale qui ont une importance économique dans la transformation de la viande comprennent la papaïne (de la papaye), la bromélaïne (de l'ananas) et la ficaine (des figes), accidentellement découverts, pour avoir des propriétés attendrissantes. Ces derniers appartiennent tous, à un groupe d'enzymes appelées thiol-cystéine ou protéases sulfhydryle. Car, elles contiennent un résidu de cystéine dans leur site actif. Cette classe d'enzymes est semblable à celles trouvées naturellement dans la viande (calpain, cathpsine B, et quelques caspases). Et, il est logique qu'ils soient utilisés de façon appropriée, à des fins attendrissantes (Payne, 2009).

Ce sont des endopeptidases à faible spécificité de substrat et sont capables de catalyser l'hydrolyse d'une large gamme de liaisons (peptide, amide, ester, thiol ester et les liaisons thiono esters) (Schwimmer 1981). Ces enzymes exercent un effet protéolytique, sur les myosines et d'autres protéines myofibrillaires, responsables de la tendreté de la viande (Melendo *et al.* 1996).

Toutes ces protéases végétales et microbiennes qui ont été étudiées et rapportées pour l'attendrissement de la viande sont mésophiles ou thermophiles, avec 50 à 80°C, comme température optimale, et conservent, uniquement 10%, de leur activité la plus élevée à 20°C. Ces protéases perdent la majeure partie de leurs activités, à température ambiante lorsqu'elles sont utilisées pour attendrir la viande, avant la cuisson. De plus, ces protéases mésophiles ou

thermophiles demeurent stables, aussi, lors de la cuisson et peuvent causer un sur-attendrissement (Bhat *et al.* 2018), en raison de leur large spécificité de substrat, conduisant le plus souvent, à une dégradation extensive de la microstructure de la viande et affecte la saveur et la texture. C'est le cas de la papaïne qui permet d'obtenir une texture moelleuse et de saveurs. Par contre, des effets négatifs similaires sur les attributs sensoriels de la viande peuvent être causés, par des concentrations élevées de certaines protéases, non végétales permettant de générer de l'amertume dans la viande traitée (Ashie *et al.* 2002). Donc, l'utilisation idéale des enzymes, dans l'attendrissement de la viande implique effectivement de comprendre leur force et leur spécificité, combinée avec la méthode d'application et le temps total où ils seront actifs dans le produit (Payne 2009). Ainsi, ces protéases doivent retenir la majeure partie de leurs activités, à température ambiante et doivent être aisément inactivée aux températures de cuisson (Bhat *et al.* 2018).

### **8. Enzymes appliquées pour l'attendrissement artificiel de la viande**

Des enzymes exogènes provenant de plantes, de bactéries et de sources fongiques ont été utilisées, depuis des siècles pour améliorer la tendreté de la viande par leurs activités protéolytiques. Les organismes fédéraux des États-Unis reconnaissent cinq enzymes exogènes : papaïne, ficaine, bromélaïne, des protéases de *Aspergillus oryzae*, et *Bacillus subtilis* comme GRAS ( généralement reconnu comme sûrs ), comme étant des améliorants de la tendreté (Istrati *et al.* 2012). Comme démontré dans le tableau 02, chacune de ces enzymes possède des degrés divers d'activité, contre les protéines myofibrillaires et le collagène.

De toutes les enzymes protéolytiques exogènes utilisées, dans l'attendrissement des viandes, les cystéines-protéases ont un intérêt considérable, en particulier, d'origines végétales. Certaines d'entre elles ont longtemps été utilisées en cuisine (Sullivan & Calkins 2010). Les enzymes protéolytiques des plantes telles que la papaïne, la bromélaïne et la ficine ont été largement utilisées comme agents attendrisseurs de la viande. Cependant, ces enzymes dégradent, souvent la texture de la viande en raison de leur spécificité de substrat large, menant au goût défavorable ou sur l'attendrissement en raison de la répartition inégale (Cronlund & Woychik 1987).

**Tableau 02:** Synthèse des résultats antérieurs sur les protéases utilisées dans l'attendrissement de la viande.

Protéases	Viande	Traitements	Effets sur la texture de la viande	Références
Bromelaine	Ronds de bœuf	Injection	Tendreté améliorée, bien que l'injection du sel et de phosphate ait été plus efficace dans quelques cas.	[1]
Papaïne, Bromelaine, Ficine, Bacille, Aspergillus et Gingembre.	Muscles du bœuf	Injection	Papaïne avait la plus grande capacité d'améliorer la tendreté. Les changements de la jutosité et de la texture peuvent être affectés négativement. Bromelaine a augmenté la tendreté et a dégradé le collagène plus des protéines contractiles. Le gingembre a la possibilité d'attendrir la viande mais le niveau d'injection a été limité dû aux saveurs issues.	[2]
Extrait du gingembre	Viande de mouton	Marinade	Au niveau de 3%, l'extrait du gingembre a été trouvé pour être efficace pour améliorer les qualités sensorielles des morceaux du mouton.	[3]
Extrait du gingembre	Viande de chèvre	Marinade	Solubilité accrue des protéines (spécialement collagène).	[4]
Extrait du gingembre et Papaïne	Viande de buffle	Marinade	Le gingembre est une meilleure alternative de la papaïne pour la tendreté.	[5]
Fruit de la grenade	Viande de chèvre	Marinade	La protéase du fruit de la grenade est meilleure pour l'attendrissement comparé avec 0.2% papaïne.	[6]
Papaïne, actinidine et gingembre	Poitrine de l'oie	Injection	L'addition de 0.12% de papaïne a fracturé légèrement la fibre du muscle. 6% du jus de l'ananas et 4% du jus du gingembre ont rompu la fibre du muscle. Diminution significative de la dureté et de la mastication.	[7]
Papaïne	Viande du bœuf	Injection	La viande traitée par la papaïne a reçu le plus haut score de tendreté.	[8].
Protéases de bacille	Viande du bœuf	Marinade	Les protéases bactériennes avaient marqué la préférence pour élastine et collagène. Les protéases du bacille avaient le même effet sur la viande du bœuf comme papaïne.	[9]

Protéases	Viande	Traitements	Effets sur la texture de la viande	Références
Extrait du gingembre	Poule	Marinade	3% d'extrait du gingembre était optimum pour l'attendrissement de la viande. L'attendrissement est accompli à travers son action sur les myofibrilles et les composants du tissu conjonctif	[10]
Papaïne, Bromélaïne	Dinde	Marinade	En raison de l'hydrolyse enzymatique partielle des protéines de la viande, une plus grande affinité pour les molécules d'eau est établie.	[11]
Actinidine	Filet du porc	Injection	Tendreté de viande par mesure de la force du ciseau a amélioré plus que 2 plis après l'injection du jus des kiwis	[12]
Papaïne	Bœuf	Injection	Plus grande capacité d'améliorer la tendreté de la viande pendant la cuisson. Aucun changement considérable de la tendreté pendant la congélation ou la réfrigération de la viande.	[13] [14]
Papaïne	Cuisse du bœuf	Injection	Amélioration de la tendreté, la saveur et la jutosité.	[15]
Jus de kiwi	Viande d'agneau	Infusion	Dégradation considérable des protéines de la myofibrille. Apparition de nouveau peptides et activation de m-calpain, pendant le vieillissement de la carcasse.	[16]
Papaïne	Viande d'agneau	Infusion	L'action n'a lieu dans la viande que lorsque la température augmente pendant la cuisson et s'arrête lorsque l'enzyme est inactivée après un chauffage supplémentaire. La papaïne, a peu de spécificité et les protéines sarcoplasmiques, myofibrillaires et du tissu conjonctif sont toutes attaquées.	[17]

Références : [1] (Kolle *et al.* 2004), [2] (Sullivan & Calkins 2010), [3] (Mendiratta *et al.* 2000), [4] (Pawar *et al.* 2007), [5] (Naveena & Mendiratta 2004; Naveena *et al.* 2004), [6] (Narsaiah *et al.* 2011), [7] (Gao *et al.* 2011), [8].(Schenkova *et al.* 2007), [9] (Qihe *et al.* 2006), [10].(Naveena & Mendiratta 2001), [11] (Doneva *et al.* 2015), [12] (Liu *et al.* 2011), [13] (Ashie *et al.* 2002), [14] (Gerelt *et al.* 2000), [15] (Istrati 2008), [16] (Han *et al.* 2009), [17] (Rhodes & Dransfield 1973)

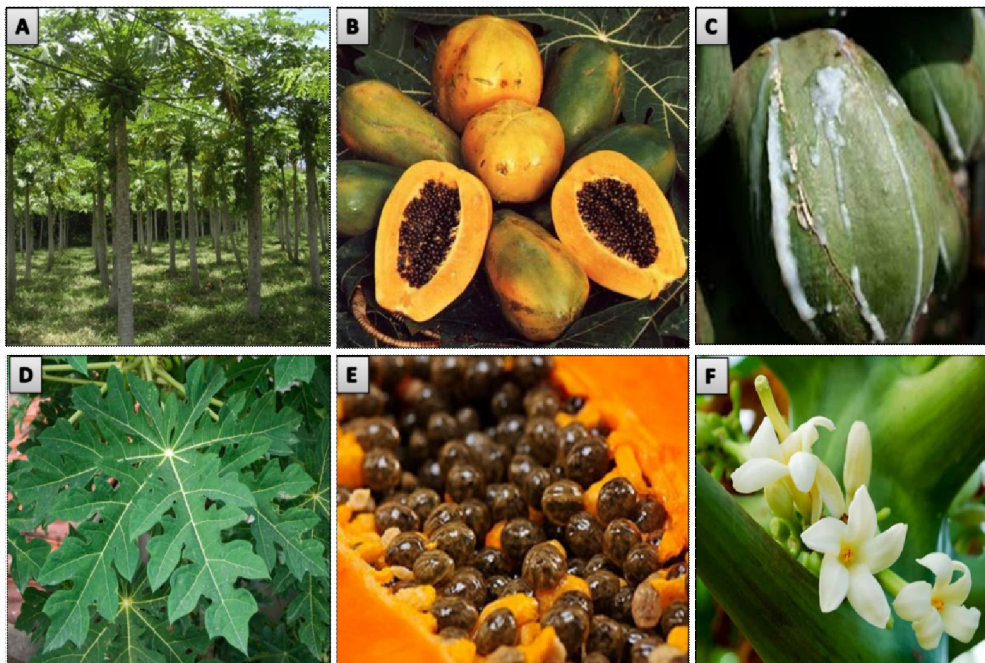
Dans ce qui suit, nous allons nous concentrer, sur deux protéases à cystéine d'origine végétale, à savoir la papaine, la ficaine, et une protéase gastrique (d'origine animale), la pepsine sur lesquelles, nous allons travailler.

## 8.1. Papaine

### 8.1.1. Description de la plante

Le **papayer** (ou *Carica papaya L.*) est un arbre fruitier à feuillage persistant, qui se développe dans les régions tropicales et équatoriales (Figure 2A). C'est un arbuste de 3 à 7 m de hauteur et est en général non ramifié (Permanne 1964). Il appartient à la famille des *Caricacées* et on pense, être originaire des Amériques tropicales (Pierson *et al.* 2012)

Son **fruit** (Figure 02B), la papaye, se présente comme une baie de 1kg environ, semblable au melon et exploité pour la papaine qui se trouve dans le latex (Permanne 1964). Il est bien connu pour son excellent goût et sa valeur nutritive quand on le mange mûr (Canini *et al.* 2007; Zunjar *et al.* 2011). Vert, il contient l'enzyme papaine (CE 3.4.22.2), une protéase à cystéine, avec action semblable à celle de la pepsine dans le jus gastrique (Monti *et al.* 2000).



**Figure 02 :** Arbre (A) et fruit (B), Latex (C), feuilles (D) Graines (E) et Fleurs (F) de *Carica papaya*.

Les **feuilles** (Figure 2D) rassemblées au sommet du tronc, sont portées par un long pétiole de 40-60 cm. Le limbe, de pourtour subcirculaire de 50 cm de diamètre est profondément divisé en 7 lobes, eux-mêmes lobés. La face supérieure est vert clair mate, la face inférieure est blanchâtre (Permanne 1964). Le feuillage qui contient de la papaine (enzyme protéolytique) est utilisé, dans bien de pays, pour attendrir la viande (Abakar 2012).

Le **latex** (Figure 2C) de la papaye est un liquide thixotrope, à aspect laiteux qui contient environ 85% d'eau. Il est constitué d'une fraction particulière insoluble dont la composition est encore pratiquement inconnue. Il représente 25% de la matière sèche. La fraction soluble contient cependant, simultanément, des ingrédients usuels tels que les glucides (~ 10%), les sels (~ 10%), les lipides (~ 5%) et des biomolécules représentatives comme le glutathion, les cystéine-protéinases (~ 30%) et plusieurs autres protéines. En conséquence, la matière non hydrosoluble résultante est généralement considérée comme un déchet et par rapport à la fraction soluble dans l'eau. On sait peu de choses, sur sa composition chimique (Barouh *et al.* 2010). En outre, les niveaux de ces enzymes varient dans les fruits, le latex, les graines, les feuilles et les racines (Chukwuemeka & Anthonia 2010). Le latex est récolté en incisant la peau verte du fruit, pour induire un écoulement de latex, qui sera séché, avant la collecte pour le traitement (Nakasone & Paull 1998).

Les **graines** (3x4mm), ovoïde, ont un tégument mucilagineux gris brillant leur donnant l'aspect de caviar, de la meilleure qualité ; puis vient un tégument interne noir et dur qui les fait alors ressembler à des grains de poivre (Figure 3E). Il adhère à l'embryon, entouré d'un albumen huileux (tissu de réserves nutritives) (Tonelli & Gallouin 2013).

Les **fleurs** (Figure 2C), de couleur blanc crème, généralement séparées : mâles à tube de corolle mince, en longues inflorescences très ramifiées, femelles presque sessiles, beaucoup plus grosses et à tube très court (Rohwer 2013).

### 8.1.2. Caractéristiques structural et fonctionnel de la papaine

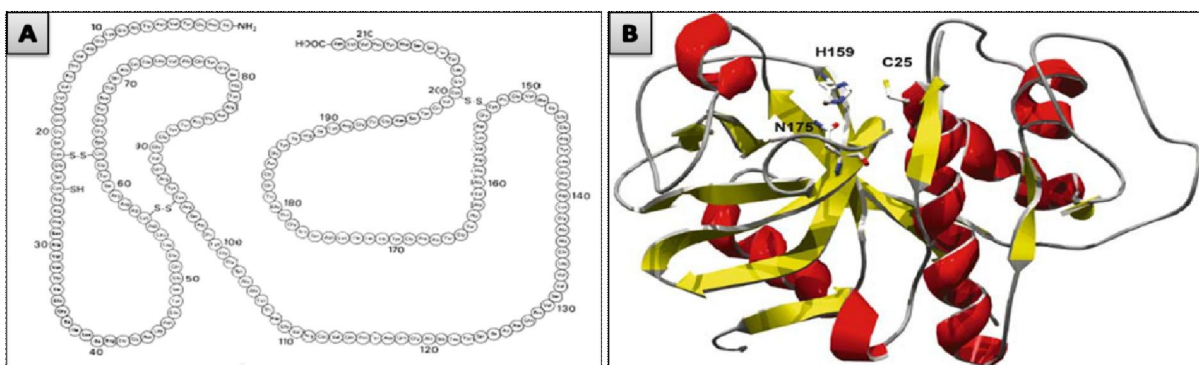
Le latex brut de fruit de la papaye contient un mélange d'au moins quatre protéases à cystéine : papaine (moins de 10%), la chymopapaine A et B (26-30%), la glycyle endopeptidase III et IV (23-28%), et la caricaine (14-26%) (Kairunnisa *et al.* 2016) et autres enzymes (Baines & Brocklehurst 1979). La papaine (EC 3: 4: 22: 2) également connue sous le nom de papaye peptidase I, est la plus importante des enzymes du latex de papaye bien qu'elle ne présente, que 10% de latex (Kairunnisa *et al.* 2016). Le tableau 03 résume les principales caractéristiques des protéases à cystéine présente dans le latex de *Carica papaya*.



**Tableau 03 :** Protéases à cystéine du latex de *Carica papaya* (Feijoo-Siota & Villa 2011).

Noms (Nombre EC)	Noms alternatifs	Masses moléculaires (Dalton)	Séquences protéiques	Références
Papaine (EC 3.4.22.2)	Papaya proteinase I	23,000	212 AA	(Mitchel <i>et al.</i> 1970) (Husain & Lowe 1970)
Chymopapaine (EC 3.4.22.6)	Papaya proteinase II	27,000	218 AA	(Jacquet <i>et al.</i> 1989) (Watson <i>et al.</i> 1990)
Caricaine (EC 3.4.22.30)	Papaya proteinase $\Omega$ Papaya proteinase III Papaya peptidase II Papaya peptidase A	23,500	216 AA	(Dubois <i>et al.</i> 1988) (Azarkanet <i>et al.</i> 2003)
Glycyl- endopeptidase (EC 3.4.22.25)	Chymopapaine M Papaya proteinase IV Papaya peptidase B	23,313	216 AA	(Ritonja <i>et al.</i> 1989) (Lynn & Yaguchi 1979)

La papaine est une protéine globulaire à chaîne unique, se compose de 212 acides aminés, avec quatre ponts disulfure et des résidus catalytiquement importants, dans les positions Gln19, Cys25, His158 et His159 (Robert *et al.* 1974). Elle consiste en une seule chaîne protéique, repliée pour former deux domaines contenant une fente, pour lier le substrat (figure 03). La structure cristalline de la papaine a confirmé le Cys25- His159, apparemment (Baker & Drenth 1987). La présence d'un résidu asparagine conservée (Asn175), à proximité de l'histidine catalytique (His159), créant une triade Cys-His-Asn, dans les cystéine peptidases est considéré comme analogue à l'arrangement Ser-His-Asp trouvé dans les sérine protéases (Rao *et al.* 1998).



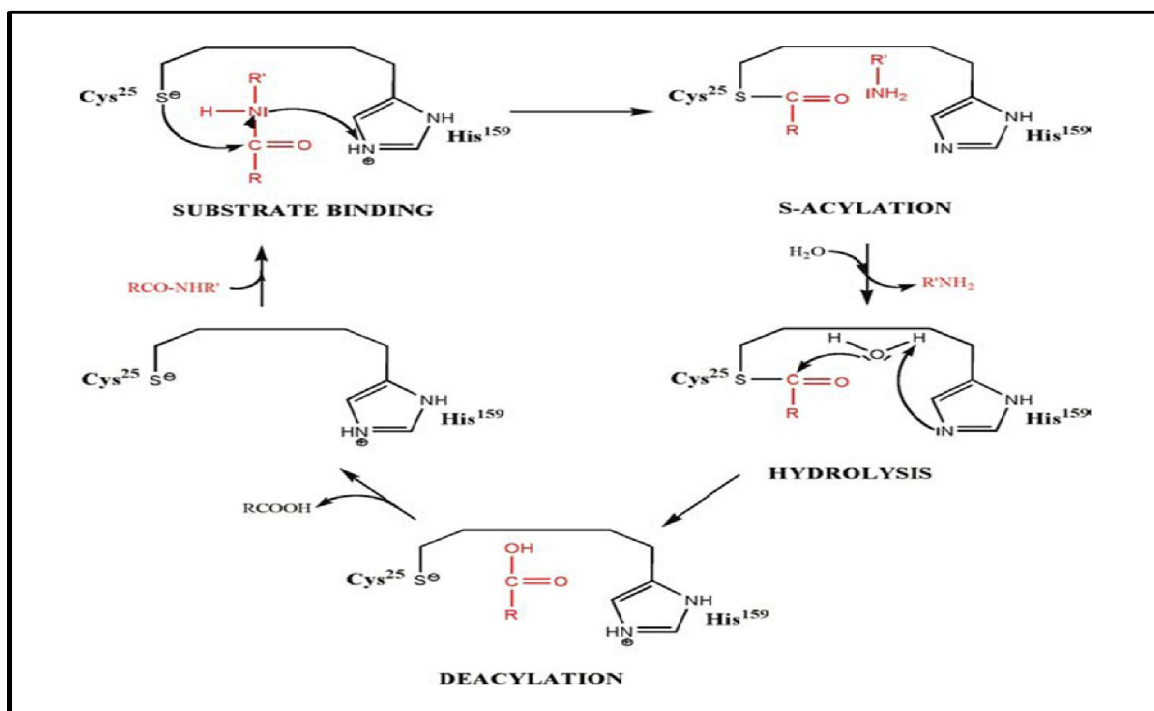
**Figure03:** Représentation des structures primaire (A) et tridimensionnelle (B) de la papaine (Lowe 1976; Kamphuis *et al.* 1984).

Sa masse moléculaire est d'environ 23kDa. C'est une protéine basique, avec un pI de 8,75. (Kamphuis *et al.* 1984). L'activité enzymatique à large spectre a été démontrée par la papaine, dans la gamme de pH 5-8 et à une température de 65°C (Smith & Hong-Shum 2011).

Elle est très stable, malgré des températures élevées (Amri & Mamboya 2012). Cette protéase à cystéine est une endopeptidase activée par les thiols et les réducteurs (cystéine, thiosulfate, glutathion). Elle est inactivée par les ions métalliques, les oxydants et les réactifs qui réagissent avec les thiols (Bruneton 2009).

### 8.1.3. Mécanisme d'action de papaïne

Le mécanisme général de l'action de la protéase de la cystéine a été très bien étudié, avec la papaïne comme enzyme modèle. L'activité enzymatique de la papaïne est exercée par une dyade catalytique formée par des résidus Cys25 et His159, qui, dans l'intervalle d'un pH de 3,5 à 8,0, forment une paire d'ions (Figure 04). Asn175 est important pour l'orientation de l'anneau imidazolium de l'histidine, dans la fente catalytique. Le groupe réactif thiol de l'enzyme doit être dans la forme réduite, pour l'activité catalytique. Ainsi, les protéases à cystéine nécessitent un environnement plutôt réducteur et acide, pour être actif. La formation d'une portion intermédiaire, S-acyl enzyme, est une étape fondamentale dans l'hydrolyse. Cet intermédiaire est formé par attaque nucléophile, du groupe thiolate du résidu de cystéine sur le groupe carbonyle de la liaison amide hydrolysée (ester), avec la libération du fragment C-terminal du produit fendu. Dans la prochaine étape, une molécule d'eau réagit avec l'intermédiaire, le fragment N-terminal est libéré, et la molécule de cystéylprotéase régénéré libre peut commencer un nouveau cycle catalytique (Grzonka *et al.* 2007 ; Benkahoul 2016)



**Figure 04** : Mécanisme enzymatique de l'hydrolyse protéique par les protéases à cystéine (Grzonka *et al.* 2007).



La papaïne a une enzyme à large spectre d'activité, sur une large plage de pH et de température et clivant à la base, les acides aminés ou ceux ayant de grandes chaînes latérales hydrophobes. Les peptides résultants, ayant des acides aminés hydrophobes terminaux peuvent donner un produit, d'arrière-goût amer (Payne 2009). La papaïne est stable et active, pendant plusieurs mois, dès lorsqu'elle est entreposée à 4°C. Une diminution de l'activité, pendant le stockage, est due à l'oxydation du groupe thiol du site actif. Cette oxydation peut être partiellement renversée par des réactifs thiols (cystéine, mercaptoéthanol, dimercaptopropanol, etc.) (Grzonka *et al.* 2007).

#### **8.1.4. Utilisation de la papaye et la papaïne**

Sur le plan économique, la *Carica papaya* est l'espèce la plus importante, au sein des *Caricaceae*, cultivée largement pour être consommée comme fruit frais et utilisée dans les boissons, les confitures, les gelées, les glaces, les tartes et les fruits séchés et cristallisés (Villegas 1997). Nutritionnellement, le fruit de la papaye mûre est une bonne source de calcium et une excellente source de vitamines A et C (Nakasone & Paull 1998).

Le fruit de papaye non mûr a une haute teneur en latex qui peut le rendre impropre à la consommation brute bien que la papaye verte brisée crue est souvent utilisée dans les salades asiatiques. Les fruits verts, s'ils sont pelés, ensemencés et cuits, sont utilisés dans une variété de plats asiatiques savoureux, tels les cornichons et les chutneys et pour la mise en conserve dans le sirop de sucre (Morton 1987). Les feuilles et les fleurs peuvent aussi être utilisées comme légumes cuits (Facciola 1990; Watson 1997). Les jeunes feuilles sont cuites et consommées comme les épinards, dans les Indes orientales. Des pulvérisations de fleurs mâles sont vendues, sur les marchés asiatiques et indonésiens et en Nouvelle-Guinée pour être bouillies et consommées comme légumes (Morton, 1987). Les graines de papaye ont un goût poivré et peuvent être séchées dans un déshydratateur puis broyées dans un mortier et utilisées comme poivre (Australia 2007). La papaye a également plusieurs usages industriels. Biochimiquement, ses feuilles et ses fruits sont complexes, produisant plusieurs protéines et alcaloïdes, avec d'importantes applications pharmaceutiques et industrielles (El Moussaoui *et al.* 2001).

Les indigènes des pays tropicaux emploient, depuis fort longtemps, la papaïne pour attendrir les viandes. Ils ont coutume d'envelopper avant cuisson, la viande dans des feuilles de papayer. Le latex contenu dans ces feuilles digère, ainsi la viande très superficiellement. Un autre procédé consiste à faire bouillir la viande avec des morceaux de papaye verte. La papaïne agit, là aussi faiblement, car elle résiste mal à la chaleur, en solution. Cet emploi de la

papaïne a été repris aux U.S.A, on trouve dans le commerce des solutions de papaïne, dans de l'eau en général acidifiée, par de l'acide lactique. Il suffit d'en badigeonner le morceau de viande à attendrir. La papaïne s'oxyde rapidement en solution aqueuse, et l'action de ces attendrisseurs est très modérée (Huet 1956).

La papaïne se caractérise par la propriété de provoquer, à dose très faible, la dissociation d'une quantité importante de protéines en molécules plus simples, et, finalement, en acides aminés. Elle provoque, d'autre part, comme la présure, et bien d'autres enzymes protéolytiques animale ou végétale, la coagulation du lait (Balls *et al.* 1940).

Pendant de nombreuses années, la papaïne a été utilisée pour décomposer des fibres dures (Eshamah *et al.* 2014). Cette enzyme est principalement utilisée, par l'industrie chimique, en brasserie pour la stabilisation de la bière (Starley *et al.* 1999) et dans les industries traitant des substances protéiques, comme le cuir, la soie, et la laine (Huet, 1954). La papaïne a été, également, utilisée pour fabriquer l'extrait de levure et les protéines d'organismes unicellulaires. La papaïne trouve aussi une utilisation, dans la fabrication de milieux microbiologiques (Sumantha *et al.* 2006).

Cependant, commercialement, la papaïne a des utilisations diverses. Dans la biotechnologie alimentaire, la papaïne est utilisée dans la production de gommages à mâcher, dans la préparation de concentrés de protéines de poisson pour l'alimentation animale, dans le développement d'arômes de rôti de viande par hydrolyse partielle de protéines, dans la production de légumineuses et de haricots déshydratés et pour l'amélioration de l'indice de dispersabilité des protéines, de la farine de soja (Morton, 1987).

## 8.2. Ficine

### 8.2.1. Description de la plante de figuier

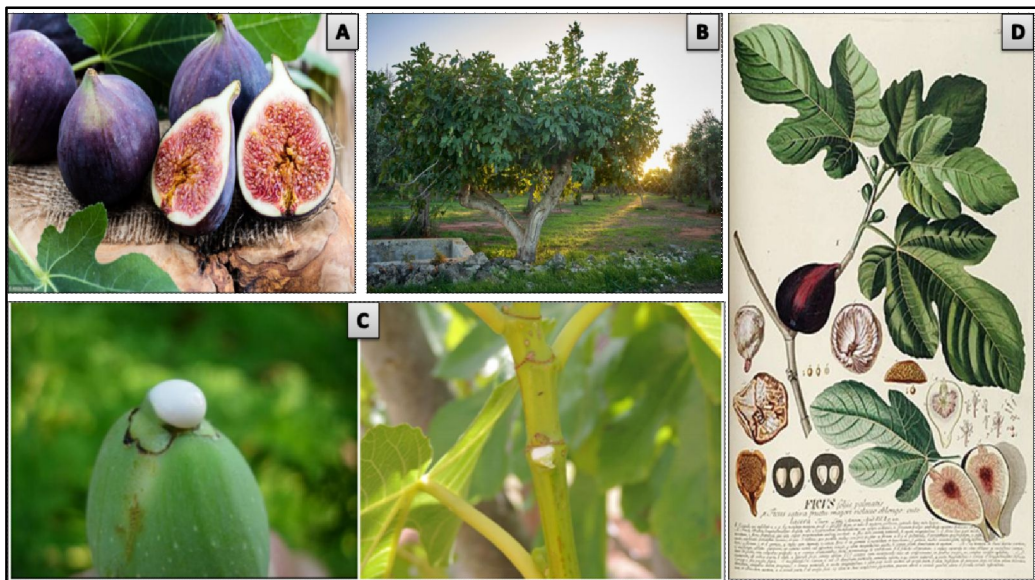
**Le figuier** (*Ficus carica* L.) est un arbre de la famille des moracées, qui est l'emblème du bassin méditerranéen où il est cultivé depuis des millénaires (El Khaloui 2010). Le *Ficus Carica* a un qualificatif générique qui signifie verrue pour *Ficus* (le lait du figuier pour soigner la verrue) et *Carica* faisant allusion à une région, en Turquie (Oukabli 2003).

Le figuier, espèce fruitière cultivée pour la production de la figue fraîche ou sèche, est l'une des premières cultures de l'homme connu depuis l'antiquité, dont la culture remonte à plus de 5 000 ans, avant notre ère (Lim 2015). Dans le saint Coran, le figuier est gratifié de toute une sourate « Atteen » où le Seigneur jure : « *Par le figuier et l'olivier* » (Coran 95 :1), ce qui a contribué à le sacrifier dans la société musulmane (Chaker 1997).

Le figuier (Figure 05B) est un arbrisseau (4-5m) ou petit arbre (8-10m), en conditions favorables ((Tonelli & Gallouin 2013), avec de nombreuses branches du déploiement et un tronc d'un diamètre de plus de 213.36 cm (Chawla *et al.* 2012). Les rameaux étant rigides, le bois de figuier est fragile et le tronc porte souvent de grands nœuds (Raj & Joseph 2011). Cet arbre est de forte capacité de régénération végétative et de forte productivité (Tonelli & Gallouin 2013).

Les feuilles : caduques (Starr *et al.* 2003), vertes, alternées (figure 5D), palmés, inodores avec un goût légèrement amer (Chawla *et al.* 2012), elles sont de 7 à 9 cm de longueur et de 4 à 6 cm de largeur, ovales ou orbiculaires (Patil & Patil 2011).

Les fleurs ne sont pas visibles à l'extérieur, enfermées dans une sorte d'urne appelée sycone qui possède une ouverture, l'ostiole, qui s'ouvre à l'opposé du court pédoncule portant les figues (Bachi 2012).



**Figure 05 :** Arbre (A) et fruit (B), Latex (C) et feuilles (D), de *Ficus carica*.

Le fruit est solitaire et sessile sur la branche, sa couleur varie du vert, jaune, rouge-pourpre au noir, de forme pyramidale, souvent arrondi, 5-8 cm de haut (Starr *et al.* 2003). La figue est en réalité un réceptacle de forme concave où sont fixées un grand nombre de fleurs unisexuées. Elle est une sorte de petit sac charnu contenant un orifice, l'ostiole, hermétiquement clos par des bractées imbriquées. Les véritables fruits sont les innombrables petits grains qui parsèment la chair de la figue, ce que l'on appelle «akènes» (Bachi 2012).

La figue n'est pas un vrai fruit, composé d'une pellicule (épiderme), une pulpe composée d'un réceptacle charnu (le synconium), contenant les graines (akènes), un ostiole

(œil) et un pédoncule (Figure 5A) (Haesslein & Oreiller 2008). La peau de la figue est mince, tendre, blanchâtre, pale, jaune, rose, rouge ou pourpre dépendant de la variété. À maturité, la figue est un fruit sucré, doux, délicieux et juteux (Lansky & Paavilainen 2011).

Le figuier produit des fruits, sans production de fleurs visibles. Sa production est de deux types : figues de première récolte ou figues fleurs (El- Bacoor) et figues de deuxième récolte figue d'automne (Karmoss). Les figues fleurs sont formées sur les rameaux défeuillés de l'année précédente. Elles passent l'hiver au stade graine de poivre, pour reprendre leur développement au printemps. Elles ne nécessitent pas de pollinisation (Azzi 2012).

Les figues d'automne sont formées, à l'aisselle des feuilles des rameaux en croissance. Certaines espèces ne produisent que les figues d'automne et sont appelées «Unifères». D'autres donnent en plus, une production de figues fleurs et sont de types «Bifères» (Ouakbli 2013). Le figuier craint le froid et il est déconseillé de planter des figuiers, à des fins commerciales, dans les régions où la température d'hiver descend, au-dessous de 5°C. Une plantation a en moyenne 100 arbres /hectare et produit 5-8 tonnes /hectare. La production débute à la quatrième année et atteint sa plénitude à la douzième année (Espiard 2002).

Le latex (Figure 05C) est un liquide visqueux de couleur blanche. Il est largement distribué dans la plante (Kim *et al.* 2003). Par incision du tronc, le latex est recueilli. Il coagule rapidement, filtré puis desséché, il constitue la ficine brute (Bruneton 2009). Ainsi, le latex est constitué de caoutchouc, de résine, d'albumine, de sucre, d'acide malique, d'enzymes protéolytiques (diastase, estérase, lipase), la catalase et la peroxydase (Raj & Joseph 2011).

### **8.2.2. Caractéristique et structure de la ficine**

La ficine (EC 3.4.22.3), appelée également ficain, elle fait partie de la famille des endopeptidases à cystéine (Azarkan *et al.* 2011). Elle compte 210 acides aminés, avec un poids moléculaire compris entre 20 et 35 KDa (Shah *et al.* 2014). Payne (2009) a estimé que sa masse moléculaire est comprise entre 25 et 26 KDa. Son site actif est constitué de deux acides aminés, qui sont la cystéine (Cys-25) et l'histidine (His-159) (Feijoo-Siota *et al.* 2011). Le fractionnement et la purification par chromatographie échangeur d'ion ont donné 5 isoformes de ficine (A,B,C, D1 et D2) (Azarkan *et al.* 2011). La séquence d'acides aminés déterminée pour les résidus du site actif ressemble de près, à la séquence correspondante dans la papaïne ((Devaraj *et al.* 2008; Devaraj *et al.* 2011). Les enzymes protéolytiques présents, dans le latex du figuier peuvent être divisées en deux groupes : le premier inclut ceux qui

contiennent une haute activité coagulante du lait, mais une activité protéolytique faible et le second possède un effet protéolytique très important (Whitaker 1972; El-Shibiny *et al.* 1973)

La ficine présente une grande stabilité thermique. Sa température d'activité est comprise entre 67 et 77°C (Nassar & Newbury 1987). Selon Siar *et al.* (2017), elle est de 75°C, alors que Kortt *et al.* (1974) ont rapporté une température optimale comprise entre 45 à 65°C. D'autre part, Sugiura & Sasaki (1974), Deveraj *et al.* (2008) et Gagaoua *et al.* (2014) ont signalé dans leurs travaux, que la température d'activité optimale de la ficine est de 60°C. Cependant, Grzonka *et al.* (2007), ont rapporté que la ficine a également la température la plus basse, de l'inactivation des autres protéases végétales d'environ 70°C. Selon Polaina & MacCabe (2007), la ficine est active à pH neutre et son inactivation complète se produit en dessous de pH 3,0. Le pH optimal de la ficine est de 5,0 à 8,0. Le tableau 4 représente une comparaison entre les valeurs des paramètres optimaux d'activité, la température et le pH, de la ficine de quelques travaux publiés.

**Tableau 04 :** Comparaison des paramètres optimaux d'activité températures et pH de la ficine dans la littérature

Sources	Température optimale (°C)	pH optimal	Références
<i>Ficus glabarta</i>	45-65	5-8	Kortt <i>et al.</i> 1974
<i>Ficus carica cv. haraishi</i>	60	8	Sugiura & Sasaki 1974
<i>Ficus carica</i>	67-70	-	Nassar & Newbury 1987
<i>Ficus racenosa</i>	60	4.5-6.5	Deveraj <i>et al.</i> 2008
<i>Ficus carica</i>	-	7	Deveraj <i>et al.</i> 2008
<i>Ficus carica</i>	60	6.5	Gagaoua <i>et al.</i> 2014
<i>Ficus carica</i>	75	5	Siar <i>et al.</i> 2017

### 8.2.3. Mécanisme d'action de la ficine

Ficine ou ficaine, est le nom donné pour l'enzyme protéolytique (endopeptidases) isolée, à partir de latex des arbres du genre *Ficus*. Elle appartient à la famille des protéases à cystéine, c'est-à-dire, son mécanisme catalytique implique un groupe de cystéine dans son site actif (González-Rábade *et al.* 2011). Les protéases de *Ficus carica* ont montré une large

spécificité vers les acides aminés basique et neutres :Gln, Val, Leu, Ala, Arg, His, Ser et Asn et une préférence pour le résidu hydrophobe en position P1 (Di pierro *et al.* 2014). Englund *et al.* (1968) ont démontré que la ficine obtenue à partir du latex de *Ficus glabrata*, hydrolyse préférentiellement les liaisons peptides suivant un résidu aromatique. La ficine intervient sur les protéines au niveau de résidus des acides aminés: Tyr, Phe et Val (Payne, 2009).

#### **8.2.4. Utilisation de la figue et de la ficine**

La figue peut être consommée sous forme fraîche, grillée ou séchée, elle servait déjà, comme un agent sucrant, d'édulcorant, bien avant que le sucre ne soit connu. L'industrie accorde une grande importance à la figue pour ses utilisations diverses. Elle peut être séchée et /ou transformée en plusieurs produits tels que la confiture, et les sirops. La figue se caractérise par la présence de latex qui est séché et transformé en poudre, et utilisé pour la coagulation du lait (Jeddi 2009).

Les protéases végétales ont été employées, depuis l'antiquité. On indique que le latex du figuier est utilisé pour la fabrication du fromage et comme un antihelminthique (Shah *et al.* 2014). En Italie, la ficine est utilisée pour la fabrication d'un fromage traditionnelle le Cacioricotta (Faccia *et al.* 2012). Selon Öner & Akar (1993), la ficine peut remplacer avec succès, la chymosine dans la fabrication de fromage. En Algérie, plus exactement dans la région de kabylie, le latex brut est utilisé traditionnellement, dans un produit laitier appelé AGUGLI ou IGUISSI ; ce dernier a une texture semblable à celle du yaourt avec un goût doux, facilement préparé, en ajoutant quelques gouttes de latex au lait de chèvre (Gagaoua *et al.* 2014 ; Ziane *et al.* 2014).

La ficine est aussi utilisée pour l'attendrissement de la viande, en montrant moins d'activité contre tous les types les protéines, une fois comparée avec la papaïne et au bromelaine. Cette protéase à thiol, bien que, capable de la dégradation minimale du collagène et de l'élastine, dégradera préférentiellement la protéine myofibrillaire. La ficine peut dégrader l'élastine à température aussi basse (20°C), tandis qu'elle a peu d'activité contre le collagène et les protéines myofibrillaires, au-dessous de 40°C (Payne, 2009).

### **8.3.Pepsine**

#### **8.3.1. Définition**

La pepsine a été d'abord classée parmi les protéases, puis parmi les endopeptidases. Hartley (1960) a proposé de la faire figurer, dans la classe des protéases acides, en raison de son pH optimum d'activité (Banga-Mboko *et al.*2002). Elle est extraite de l'estomac des



mammifères adultes ou des proventricules de volailles (Yamamoto 1975) et a été détectée dans les jus gastriques des oiseaux, amphibiens et poissons (Pletschke *et al.*1995b).

La pepsine est l'enzyme digestive principale dans l'estomac des animaux (Nalinanon *et al.* 2010). C'est une protéase à acide aspartique, qui aide dans la digestion des protéines chez les animaux (Simpson, 2000). Comme enzyme active, la pepsine peut être trouvée principalement dans le suc gastrique d'estomac (Effront *et al.* 2007). Avec cette protéase, les liaisons peptidiques peuvent être aisément clivées et des protéines ingérées peuvent être dégradées, dans des conditions acides (Simpson 2000). Selon Zhao (2011), l'effet du jus d'estomac, en cours de la digestion a été noté pour la première fois par Réamur, en 1752. À peu près au même moment, Spallanzani a découvert la capacité de jus pour digérer la viande, qui a lancé une base importante pour l'étude de la pepsine (Effront *et al.* 2007). En 1836, elle a été découverte pour la première fois par Theodor Schwann, qui l'a nommée, «pepsine» qui signifie «digérer». En 1930, la pepsine cristallisée était isolée, par John H. Northrop et identifiée, comme protéine pour la toute première fois (Aehle 2007).

Le pepsinogène est le précurseur de la pepsine (Kerboeuf *et al.*2002), pro enzymes inactives (zymogènes) des pepsines. Leur masse moléculaire est de 42.000 et 35.000 Da, respectivement pour les pepsinogène et les pepsines. On dénombre plusieurs formes de pepsinogène différenciables biochimiquement. Toutes ces formes sont synthétisées et sécrétées par les cellules principales de la muqueuse gastrique. Après leur sécrétion, elles sont converties en pepsine correspondante, par l'acide chlorhydrique sécrétée par les cellules bordantes ou pariétales de la muqueuse gastrique. Les pepsines sont les seules formes enzymatiques participant à la digestion des protéines alimentaires, au niveau de l'estomac (Banga-Mboko *et al.*2002).

### **8.3.2. Activation du pepsinogène en pepsine**

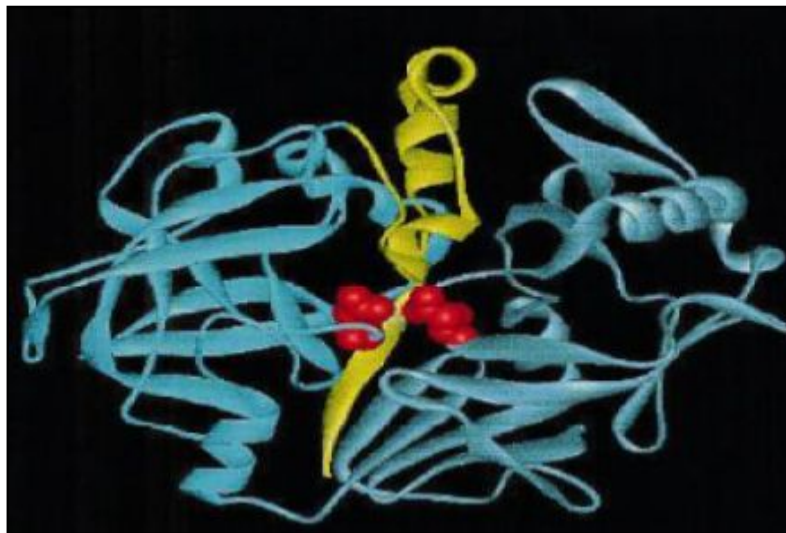
La pepsinogène est convertie, rapidement en pepsine dans un milieu acide, par un processus d'autocatalytique accompagné par l'enlèvement d'un fragment de 42 à 47 acides aminés de son N-Terminal (Pletschke *et al.*1995a). Le mécanisme d'activation de pepsinogène, en pepsine implique une série de réactions compliquées. À son N-terminal, le pepsinogène de zymogène contient un pro-segment supplémentaire, d'une séquence d'environ 44 acides aminés qui stabilise la forme inactive et prévient la combinaison du substrat et du site actif (Richter *et al.*1998). A pH acide (au-dessous de 5), l'interaction électrostatique et les liaisons peptidiques, entre le pro-segment et l'enzyme active sont interrompues. La conformation du pro-segment est transformée, en menant à la libération ultime du pro-segment

du site actif et par conséquent donne la forme active de la pepsine (Nalinanon *et al.* 2010). Les pepsines nouvellement obtenues peuvent cliver protéolytiquement des pro-segments de pepsinogène supplémentaire, en créant par conséquent, plus de pepsine (Sanny *et al.* 1975).

Le rôle principal de la pepsine dans la protéolyse des protéines est la dégradation des acides aminés aromatiques, tels que le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine, à partir du N-terminal des protéines (Raufman 2004).

### 8.3.3. Caractéristiques et structure de la pepsine

En tant que membre de la famille aspartique, la pepsine possède plusieurs propriétés spéciales, notamment: (a) des résidus d'aspartate pour la catalyse des substrats, (b) une dégradation des protéines à pH acide et (c) une structure tertiaire typique (Zhao 2011).



**Figure 06 :** Structure tertiaire du pepsinogène de porc (Richter *et al.*, 1998). Le fragment de l'enzyme active est représenté en bleu, le pro segment (résidus peptidiques fixés en N terminal de l'enzyme active) en jaune et les deux sites actifs à aspartate en rouge

La pepsine EC (3.4.23.1) consiste, en un résidu d'environ 327 acides aminés, sa structure tertiaire a été déterminée à haute résolution (Ying *et al.* 2015). C'est un peptide à chaîne simple, avec très peu d'enroulement hélicoïdal (Figure 06), comme évaluée par des mesures de dispersion rotative (Herriot 1962). Dans des conditions neutres, la pepsine et le pepsinogène sont tous deux assez stables et maintiennent leurs structures moléculaires naturelles. Dans des conditions acides (plage de pH de 1,5 ~ 2,5), le pepsinogène est transformé en pepsine. Alors que dans des conditions alcalines, la structure de la pepsine est facilement détruite et son activité est perdue (Zhao 2011). Selon Raisonier (2004), le pH



optimum d'action de la pepsine se situe entre 1,8 et 4,4 et elle est inactivée par les bicarbonates alcalins du suc pancréatique.

#### 8.3.4. Types de pepsine

La classification de la pepsine et du pepsinogène dépend principalement des caractéristiques et des propriétés des enzymes. Les caractéristiques importantes incluent : (a) l'activité, qui peut être influencée par le pH, la température et les inhibiteurs, (b) la stabilité (c) la cinétique (EL-Beltagy *et al.* 2004).

Les pepsines ou les pepsinogènes ont été classées, selon l'importance de l'activité protéolytique de ses produits activés par des lettres de l'alphabet. On dénombre actuellement quatre formes de pepsinogènes appelées pepsinogènes A, B, C et D. Les pepsines A ont une grande activité protéolytique, tandis que les pepsines B et C sont moins actives. La classification la plus récente est celle proposée par l'unité internationale de la biochimie qui regroupe l'ensemble des enzymes, à l'aide d'un système de numérotation enzyme commission dans lequel EC (3.4.23) est le suffixe commun, suivi du chiffre 1 pour le pepsinogène A (EC3.4.23.1), 2 pour le pepsinogène B (EC 3.4.23.2) et 3 pour le pepsinogène C ou gastricsin (EC 3.4.23.3) (Banga-Mboko *et al.* 2002).

Les pepsinogènes (PG) des mammifères sont divisés en deux groupes, le groupe principal qui comprend PG-A, PG-C (ou progastricsine) et PG-Y (ou prochymosine) et le groupe mineur, comprenant le PG-B et PG-F. La pepsine correspondante pour chaque type de pepsinogène est également exprimée et étiquetée avec les lettres A à F. (Foltmann 1981 ; Kageyama 2002).

Quelques chercheurs ont suivi le concept adopté pour les mammifères et ont indiqué le pepsinogène de poissons, comme PG-A, PG-B et PG-C et sa forme active comme pepsine A, pepsine B et pepsine C (Gilberg & Raa 1983 ; Klomklao *et al.* 2007; Feng *et al.* 2008). D'où la preuve, qu'il existe, jusqu'à quatre types de pepsines chez les poissons (pepsine I, pepsine II, pepsine III et pepsine IV), dérivées de la conversion de différents PG (PG-I, PG-II, PG-III et PG-IV), et chaque type a ses propres caractéristiques et propriétés enzymatiques (Tanji *et al.* 2007 ; Bougateg *et al.* 2008 ; Zhou *et al.* 2007 ; Wu *et al.* 2009).

Donta & Van Vinakis (1970) ont pu séparer trois pepsinogènes de poulet (A, B et C) et leurs pepsines correspondantes présentent des différences dans la composition en acides aminés.

### 8.3.5. Sources de pepsine

La pepsine peut être trouvée chez les animaux invertébrés et vertébrés. Chez les mammifères, d'où l'endroit principal est l'estomac, y compris la membrane et le suc gastrique. Indépendamment de l'estomac, la pepsine peut également être détectée, dans des quantités limitées dans le sang, le muscle et l'urine (Effront *et al.* 2007). Elle peut également être trouvée dans les ovaires (pepsine de truite de ruisseau) et la peau (pepsine de pufferfish) des espèces de quelques poissons (Bobe & William Goetz, 2001 ; Kurokawa *et al.* 2005).

La pepsine a été isolée et étudiée chez divers mammifères, y compris chez l'homme (Sogawa *et al.* 1983), le singe (Kageyama & Takahashi 1980), le porc (Foltmann *et al.* 1995), le dromadaire (Abuharfeel & Abuereish 1984), les bovins (Chow & Kassel 1968), le rat (Muto & Tani 1979), le lapin (Kageyama & Takahashi 1984) et les poissons (de Melo Oliveira *et al.* 2014).

#### 8.3.5.1. Pepsine bovine

La pepsine bovine est extraite à partir des caillettes des veaux sevrés et se compose de deux pepsines I et II. Elle a un poids moléculaire de 33,4 KD (Brown & Ernstrom 1988). L'extrait brut contient un pepsinogène majoritaire et plusieurs pepsinogènes mineurs qui donnent après activation, à pH 2,0 la série de pepsines correspondant (Chow & Kassel 1968).

#### 8.3.5.2. Pepsine porcine

L'extraction et l'utilisation de la pepsine porcine ont débuté, durant la première guerre mondiale, pour pallier une pénurie de la présure, mais n'a été réellement industrialisée, qu'à partir des années 60 (Ernstrom 1983).

Les pepsinogène porcins ont été identifiés, dans la muqueuse gastrique et dans le sang. (Banga-Mboko *et al.* 2002). Selon Ryle & Hamilton (1966), les poids moléculaires de la pepsine et son zymogène obtenus, à partir de l'analyse des acides aminés sont respectivement 36KDa et 41KDa. L'extrait brut de la pepsine contient dans la majorité de la pepsine A et des composés mineurs correspondants aux pepsines B, C et D. (Cuvelier 1993).

#### 8.3.5.3. Pepsine cameline

La pepsine cameline a été isolée et caractérisée par Abuharfeel & Abuereish (1984), ainsi qu'AL-Mzaien (2007). Ces auteurs ont mis en évidence l'existence de deux iso-enzymes: la pepsine I et la pepsine II, dans la muqueuse gastrique cameline. Leurs poids moléculaires respectifs sont estimés par électrophorèse SDS-PAGE à 35,5 et 34,7KDa

(Abuharfeel & Abuereish 1984) et par chromatographie de perméation à 35 et 36,5KDa (AL-Mzaien 2007). La pepsine I a été inactivée, à une vitesse plus rapide que celle de la pepsine II à un pH=8 et à 0°C et à pH 7.5 et 37 °C ; mais tous les deux ont été dénaturées, dans ces conditions. (Abuharfeel & Abuereish ,1984).

#### **8.3.5.4. Pepsine de singe**

Selon les travaux de Kageyama & Takahashi (1976), cinq pepsinogènes ont été purifiés, à partir de la muqueuse gastrique du singe japonais par chromatographie sur colonne DEAE-cellulose et filtration sur gel Sephadex G-100. Chacun s'est révélé homogène par électrophorèse, sur gel de Polyacrylamide. Ils ont été appelés pepsinogènes I, II, III-1, III-2 et III-3, respectivement, sur la base du profil d'élution par chromatographie sur DEAE-cellulose. Les poids moléculaires des pepsinogènes I et II étaient respectivement de 48KDa et 43 KDa et ceux des trois autres de 40KDa. Quatre ans plus tard, les mêmes auteurs ont pu purifier du mucus gastrique du singe crabe-mangeant (*Macaca fascicularis*) huit pepsinogène. Les poids moléculaires étaient 43 KDa, pour les pepsinogène A-1 et B-1, 38 KDa pour le pepsinogène C et 40 KDa pour les autres pepsinogène. Chacun a été activé en pepsine par acidification à pH 2. (Kageyama & Takahashi 1980).

#### **8.3.5.5. Pepsine de poisson**

Selon Zhao *et al.* (2011), les viscères du poisson constituent 5% du poids et sont des sources potentielles de protéines, avec des propriétés enzymatiques appréciables dans ce marché, parmi eux, la pepsine (EC 3.4.23.x) qui a au moins cinq iso formes. Selon l'espèce et aussi, dans la même espèce, des valeurs différentes de poids moléculaire peuvent être trouvées généralement entre 25 et 35 kDa (de Melo Oliveira *et al.* 2014). Les pepsines A et B ont montré une activité maximale à pH 3.0 et 3.5, respectivement, et avaient la même température optimale à 45°C, par utilisation de l'hémoglobine, comme substrat. Les deux pepsines sont stables dans la gamme de pH 2 – 6, mais instables aux températures supérieures à 40°C (Klomklao *et al.* 2007).

#### **8.3.5.6. Pepsine de tortue**

Le pepsinogène a été purifié du mucus gastrique de tortue, à carapace molle (*Sinensis Trionyx*) par une série de chromatographies, avec une masse moléculaire relative et approximative à 43 KDa (Hirasawa *et al.* 1996).

### 8.3.5.7. Pepsine de rat

Muto et Tani (1979), ont purifié deux pepsinogène (Pepsinogène I et II), à partir de la muqueuse gastrique du rat adulte. Les enzymes activées ; pepsines I et II, avaient le même poids moléculaire de 35 KDa. Le pH optimal pour les deux enzymes était 2 et ont montré une stabilité élevée à pH 8.0, cependant ils ont perdu leurs activités après 60 min, à pH 10. Ces résultats suggèrent que les pepsines I et II du rat sont très semblables.

### 8.3.5.8. Pepsine de canard

Le pepsinogène et la pepsine obtenus, à partir des estomacs glandulaires des canards fraîchement abattus ne sont relativement pas stables, dans les milieux alcalins, puisque le pepsinogène est inactivé à pH 12.1 et la pepsine à pH 9.6. L'activité de la pepsine de canard peut être stoppée par l'ester méthylique de L-no leucine, la pepstatin. Le pH optimal de la pepsine de canard déterminé en présence du substrat synthétique est de 4 (Pichov & Kostka 1990).

### 8.3.5.9. Pepsine d'autruche

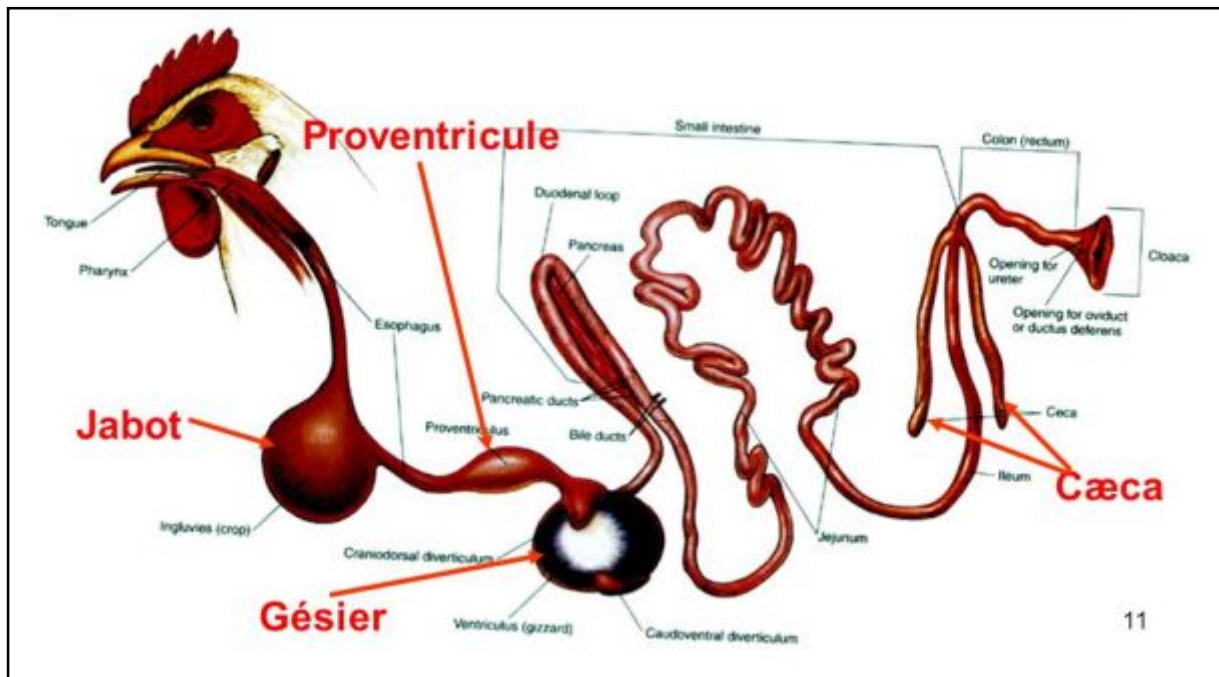
La pepsine d'autruche a été isolée et épurée, à partir du proventricule d'autruche, sous la forme de deux pepsinogène (I et II), dont le pepsinogène I étant légèrement plus petit avec un total de 356 résidus comparé à 371 pour le pepsinogène II (Pletschke *et al.* 1995b).

### 8.3.5.10. Pepsine de poulet

La pepsine du poulet est extraite du proventricule ou ventricule succenturié qui est un renflement fusiforme de 3 cm de long en moyenne, revêtu d'un épithélium de cellules cylindriques, situé légèrement à gauche, dans la cavité abdominale entre le jabot et le gésier (Figure 07) (Alamargot 1982 cité par Adoui 2007). 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 à pH 2 à 4. (Donta & Vanvunakis 1970).

Bohak (1969) estime que le pepsinogène de poulet a un poids moléculaire de 43KDa, avec 387 résidus d'acides aminés, alors que la pepsine purifiée a un poids moléculaire de 35 KDa et 308 résidus d'acides aminés. Green & Llewellyn (1973) ont confirmé la présence d'au moins cinq pepsinogène dans un extrait brut de l'estomac de poulet. L'un d'eux a été purifié, par ces auteurs, et a pu être activé pour donner une seule pepsine. Les poids moléculaires du pepsinogène et de la pepsine étaient respectivement de 36 KDa et 34KDa. Ils ont également

rapporté que le point isoionique de la pepsine était proche de pH 4,0 et que l'enzyme était stable pendant de longues périodes, à des valeurs de pH allant jusqu'à 7,0.



**Figure 07** :L'appareil digestif chez le poulet (<http://www.syriavet.com>)

Bohak (1969) estime que le pepsinogène de poulet a un poids moléculaire de 43KDa, avec 387 résidus d'acides aminés, alors que la pepsine purifiée a un poids moléculaire de 35 KDa et 308 résidus d'acides aminés. Green & Llewellyn (1973) ont confirmé la présence d'au moins cinq pepsinogène dans un extrait brut de l'estomac de poulet. L'un d'eux a été purifié, par ces auteurs, et a pu être activé pour donner une seule pepsine. Les poids moléculaires du pepsinogène et de la pepsine étaient respectivement de 36 KDa et 34KDa. Ils ont également rapporté que le point isoionique de la pepsine était proche de pH 4,0 et que l'enzyme était stable pendant de longues périodes, à des valeurs de pH allant jusqu'à 7,0.

Donta & Van Vinakis (1970) ont pu séparer trois pepsinogène de poulet (A, B et C). L'activité catalytique de la pepsine de poulet est la plus élevée entre pH 1,5 et 4,5 avec un optimum à 2,8 en utilisant l'hémoglobine comme substrat (Bohak, 1969).

### 8.3.6. Utilisation de la pepsine

L'intestin de poulet est un sous-produit d'industrie de volaille, qui pourrait servir de source importante des protéases aspartiques, et particulièrement être employées comme alternative pour des protéases actuellement utilisées dans les industries alimentaires (Jamdar

& Harikumar 2016). La pepsine est l'une des protéases d'origine animale qui a fait l'objet d'expérimentation, en vue d'une utilisation potentielle en industrie fromagère, comme succédané de la présure. En effet, les pepsines de quelques espèces telles que la pepsine bovine, est déjà employée, depuis les années 60. (Ramet 1997). 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 Takamérite. Il s'agit ici de la pepsine de poulet. Cette pepsine étant l'unique enzyme sécrétée par les glandes gastriques des proventricules «estomac chimique du poulet » (Larbier & Leclercq 1992 cité par Krid 2013). Les résultats obtenus par Krid (2013) montrent une possibilité d'utilisation de la pepsine de poulet, dans la coagulation du lait comme substitut de présure.

La pepsine qui est utilisée dans l'extraction de collagène pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique et largement adopté, dans la recherche médicale pour règlement de digestion (de Melo Oliveira *et al.*, 2014). Le collagène peut être isolé, à partir des pieds de poulet ou du bœuf en employant de la pepsine de poulet, dans une solution d'acide acétique à 4°C pour 24h avec un rendement de 22.94%, par poids sec (Hashim 2014).

Les acides nucléiques et leurs métabolites jouent des rôles critiques, dans des processus physiologiques et biologiques. Liu *et al.* (2016) ont employé la pepsine du poulet, dans la digestion des acides nucléiques, couramment employés, comme suppléments diététiques, en alimentation de volaille pour fournir les aliments essentiels pour la santé et la croissance. L'enzyme est aussi utilisée dans la production de silage du poisson, dans l'utilisation des sous-produits de l'industrie de poisson et dans l'industrie de l'alimentation animale, pour améliorer la digestibilité des protéines. Elle est considérée comme une protéase prometteuse, avec application industrielle avec des techniques d'extractions et de purifications efficaces et plus développées (de Melo Oliveira *et al.* 2014).

La pepsine peut être employée dans d'autres secteurs industriels, par son application dans la préparation des hydrolysats caséiniques. 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'intérêt biologique ou technologique. En outre, elle peut contribuer à la diminution de l'allergénicité, causée par les protéines du lait par hydrolyse de la  $\beta$ -lactoglobuline principalement (Krid 2013).

## 9. Extraction et purification des protéases utilisées dans l'attendrissement des viandes

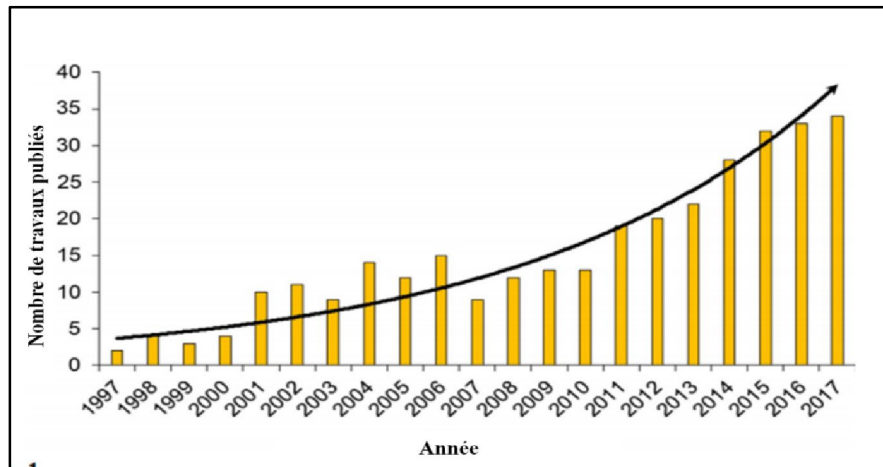
À ce jour, un certain nombre de méthodes ont été développées, pour l'isolement et la production de composés bioactifs de différentes matrices naturelles impliquées dans diverses techniques d'extraction (Gil-Chávez *et al.* 2013; Grilo *et al.* 2016), notamment, l'extraction au solvant (SE), l'extraction liquide sous pression (PLE), l'extraction sous-critique d'eau (SWE), l'extraction par fluide supercritique (SFE), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction assistée par ultrasons (EAU), l'extraction assistée par enzyme (EAE) et les systèmes aqueux à deux phases (ATPS). De plus, de nombreuses techniques de purification avancées, y compris l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF), la chromatographie échangeuse d'ion (CEI), la chromatographie par filtration sur gel (GFC) et la chromatographie d'affinité (AC) ont ensuite été appliquées pour purifier davantage les molécules souhaitées (Akin *et al.* 2012; Bucar *et al.* 2013). Cependant, ceux-ci ont rapporté que ces techniques sont généralement coûteuses et prennent du temps, nécessitant d'énormes quantités de solvants organiques. L'exposition de l'extrait présente un risque de dégradation ou de modification de certains des constituants avec des protocoles, en plusieurs étapes. De plus, les nombreuses techniques actuelles nécessitent des équipements à fort investissement et des frais de maintenance. À la lumière de ces aspects, il existe un besoin croissant, dans le domaine de la recherche, en vue d'une solution rapide, verte, efficace, polyvalente, et peu coûteuse pour la récupération et la purification de grandes quantités de molécules bioactives (Yan *et al.* 2018).

Le système de répartition en trois phases ou *Three-phase partitioning* TPP, une technique décrite pour la première fois par le groupe de Lovrien en 1972 (Tan & Lovrien 1972), a été employée, pour purifier plusieurs macromolécules et, devenant actuellement, un outil de bio-séparation polyvalent avec un large domaine d'application (Gagaoua & Hafid 2016).

En raison des inconvénients des techniques chromatographiques, cette approche élégante de bioséparation, non chromatographique a retenu l'attention de nombreux scientifiques. Les laboratoires comme indiquée dans la figure 08, présente le nombre de travaux publiés, liés au système TPP, au cours des 2 dernières décennies (Gagaoua 2018). À ce jour, environ 70% des études sur le système TPP se sont axés, sur la récupération et la purification des protéines et des enzymes, tandis que 30% autres concernaient des huiles, des lipides, des composés organiques à petites molécules, de l'ADN et glucides (Ward 2008; Dennison 2011). Le système TPP a été utilisé avec succès pour la récupération d'une grande variété de macromolécules, de diverses sources naturelles (fluides, tissus et cellules), telles



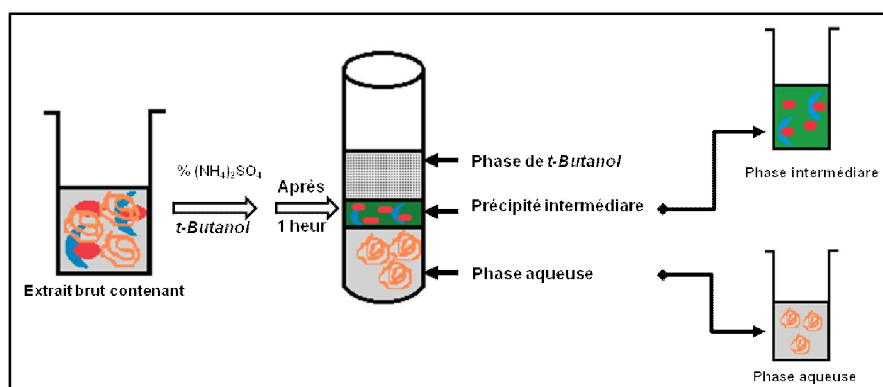
que les plantes, les animaux et les micro-organismes (y compris les extrémophiles), ainsi que les bouillons de fermentation (Gagaoua 2018).



**Figure 08:** Représentation graphique à barres du nombre de travaux associés sur le système de répartition en trois phases publiée, au cours des 20 dernières années (Gagaoua 2018)

### 9.1. Processus de fractionnement en trois phases

Le système TPP est un processus simple, rapide et efficace et consistant, en une seule étape pour la séparation et la purification de protéines, à partir de mélanges complexes. Cette méthode non chromatographique, utilise un fonctionnement collectif des principes impliqués dans de nombreuses techniques comme i) le relargage (*Salting out*), ii) précipitation isoionique, iii) précipitation co-solvant, iv) osmolytique, et v) précipitation kosmotrope des protéines. Il est commodément évolutif et peut être utilisé directement avec des suspensions brutes (Saxena *et al.* 2007).



**Figure 09 :** Représentation du système de répartition en trois phases TPP (Gagaoua *et al.* 2016).

Le principe de cet outil à émergence rapide consiste à mélanger l'extrait protéique brut avec du sel solide (principalement le sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et un solvant organique, généralement le tert-butanol (t-BuOH) afin d'obtenir trois phases (Figure 09). Les



enzymes ou les protéines désirées sont sélectivement réparties, après centrifugation à 4°C à une phase, tandis que les contaminants tels que les pigments et les lipides à l'autre (Figure 09). La phase organique supérieure qui contient des composés non polaires (pigments, lipides, etc.) est séparée de la phase aqueuse inférieure, contenant des composés polaires (protéines, glucides, etc.), par un précipité protéique interfacial (Li *et al.* 2013; Gagaoua *et al.* 2014).

Lors de l'ajout de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , l'eau est extraite par les ions du sel (en particulier les ions  $\text{SO}_4^{2-}$ ) à mesure qu'ils s'hydratent. Le sel apparemment a une affinité plus élevée pour l'eau que pour le t-butanol, et donc préférentiellement, séquestre l'eau. En l'absence de protéines, la solution se divise en deux phases, car une partie de l'eau est rendue indisponible pour le t-butanol. Si la protéine est présente, la protéine s'équilibre avec les nouvelles proportions de solvant et de co-solvant dont il dispose. Ainsi, le processus de partition est affecté par l'hydrophobicité, le poids, la charge et le point isoélectrique (pI) de la protéine et aussi par les conditions physiques du système de phases (Dennison & Lovrien 1997; Dennison 2011).

## 9.2. Effet du sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , est le sel le plus utilisé pour le relargage des protéines, vu son aspect économique. Il est facilement disponible, est doux pour les protéines, stabilise certaines protéines et avantageux, en raison de sa forte solubilité. De plus,  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  sont aux extrémités de leur série Hofmeister respectif. Il a été démontré qu'elles stabilisent les interactions intermoléculaires dans les macromolécules, telles que les structures des protéiques. La saturation en sulfate d'ammonium est d'une importance cruciale et joue un rôle majeur dans le système TPP car il est responsable des interactions protéine-protéine et la précipitation. Il provoque la précipitation des protéines, par le mécanisme de relargage. L'efficacité du relargage dépendra d'abord de la quantité de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et sur la force ionique de la solution. Pour exemple, à des précipitations de sel plus élevées, les molécules d'eau sont attirées par les ions de sel entraînant une plus forte interaction protéine - protéine et les molécules protéiques précipitent à travers les interactions hydrophobes (Gagaoua *et al.* 2014).

## 9.3. Effet du t-butanol

Comme présenté ci-dessus, la particularité du TPP est l'utilisation de tert-butanol. Le t-butanol est un C4kosmotrope non ionique très soluble et miscible dans l'eau, mais après addition de sel solide, il s'hydrate et agit comme un solvant de différenciation. Il ne provoque pas de dénaturation de l'enzyme partitionnée car elle est incapable de pénétrer à l'intérieur de

la structure tridimensionnelle pliée de la protéine en raison de sa plus grande taille moléculaire (Gagaoua *et al.* 2014). Il montre également des effets kosmotropes et d'encombrement significatifs, aux températures de 20-30°C, améliorant le partitionnement de l'enzyme qui peut avoir des implications, dans la stabilisation de la protéine isolée (Dennison 2011).

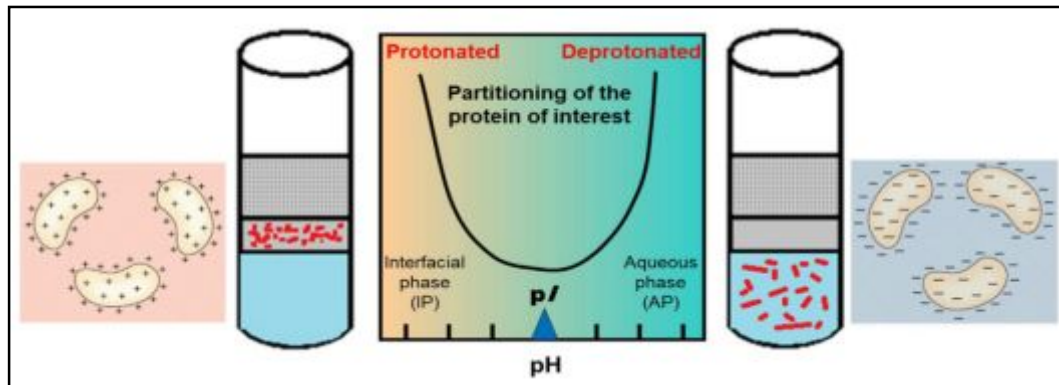
Dans l'ensemble, l'ion sulfate et le t-butanol sont connus pour être d'excellents marqueurs de la structure des protéines ou kosmotropes (Dennison & Lovrien 1997). Kosmotropes, inversement aux agents chaotropes, causent des interactions favorables des molécules d'eau, qui stabilisent également les interactions intramoléculaires dans les protéines (Moelbert *et al.* 2004). Le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  est le sel kosmotropique traditionnel pour le relargage des protéines, à partir d'une solution aqueuse. Le principe des ions  $\text{SO}_4^{2-}$ , pour le relargage des protéines a été considéré de cinq manières différentes, à savoir : 1) les effets de la force ionique, 2) l'amélioration de la tension superficielle de la cavité facteur de stress osmotique (déshydratation), 3) la kosmotropie, 4) l'agent de masse d'exclusion et 5) la liaison de  $\text{SO}_4^{2-}$  aux sites cationiques de la protéine (Gagaoua & Hafid 2016).

#### 9.4. Effet du pH

Le pH du milieu est un autre paramètre important affectant le système TPP, car il provoque l'ionisation des acides aminés acides ou basiques présents dans les protéines et influence d'autres aspects des macromolécules (Alvarez-Guerra & Irabien 2014; Gagaoua & Hafid 2016). Il a été signalé que les systèmes TPP changent, de façon brusque, autour du point isoélectrique (pI) des macromolécules, principalement avec les protéines, et l'efficacité du système dépend de ce paramètre notamment, dans la présence d'un électrolyte comme le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Il a été postulé que la distribution et la répartition des macromolécules dans les systèmes TPP change avec le pH, en raison des interactions électrostatiques entre les phases et les macromolécules chargées.

Dans le système TPP, et dans le cas de la purification des protéines, si le pH du système est supérieur au point isoélectrique (pI) de la protéine, les résidus d'acides aminés hydrophiles sont chargés négativement et la protéine acquiert une charge nette négative, en la déplaçant vers le bas de la phase aqueuse. Dans ces conditions, les protéines restent dans la couche phase aqueuse inférieure (Figure 10). Cependant, si le pH du système est inférieur au pI de la protéine cible, il y a un maximum de précipitation ou d'accumulation de protéines, dans la phase de précipité interfacial (Gagaoua *et al.* 2014; Gagaoua *et al.* 2015b; Gagaoua & Hafid 2016). Cela peut être dû au développement d'une charge positive, sur la surface de la

protéine à un pH bas qui facilite la liaison de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  au site cationique, améliorant ainsi et considérablement l'effet du dépistage électrostatique et minimisant la répulsion électrostatique entre des molécules de protéines chargées de manière similaire ou des gouttes d'émulsion stabilisées par des protéines (Gagaoua 2018).



**Figure 10 :** Base de partitionnement des macromolécules (protéines) sous le système de répartition en trois phases. Quand le pH du système est bien inférieur au pI de la protéine, la protéine cible s'accumule dans la phase interfaciale (à gauche). Lorsque le pH du système est beaucoup plus élevé que le pI de la protéine, il y a accumulation de protéine cible dans la phase aqueuse (à droite) (Gagaoua 2018).

Il a été examiné que les changements de pH facilitent le changement de la charge nette des molécules cibles et influencent la partition des protéines (Dennison 2011). Cette base de partitionnement des macromolécules (protéines), sous le système TPP est représentée dans la Figure 11. En conséquence, il a été rapporté que la solubilité des protéines était maximisée, lorsque la TPP était réalisée au pI de la protéine (Pike & Dennison 1989). Par conséquent, à la lumière des raisons précédentes, il est important d'examiner soigneusement les effets du pH, sur le processus TPP et de définir les conditions de pH optimales, pour le partage qui améliorerait à la fois le rendement et le facteur de purification des macromolécules cibles, à savoir les protéines et les enzymes (Gagaoua 2018).

### 9.5. Effet de la température

La température est un autre paramètre physique important qui n'a pas un grand effet, sur la quantité de macromolécules récupérées, mais a généré un impact sur la configuration et la stabilité globale des enzymes et des protéases (Dennison & Lovrien 1997; Gagaoua & Hafid 2016; Chew *et al.* 2018). On suppose que les niveaux les plus élevés du processus de partitionnement fonctionne à basse température, une condition qui est considérée comme favorable car la chaleur dégagée, par le solvant ou la précipitation du sel peut être dissipée rapidement, assurant ainsi une dénaturation minimale des protéines (Gagaoua 2018; Yan *et al.* 2018).

Selon Nadar *et al.* (2017), à une température plus basse (4°C), le rendement de purification ou l'activité peut être similaire à celle obtenue à une température ambiante qui est supposée être due au faible mouvement des particules du solvant (Gagaoua *et al.* 2015a; Gagaoua *et al.* 2016). D'autres études ont montré qu'une plage de températures de 20 à 40°C peut être optimale; cependant, cela est difficile à confirmer compte tenu de la complexité des paramètres de processus impliqués (Sharma & Gupta 2001; Garg & Thorat 2014). En effet, à très haute température, et en dehors de la dénaturation des protéines, la volatilité du t-BuOH conduit à sa faible disponibilité lors de la séparation, ce qui dans un effet synergique réduit avec  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , par conséquent, produisant un rendement inférieur (Gagaoua 2018).

Pour ces raisons, l'effet de la température à différents intervalles doit être optimisé, après avoir validé les paramètres décrits précédemment. Pour exemple, si nous nous référons à nos travaux récents sur la cucumisine (Gagaoua *et al.* 2017), l'effet de la température sur le comportement de cloisonnement est augmenté, avec une hausse de la température de 5 à 20°C. Le rendement et le facteur de purification maximal de 155% à 157% et 4,78–4,82 ont été retrouvés, respectivement, entre 10 et 20°C. La raison probable, derrière ceci peut être, comme déjà expliqué, à une température de 10–20°C. Le t-BuOH confère des effets kosmotropes et d'encombrement significatifs et améliore le processus de partitionnement. Il a été reconnu que la diminution du facteur de purification et de l'activité à des températures supérieures à 25°C était due à la désactivation thermique de la macromolécule. Ainsi, il semble que le système TPP serait très adaptable, pour séparer les macromolécules des extrémophiles, comme les molécules de microorganismes provenant de sources chaudes (Mashayekhi Mazar *et al.* 2012; Ait Kaki El-Hadef El-Okki *et al.* 2017; Loureiro *et al.* 2017)

## 9.6. Avantages et inconvénients du système TPP

L'intérêt croissant porté pour le système TPP peut être attribué aux avantages qu'il offre, par rapport aux techniques conventionnelles qui comprennent (i) un débit élevé du produit souhaité, (ii) une facilité d'extensibilité, (iii) une adaptabilité pour les processus de purification en amont et en aval, (iv) une rentabilité et (v) une utilisation simultanée en une seule étape ou un protocole de purification combiné (pour un dépistage rapide des protéines). De plus, le système TPP peut être défini comme une solution simple, efficace, économique et étant une méthode de bioséparation verte (propre) pour l'extraction et la purification des macromolécules cible (bioactifs), par rapport aux techniques conventionnelles (Chew *et al.* 2018).

Le système TPP se distingue car il a un temps de traitement court qui peut être utilisé directement avec des suspensions brutes, fonctionnant à température ambiante, et les produits chimiques nécessaires peuvent être facilement recyclés (Saxena *et al.* 2007). Selon plusieurs auteurs (Mondal *et al.* 2006; Ward 2008; Gagaoua & Hafid 2016; Gagaoua 2018), d'autres avantages techniques peuvent être attribués à TPP tels que:

- (i) La purification ainsi que la concentration de macromolécules (par exemple, protéines), contrairement à la chromatographie qui les diluent ;
- (ii) Un abaissement de la viscosité en éliminant l'ADN, les polysaccharides et les micelles lipidiques;
- (iii) Une purification plus élevée que celle obtenue, dans les procédures simples de «relargage»;
- (iv) Une utilisation avec des cultures brutes directes contenant des débris cellulaires sans aucun pré-clarification;
- (v) Une utilisation de conditions opérationnelles douces et la stabilité structurelle des protéines dans leur forme native;
- (vi) Le procédé n'utilise pas de polymères, contrairement à l'ATPS, qui doivent être éliminés plus tard.

Pour ces raisons, le TPP semble être une pré-purification intéressante, un outil de recherche exploratoire précoce et une méthode de préparation/récupération de macromolécules (Lovrien & Matulis 2001).

Par ce processus, certaines enzymes sont stabilisées et d'autres sont inhibés avec le t-butanol, permettant le fractionnement de l'extrait brut. Le système TPP améliore l'activité enzymatique de plusieurs protéines. Parallèlement, il a été signalé qu'il dénature les protéines avec une structure quaternaire, par exemple l'hémoglobine, ce qui est un avantage, lors de l'isolement des protéines sanguines (Gagaoua & Hafid 2016). En revanche, de petites quantités de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  peuvent avoir besoin d'être supprimées, par dialyse. Certaines enzymes peuvent perdre leur activité en présence de quantité élevée de t-butanol. Peu d'études ont rapporté que la structure des protéines peut être altérée par le t-butanol. Le TPP ne convient pas à l'isolement des anticorps IgG ou protéines moins présentes dans la solution (<5  $\mu\text{g}$ ). Sans quoi, un problème d'homogénéisation tissulaire est la génération possible d'artefacts, soit par protéolyse, soit par d'autres interactions protéine/protéine (Gagaoua & Hafid 2016).

# Matériels et Méthodes

## Préambule

Dans l'optique d'améliorer et/ou de manager la qualité finale, en particulier la tendreté des viandes issues d'animaux de réformes, ce travail de thèse a pour objectif principal, l'attendrissement artificiel des viandes dures par les protéases exogènes. Afin de répondre à cette problématique, la démarche adoptée s'est articulée sur les objectifs secondaires suivants : i) Extraction, purification et caractérisation de protéases notamment la pepsine (d'origine animale), la ficine et la papaïne (d'origine végétale), par le système de répartition en trois phases, communément connu sous le nom : système TPP (pour *three phase partitioning*, en anglais). ii) Évaluation et test sur l'effet attendrisseur de chacune des protéases purifiées, sur la texture des viande dures, issues d'animaux de réformes en l'occurrence, la viande de poules repro-chaire (poule pondeuses), de vaches de réforme et de dromadaires.

La présente étude aspire, à la mise en valeur des sources d'enzymes, dont dispose notre pays. Nous avons choisi de travailler avec de la pepsine de poulet, c'est une enzyme extraite à partir de proventricules de poulet considérés, comme un sous-produit d'abattage (Alamareot1982). Elle est largement employée dans la fabrication des fromages (Gordin et Rosenthal, 1987 ; Cuvellier, 1993 ; Adoui, 2007 ; Krid, 2013 ; Siar, 2014). Dans le cadre de ma thèse, cette application, destinée à l'attendrissement de la viande, est inédite. Afin de mieux caractériser, l'enzyme prépondérante de poulet, sa purification devrait être réalisée. Cependant, la plupart des techniques utilisées impliquent un grand nombre d'étapes onéreuses, nécessitant des produits coûteux et requérant plusieurs étapes chromatographiques. Pour cette raison, notre étude vise à développer et à mettre en place un protocole de purification de la pepsine à partir de proventricules de poulet par le système TPP. C'est une nouvelle technique rapide, simple et efficace, en mesure de purifier de nombreuses protéines en une seule étape. Elle consiste en une série d'extraction, la précipitation par sulfate d'ammonium, suivie d'un fractionnement par l'addition de t-Butanol. Les optimisations ont abouti à la séparation de l'enzyme avec une très haute pureté. Nous avons réalisé par la suite, la caractérisation de la pepsine, la détermination des cinétiques enzymatiques et la détermination des conditions optimales de cette aspartylprotéase purifiées, par la mesure des activités protéolytiques.

Nous nous sommes, également, intéressés à deux protéases, à cystéine considérée comme une protéase de référence, pour les enzymes attendrissantes des viandes, la ficine à partir du latex de figue et la papaïne du latex de papaye. Le latex de papaye a été rapporté par un

étudiant tanzanien, John James et dans le cadre de son travail de mémoire de fin de cycle master en biotechnologies alimentaires. Nous avons pu mettre en place, et pour la première fois, un protocole de purification de la papaïne, par le système de purification TPP. Des optimisations et une caractérisation ont été réalisées. Les enzymes, en notre possession ont été conservées, à -20°C, jusqu'au lancement des essais d'attendrissement artificiel.

Par la suite, nous avons appliqué ces protéases exogènes purifiées par le système TPP, sur plusieurs matrices de différentes espèces, en vue d'évaluer l'effet attendrisseur. D'abord, nous avons évalué l'effet attendrisseur de i) la papaïne sur la viande de dromadaire et ii) la pepsine sur la viande de poule repro-chaire de réforme. Toutes les étapes d'extraction, purification, caractérisation et application des protéases sur la matrice viande ont été réalisées, à l'INATAA, au laboratoire de l'équipe Maquav, laboratoire Bioqual.

Nous avons, également, bénéficié d'un stage de 03 mois à l'INRA Auvergne-Rhône-Alpes -Theix, 63122, pour l'étude de l'effet attendrisseur des protéases purifiées, par le système de répartition en 3 phases, sur la viande bovine et la caractérisation de l'impact sur la structure macro et micro-moléculaires.

Nous avons organisé le chapitre, matériels et méthodes par enzyme, par le traitement de chaque enzyme, en commençant par l'extraction et la purification, puis par la caractérisation, pour enfin terminer, par l'application dans la matrice viande. En fin de chapitre, nous avons abordé l'effet de ces protéases, sur la macro et microstructure de la viande bovine.

## **Chapitre I: Matériels et méthodes**

### **I. Extraction, purification, caractérisation et application de la papaïne**

#### **1. Extraction de la papaïne**

##### **1.1. Matière biologique**

Le latex frais a été recueilli, à partir de fruits de papaye (*Carica papaya*), cultivé à Mwanza, en Tanzanie. Après avoir lavé les fruits non mûrs avec de l'eau distillée, plusieurs incisions ont été faites, le long de la surface avec un couteau à une profondeur de 2-3 mm (Figure 11). Le latex exsudé a été recueilli dans un bécher en verre placé dans de la glace. Après collecte, le latex a été fractionné en volumes, de 50 ml puis conservé à -18°C et transporté dans les mêmes conditions jusqu'à utilisation. La collecte du latex a été effectuée en janvier 2017, très tôt le matin, avant le lever du soleil.





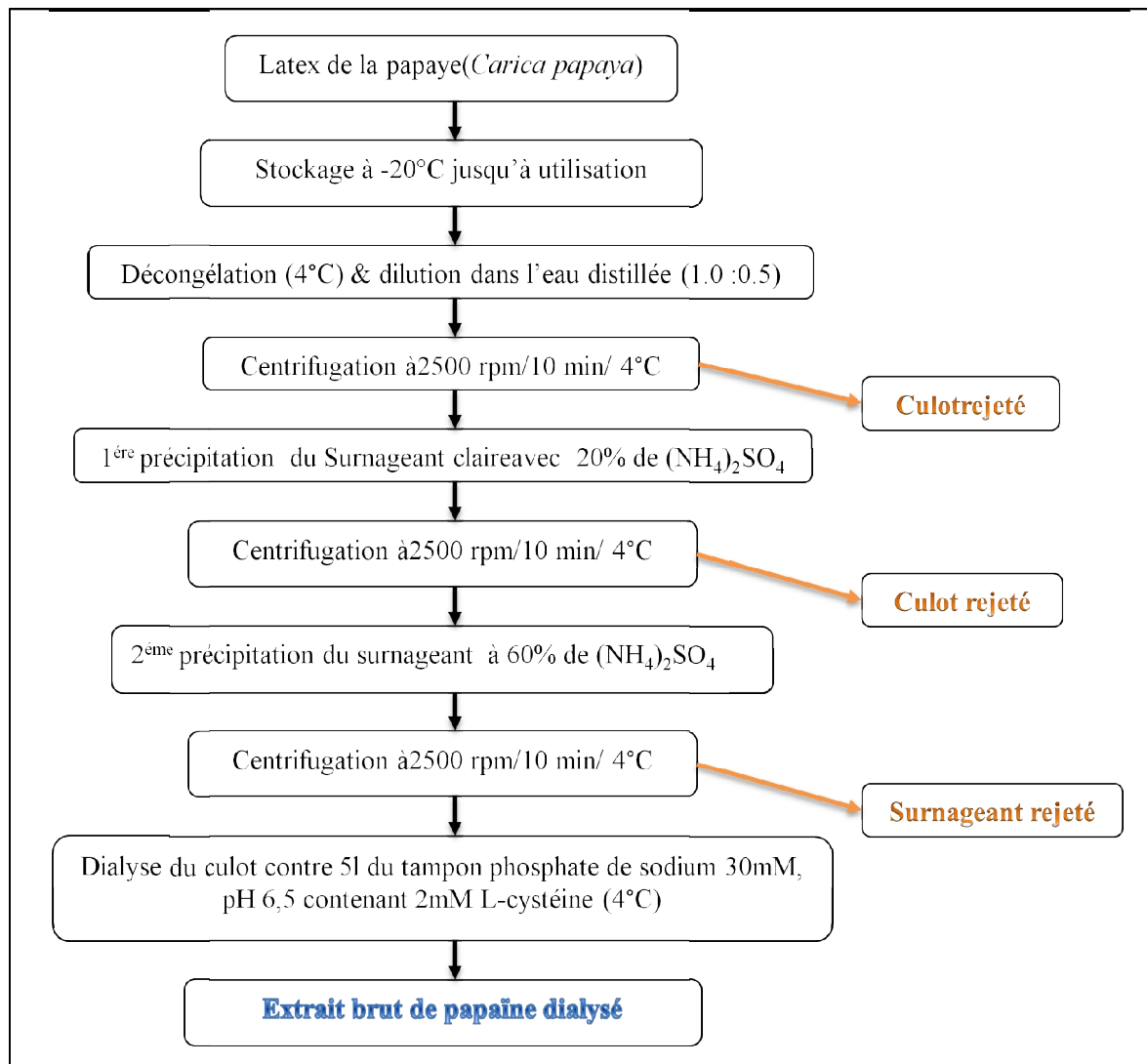
**Figure 11:** Collecte du latex frais à partir de fruits de papaye (*Carica papaya*).

## 1.2. Préparation de l'extrait brut de papaïne

Le latex de papaye décongelé a été mélangé avec de l'eau distillée fraîche (4°C), avec un rapport de 1,0: 0,5 (v/v), à l'aide d'un vortex. Les débris cellulaires ont été enlevés (culot), après centrifugation durant 10 minutes à 2500 rpm / 4°C. Le surnageant clarifié a été ensuite saturé, à 20% de sulfate d'ammonium [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], suivie d'une autre centrifugation (2500 rpm / 10 min / 4°C) pour récupérer le surnageant. Il sera aussi concentré, avec 60% de saturation en sulfate d'ammonium, suivi d'une autre centrifugation (2500 rpm / 10 min / 4°C).

Cette fois, le culot a été dissout avec de l'eau distillée fraîche. Le volume d'eau distillée frais est le volume initial de latex + l'eau distillée utilisée au début, multiplié par 1,2. L'extrait brut obtenu a été dialysé pendant une nuit (seuil de coupure de la membrane: 14 kDa), contre 30 mM, tampon phosphate pH 6,5 contenant 2 mM de L-cystéine à 4 ° C. Après dialyse, l'extrait brut de la papaïne a été soumis à la purification, par le système de à répartition en trois phases (TPP). La figure 12 résume les étapes suivies, pour l'extraction de la papaïne, à partir du latex de fruits non mûrs du papayer.

Les calculs pour les quantités de sulfate d'ammonium, à ajouter dans un volume donné de l'échantillon, pour sa précipitation (à 20% et 60%), ont été effectués en se référant au tableau d'Englard & Seifter, (1990) à 4°C (Tsai *et al.* 1983) (Annexe 1) ou on utilisant le calculateur : <https://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>.



**Figure 12:** Protocole résumant les étapes clés de l'extraction de la papaïne à partir du fruit non mûr du papayer (*Carica papaya*)

## 2. Purification de la papaïne par le système TPP

### 2.1. Mise en place du système TPP

Tout d'abord, selon les essais préliminaires, l'extrait brut de *C. Papaya* a été concentré, à 25°C avec du sulfate d'ammonium à 40%, suivi par l'addition d'un volume égal de t-BuOH. Le mélange a été vortexé, graduellement, puis laissé reposer pendant environ 45 minutes à température ambiante. Ensuite, le mélange a été centrifugé à 4000 tr/min, pendant 10 min à 15°C, pour faciliter la séparation des phases (Figure 13). La phase supérieure de t-BuOH a été éliminée par une pipette Pasteur. Les phases aqueuses (inférieures) et interfaciales ont été prises, avec soin, puis dialysées afin d'être analysées pour l'activité enzymatique et la teneur

en protéines. Le précipité interfacial a été complètement dissous dans un petit volume de 30 mM, tampon phosphate pH 6,5 contenant 2 mM de L-cystéine.

Pour l'optimisation des paramètres affectant le système de purification TPP, les effets des concentrations, en sel de sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (20, 30, 40, 50, 60,70 et 80%) (p / v), au rapport extrait brut constant: t-BuOH (1.0: 1.0) a été étudiée. Ensuite, divers ratios : t-BuOH (extrait brut:t-BuOH; 1.0: 0.5, 1.0: 0.75, 1.0: 1.0, 1.0: 1.25, 1.0: 1.5, 1.0: 2.0) ont été utilisés, avec une saturation de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, constante de 40% à 25°C. Après, le t-BuOH et le sel, différents effets des valeurs de pH sur le milieu ont été étudiés.L'extrait brut a été saturé avec 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et le pH a été ajusté à 3, 4, 5, 6, 7 et 8, avec HCl 0,5 M ou NaOH 0,5 M, puis 1,0: 0,75 t-BuOH a été ajouté. La meilleure valeur de pH, lors de la récupération de la papaine a été définie. Le dernier facteur étudié était la température. Nous l'avons variée de 15°C à 40°C pour déterminer les conditions conduisant à l'obtention du comportement de partitionnement élevé du système, en utilisant les conditions d'optimisation de 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, rapport 1,0: 0,75 t-BuOH et pH moyen de 6.0.

Après optimisation de ces paramètres, la phase aqueuse, contenant l'activité papaine la plus élevée a été collectée et dialysée pendant une nuit contre le tampon sodium phosphate (30 mM, pH 6,5), contenant 2mM L-Cystéine. La solution de papaine récupérée a été stockée, à -20°C jusqu'à utilisation pour une caractérisation plus poussée, afin de déterminer ses propriétés biochimiques générales.

## **2.2. Vérification de la pureté de la papaine**

### **2.2.1. Électrophorèse monodimensionnelle**

Afin d'évaluer le contenu et la pureté des différentes fractions du système TPP, la tricine SDS-PAGE (électrophorèse monodimensionnelle (1DE) sur gel de polyacrylamide) a été réalisée selon la méthode décrite par Gagaoua *et al.* (2014), en utilisant des gels de séparation à 12% et de concentration de 4%.

Les fractions d'extrait protéique ont été mélangées à un rapport de 1,0: 1,0, avec une solution de dénaturation (100 mM de Tris-HCl (pH 6,8), SDS à 1% (p/ v), 0,75% (p/v) DTT, 0,02% (p/v) bleu de Coomassie Brilliant R250 et 20% (p/v) glycérol). Le SDS permet de conférer à l'ensemble des protéines, une charge globale négative et le DTT (Dithiothréitol) permet de protéger l'oxydation des protéines et de rompre les ponts disulfures. Et enfin, le glycérol augmente leur densité, grâce à la poussée d'Archimède. Les échantillons sont en suite chauffés pendant 10 min dans un bain marie, à 75°C afin de compléter la dénaturation.

Les protéines vont être dépliées perdant subséquentement leurs structures primaires et quaternaires (spatiales). Les échantillons sont conservés jusqu'à leur utilisation à -20°C.

Après montage et polymérisation des gels de concentration et de séparation (Annexe 2), des dépôts de dix microgrammes de protéines, ont été déposés dans les puits du gel. Une solution contenant des marqueurs de masses moléculaires est déposée dans le premier puits. Ces marqueurs de poids moléculaire utilisés proviennent de chez Bio-Rad (#161-0373), ce sont des protéines recombinantes pré-marquées au bleu permettant d'estimer de haut en bas, la distance de migration et qui sont dans un ordre décroissant, et comme suit (kDa) : 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 et 10.

Les gels sont, ensuite, placés dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration (Annexe 2). Puis, la cuve est reliée à un générateur, générant un courant électrique (1000 mA, 300 W), faisant migrer les protéines, d'abord à 80 volts pendant 15 à 20 minutes afin de concentrer les protéines dans le premier gel de concentration. Ce qui force la migration de la glycine et des protéines se concentrant, au front de migration des ions chlorure et permettant, ainsi d'obtenir de très fines bandes de protéines concentrées, à la limite supérieure du second gel.

Ensuite, le potentiel électrique est augmenté à 130 V, pendant plus de 3h, ce qui permet de séparer les protéines, selon un gradient de taille, par un maillage moléculaire. Leur vitesse de migration sera donc fonction de la taille des protéines et de la taille des mailles du gel. En raison du dégagement de chaleur générée par le courant électrique, cette opération nécessite un circuit de refroidissement qui est assuré par une circulation d'eau froide du robinet.

Après séparation, les protéines ont été fixées, dans une solution de fixation/décoloration (l'éthanol à 50% (v/v) et 7,5% (v/v) d'acide acétique), pendant 10min sous agitation. Puis, le gel a été coloré pendant une nuit sous agitation avec une solution de coloration contenant 4,9 mM de bleu de Coomassie brillant G-250 dans de l'éthanol à 50% (v/v) et 7,5% (v/v) d'acide acétique. Le gel est ensuite décoloré par des lavages successifs et sous agitation dans une solution de fixation/décoloration, jusqu'à bonne lisibilité des bandes protéiques. Le programme d'analyse Un-Scan-It gel 6.5 (Silk Scientific, Orem, UT) a été utilisé pour estimer le poids moléculaire des bandes protéiques.

Un autre gel identique exécuté dans les mêmes conditions a été utilisé pour transférer les protéines sur des membranes de difluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore, MA,

USA) et bloqué à l'aide d'une solution saline tamponnée au Tris avec Tween20 contenant 5% de lait écrémé. Un anticorps polyclonal (lapin) spécifique à la papaïne est utilisé pour reconnaître la protéine. Un deuxième anticorps anti-papaïne (chèvre) conjuguée à de la peroxydase de raifort (HRP : *Horse-Radish Peroxidase*) est ajoutée. Il va se lier à n'importe quelle fraction de papaïne (Jeacocke 1977). Les membranes ont été incubées avec la chimiluminescence *Super Signal West Dura* (Pierce) pendant 10 min, et les autoradiogrammes ont été scannés et traités comme les gels de couleur bleue.

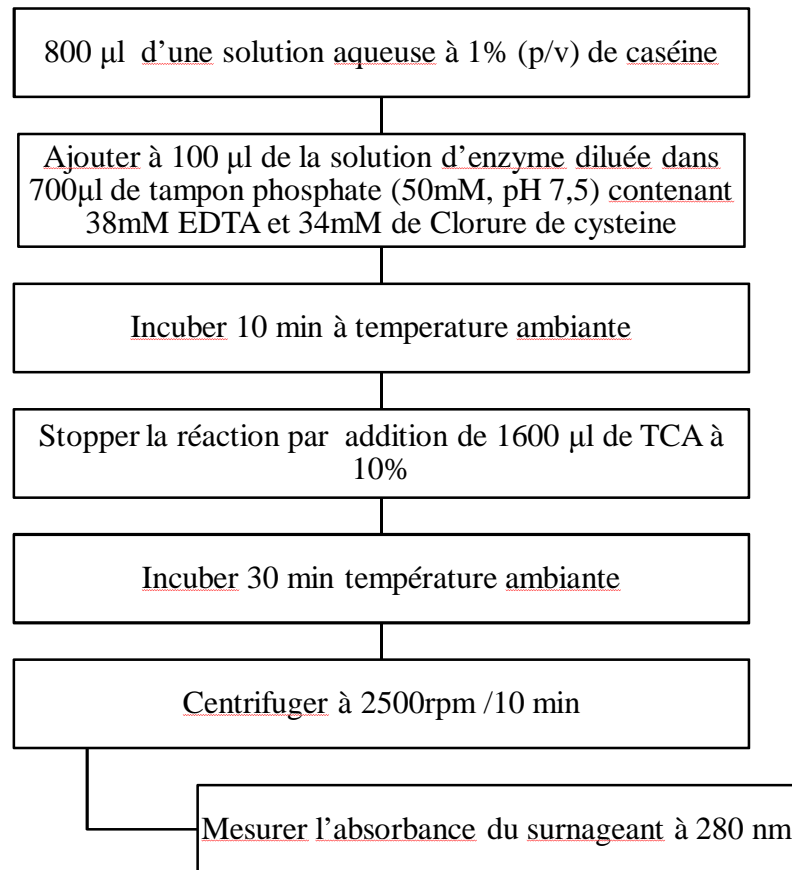
### 2.2.2. Électrophorèse bidimensionnelle et détermination de pI

La focalisation isoélectrique (IEF, *isoelectric focusing*) a été réalisée, selon le protocole décrit par Picard *et al.* (2016). En effet, dans un premier temps, les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique (pI), dans des bandes de gels à gradient de pH immobilisé (IPG : *immobilized pH gradient*), de 18 cm de long avec une plage de pH de 3 à 7. Les protéines ont été séparées selon les conditions suivantes : 200 V pendant 1h; 500 V pendant 1 h; 1000 V pendant 3 h, passant à 8000 V en 9 h; 8000 V en continu jusqu'à 73 500 Vh. Ainsi, sous l'effet d'un champ électrique constant, les protéines chargées vont migrer dans le gradient de pH du gel, jusqu'au pH égal à leur pI. Leur charge étant nulle à cette valeur de pH, les protéines vont ainsi arrêter leur migration. Elles sont donc séparées, selon leur point isoélectrique. Après migration, le gel n'a pas été coloré et utilisé comme pour 1DE pour l'immunotransfert.

## 3. Caractérisation de la papaïne purifiée

### 3.1. Mesure de l'activité protéolytique de la papaïne

L'activité de la papaïne a été mesurée à température ambiante, dans du tampon phosphate 50 mM (pH 7,5) contenant 38 mM d'EDTA et 34 mM du chlorure de cystéine, en utilisant de la caséine comme substrat, par la méthode modifiée de Kembhavi *et al.* (1993). Pour cela, on ajoute 800 µl de solution aqueuse de caséine à 1% (p / v) à 100 µl d'enzyme diluée, dans 700 µl de tampon. Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante pendant 10 minutes. Après la période d'incubation, la protéolyse de la caséine a été arrêtée par addition de 1600 µl d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 10%. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 30 minutes, centrifugé à 2500 rpm pendant 10 minutes et l'absorbance du surnageant est mesurée à 280 nm (Figure 13). Une unité protéolytique est la quantité d'enzyme qui produit une augmentation de l'absorbance de 0.001 par minute à 280nm.



**Figure 13:** Diagramme résumant les étapes du protocole adopté pour la mesure de l'activité protéolytique de la papaine

- **Activité enzymatique ou protéolytique**

$$\text{Activité protéolytique (U/ml)} = \frac{\Delta A_{280\text{nm}} \times \text{FD}}{t \times 0.001}$$

$\Delta A_{280\text{nm}} = A_{280\text{nm}} (\text{test}) - A_{280\text{nm}} (\text{témoin})$

**FD**= facteur de dilution.

**t**=Temps d'incubation (min)=**10**

**0.001**= Facteur pour expliquer le changement de l'extinction de 0.001.

- **Activité spécifique**

$$\text{Activité spécifique (U /mg)} = \frac{\text{Activité protéolytique}}{\text{Concentration en protéines}}$$

- **Activité relative**

$$\text{Activité relative (\%)} = \frac{\text{Activité spécifique de l'échantillon}}{\text{Activité spécifique du témoin}} \times 100$$

- **Activité résiduelle**

$$\text{Activité résiduelle (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{Activité enzymatique de l'extrait brut} - \text{activité enzymatique de l'échantion}}{\text{Activité enzymatique de l'extrait brut}} \right)$$

- **Facteur de purification**

$$\text{facteur de purification} = \frac{\text{Activité spécifique de l'échantillon}}{\text{Activité spécifique de l'extrait brut}}$$

- **Rendement**

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Activité enzymatique de l'échantillon}}{\text{Activité enzymatique de l'extrait brut}} \times 100$$

### 3.1.1. Dosage des protéines par la méthode Bradford

Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford (1976), dont le principe est basé sur la réaction entre le bleu de Coomassie G250 et les protéines. En milieu acide, il se forme un complexe bleu qui présente un maximum d'absorption à 595 nm. Une solution étalon de sérum albumine bovine (BSA) de concentration connue (2 mg/ml) a été utilisée. La concentration en protéines est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée, avec le BSA (Annexe 3). Les résultats obtenus ont été exprimés en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de protéines, par extrapolation linéaire, à partir d'une gamme étalon.

### 3.2. Paramètres cinétiques de la papaïne

$K_m$  et  $V_{max}$  de la papaïne ont été déterminés en mesurant l'activité enzymatique à différentes concentrations de caséine bovine (de 0 à 50 mg/ml), comme substrat spécifique. L'activité a été mesurée dans les conditions de test standard, comme présenté ci-dessus. Les courbes de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk (réciproques) ont été acquises à l'aide du logiciel Sigma Plot 12 pour déterminer  $K_m$  et  $V_{max}$ .

### 3.3. Effet de la température et du pH sur l'activité et la stabilité de la papaïne

Le profil de température de la papaïne a été évalué en effectuant la procédure d'essai standard à différentes températures de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 90°C. Les activités relatives en pourcentage ont été exprimées comme le rapport de l'activité papaïne obtenue, à une certaine température à l'activité maximale obtenue, à une gamme température donnée.

L'effet du pH est de 2,5 à 7,5 en utilisant les tampons suivants: tampon citrate 50 mM (pH 2,5-6,0) et tampon phosphate 50 mM (pH 6,5-7,5). L'activité de la papaïne a été obtenue comme mentionné ci-dessus. De plus, la stabilité thermique et le pH de l'enzyme ont été établis, en mesurant l'activité résiduelle de la papaïne, dans les mêmes conditions, après 1 h d'incubation.



L'activité résiduelle de la protéase jusqu'à 3 h après 30 min d'intervalle pour la température (de 30 à 70°C, avec des intervalles de 5°C) et le pH (de 3,5 à 7,0, avec un intervalle de 0,5 unité de pH) ont été caractérisés. Après les périodes d'incubation souhaitées, des aliquotes d'enzyme ont été retirées et analysées dans des conditions de dosage optimales pour spécifier l'activité enzymatique résiduelle

### **3.4. Effet des inhibiteurs et des ions métalliques sur l'activité de la papaïne**

L'effet de divers ions métalliques (KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> et FeSO<sub>4</sub>) et des inhibiteurs enzymatiques (EDTA, EGTA, PMSF, iodoacétamide, acide iodoacétamique et iode) sur la papaïne partitionnée. L'activité a été évaluée par son incubation avec l'ion métallique (2 mM) ou un inhibiteur d'enzyme (5 mM) à 20°C pendant 30 min, suivi par la détermination de l'activité résiduelle en utilisant un test de dosage de l'activité protéolytique, comme décrit ci-dessus. L'activité enzymatique testée en l'absence d'ions métalliques ou d'inhibiteur était considérée comme contrôle et défini à 100%.

### **3.5. Effet du calcium sur l'activité de la papaïne**

La demi-vie de l'enzyme récupérée a été déterminée, en présence de calcium à différentes concentrations. L'activité résiduelle a été définie, sur une période totale de 3 h d'incubation en utilisant la concentration de 1,0, 2,5, 5 et 10 mM de Ca<sup>2+</sup>, puis l'échantillon de mélange a été incubé à 30°C jusqu'à 70 ° C, avec des intervalles de 5°C. Les valeurs sont des moyennes, de trois expériences indépendantes.

### **3.6. Effet du stockage sur la stabilité de la papaïne**

La stabilité au stockage à 25°C, 4°C et -20°C de la papaïne récupérée pendant 36 jours a été analysée. L'activité de la papaïne a été déterminée, comme mentionné ci-dessus.

## **4. Application de la papaïne sur la viande de dromadaire**

L'objectif principal de cette expérience est d'étudier l'effet attendrisseur d'une enzyme d'origine végétale : la papaïne, sur la viande de dromadaire et de comparer l'impact des différents traitements d'attendrissement artificiel enzymatique (marinade, pulvérisation et injection) et/ou physique (cycle de congélation/décongélation) sur la texture de la viande.

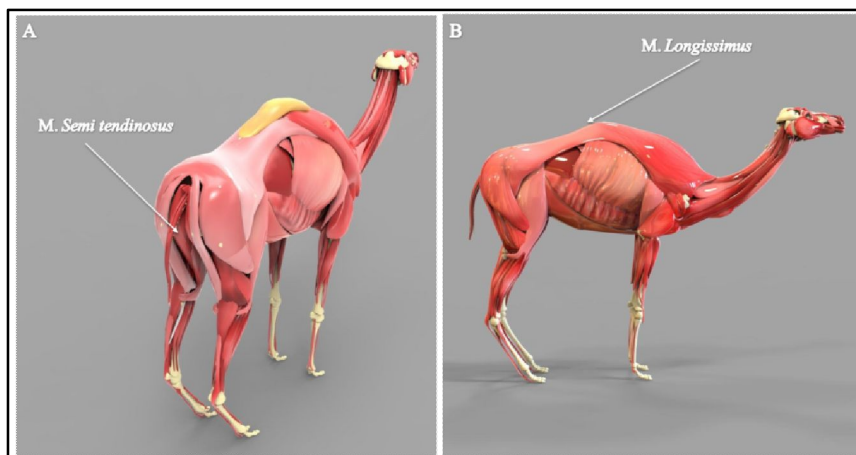


#### 4.1. Matériel biologique

Nous avons travaillé avec de la viande cameline, issu de 3 dromadaires mâles âgés de 5 à 6 ans, de population Sahraoui pour s'assurer que la viande est légèrement dure; les muscles choisis sont :

- Le muscle *semi tendinosus* (Demi-tendineux) est un long muscle prismatique de la région postérieure de la cuisse, accolé sur une partie de sa longueur au demi-membraneux, et généralement de coloration nettement plus pâle que ce dernier (Figure 14 A).

- Le muscle *longissimus thoracis* (Long dorsal) est le plus volumineux des muscles du corps. Il forme la masse musculaire la plus importante de la région dorso-lombaire, il s'étendle long de la gouttière vertébro-costale depuis le sacrum jusqu'à la base de l'encolure (Figure 14B).



**Figure 14:** Anatomie des muscles du dromadaire présentant la position des muscles *longissimus* et *semi tendinosus*. A) Vue postérieure B) Vue de profil  
(Images reprises de <https://www.kamelito.com/mieux-connaître-le-chameau/>)

Ces muscles ont été prélevés après 48 heures, post mortem, par le boucher M.Bensari Ibrahim. Ces boucheries se situent dans la commune d'ElKhroub, wilaya de Constantine. Les muscles prélevés sont aussitôt transportés, au laboratoire de recherche de l'équipe marqueurs de la qualité des viandes MaQuaV, au niveau de l'Institut de Nutrition, d'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires INATAA.

#### 4.2. Préparation des échantillons de viande

De chaque muscle, 18 pièces de 3 x 2 x 2 cm ont été coupées dans le sens des fibres, avec une lame de bistouri stérile. Ensuite, les morceaux de viande de chaque muscle ont été pesés et installés dans des boîtes en plastiques individuelles, étiquetées et utilisées au hasard, pour différents traitements d'attendrissement.

### 4.3. Traitements appliqués pour l'attendrissement artificiel

Différents traitements d'attendrissement en utilisant les deux concentrations de papaine récupérée (2 et 4 mg/ml). Six traitements ont été appliqués.

#### i) **Injection**

Une solution contenant la solution enzymatique (2 ou 4mg) a été injectée, à l'aide d'une seringue, dans les morceaux de muscle (3×2×2cm). L'injection se fait à plusieurs endroits et le liquide dégagé est à nouveau injecté dans le muscle. Les échantillons ont été, aussitôt, placés dans des boîtes en plastiques individuelles étiquetées et scellées puis incubées, pendant 60min à 37°C et enfin placées à 4°C pendant 24 h.

#### ii) **Pulvérisation**

Les morceaux du muscle (3×2×2cm) sont pulvérisés, avec une solution contenant 2 ou 4mg de papaine. La pulvérisation se fait sur toute la surface du muscle. Les échantillons ont été, aussitôt, placés dans des boîtes en plastiques individuelles étiquetées et scellées puis incubées pendant 60min à 37°C et enfin placées à 4°C pendant 24 h.

#### iii) **Marinade**

Les morceaux du muscle (3×2×2cm) ont été placés dans des boîtes en plastiques individuelles étiquetées pour être scellées. Ils sont immergés dans 100ml d'une solution contenant 2 ou 4mg d'enzyme. Par la suite, ils ont été incubés pendant 60min à 37°C et enfin placés à 4°C pendant 24 h.

#### iv) **Cycle de congélation/décongélation**

Les morceaux du muscle ont été placés, dans des boîtes bien sellées, ils ont, ensuite, subi un cycle de congélation/décongélation.

#### v) **Pulvérisation couplée avec le cycle congélation/décongélation**

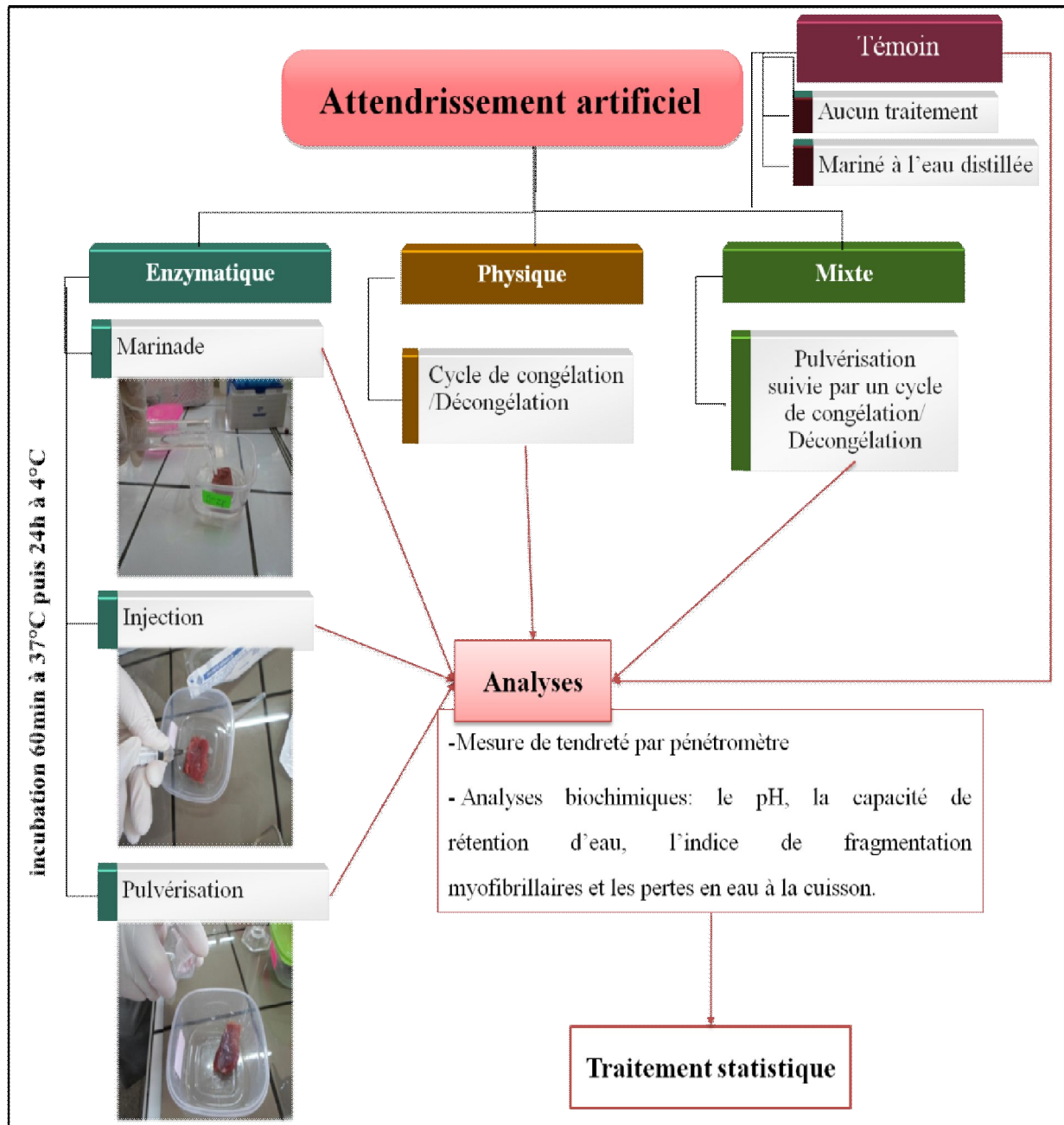
Dans le cas d'une pulvérisation couplée à un cycle de congélation/décongélation ; les morceaux de muscle ont été pulvérisés puis placés dans des boîtes puis incubés, pendant 60min à 37°C, pour ensuite subir le cycle de congélation/décongélation.

#### vi) **Témoins**

Deux témoins ont été réalisés, l'un mariné dans de l'eau distillée et un autre n'ayant subi aucun traitement d'attendrissement. Par la suite, ils ont été placés dans des boîtes bien sellées puis incubés pendant 60min à 37°C, ensuite placés à 4°C pendant 24 h.

Après 24h à 4°C, les échantillons vont servir pour la mesure de tendreté par pénétromètre puis aux différentes analyses biochimiques notamment : le pH, la capacité de rétention d'eau, l'indice de fragmentation myofibrillaires et les pertes à la cuisson.

Les différents traitements d'attendrissement artificiel effectués sont résumés dans la figure suivante (Figure 15).



**Figure 15:** Protocole expérimental utilisé pour l'étude des différents traitements d'attendrissement artificiel sur les caractéristiques biochimiques de la viande de dromadaire.

#### 4.4. Mise en évidence de l'effet attendrisseur de la papaïne

##### 4.4.1. Mesure instrumentale de tendreté par pénétromètre

- **But**

Réaliser la mesure instrumentale de la dureté des morceaux de viande.

- **Principe**

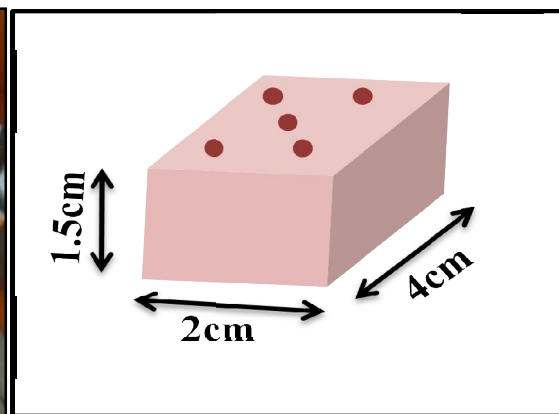
Le pénétromètre (PETROTEST PNR 10 Germany) est un instrument muni d'un corps pénétrant (aiguille conique qui pèse 2.5 g), qui pénètre en chute libre dans le morceau de viande cru sous l'action de son propre poids, pendant un temps déterminé (5 sec). La profondeur de pénétration est mesurée en mm ou unité de pénétration (1 UP = 0.1 mm). La contrainte appliquée est perpendiculaire aux fibres musculaires (Becila *et al.* 2014).

- **Mode opératoire**

Après s'être assuré de la propreté du pénétromètre. Le morceau de viande (4 cm × 2 cm × 1.5 cm) est découpé longitudinalement, dans le sens des fibres, puis placé sur le support (la table de pénétration) tout en respectant le sens des fibres musculaires qui doit être perpendiculaire au corps pénétrant. Cela est vérifié à l'aide du dispositif d'éclairage qui doit être placé derrière le corps pénétrant, de telle sorte que sa pointe projette une ombre bien nette sur la surface de l'échantillon. A l'aide de la molette, le corps pénétrant est baissé avec précaution jusqu'à ce qu'il effleure la surface de l'échantillon sans le pénétrer (Figure 16). En appuyant sur la touche « START », l'ensemble corps pénétrant/tige est libéré. La profondeur de pénétration est affichée en millimètre après un temps de 5 secondes (Hafid 2015). Après avoir noté la valeur, le dispositif est remis à son état initial et la procédure est répétée, 5 fois sur d'autres emplacements, dans le même morceau, comme indiqué, dans la figure 17.



**Figure 16:** Image montrant le principe d'utilisation du pénétromètre (PETROTEST PNR 10 Germany) sur un morceau de viande.



**Figure 17 :** Illustration de la localisation de la mesure au pénétromètre

Les mêmes morceaux ayant servis, pour la mesure de tendreté par pénétrométrie, ont servis à des analyses biochimiques, notamment, la mesure du pH, l'indice de fragmentation myofibrillaire, capacité de rétention d'eau, pourcentage d'eau reléguée et les pertes à la cuisson.

#### 4.4.2. Mesure de pH

- **But**

Mesurer le taux de glycolyse la viande analysée.

- **Principe**

Le pH se définit comme le logarithme négatif de l'activité de l'ion hydrogène.

$$\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+}$$

Il est mesuré à l'aide d'une électrode de verre, dont le potentiel varie en fonction de la concentration des ions hydrogène, suivant l'équation de Nernst. Ce potentiel est mesuré par rapport à une électrode de référence à l'aide d'un potentiomètre à haute impédance communément appelé pH-mètre.

- **Mode opératoire**

Pour la mesure du pH qui est une mesure de la glycolyse, nous avons utilisé le protocole de McGeehin *et al.* (2001); 1g de chaque morceau a été pesé et placé, dans des tubes contenant 10ml du tampon iodoacétate du sodium (5mM), et du chlorure du potassium (150mM), ajusté à pH 7,0. L'acide iodoacétique n'a pas de pouvoir tampon, donc le pH mesuré est égal au pH réel. De plus, il bloque l'activité des enzymes glycolytiques qui peuvent influencer la valeur du pH, notamment *ante rigor* (Zamora *et al.* 1996). L'utilisation du tampon va maintenir la stabilité des protéines d'intérêt en évitant d'endommager leurs intégrités structurales (Jeacocke 1977). Les échantillons ont été homogénéisés, deux fois 15 secondes avec un intervalle de 5s en utilisant le polytron (Polytron ® PT- MR 2100, Kinematica AG, Switzerland). La mesure a été réalisée sur l'homogénat, ainsi obtenue à l'aide d'un pH mètre (PHS-3CW microprocessor pH /mV meter, BANTE instrument), équipé d'une électrode combinée en verre. La valeur du pH sera la moyenne de trois essais, pour chaque muscle.

#### 4.4.3. Capacité de rétention d'eau et pourcentage d'eau reléguée

- **But**

Évaluer la capacité du morceau de viande à retenir son eau sous des conditions spécifiques. La capacité de cette viande à retenir son eau est l'une des principales exigences pour assurer la stabilité des produits carnés et limiter les pertes en eau durant le stockage.

- **Principe**

L'évaluation de la capacité de rétention d'eau est basée sur la mesure du rapport entre l'aire de viande compressé et l'aire de jus reléguée, selon les termes de cette analyse.

- **Mode opératoire**

La méthode de Grau & Hamm (1953) modifiée par Hafid *et al.* (2016) nous a servi à la détermination de la capacité de rétention d'eau et le pourcentage d'eau reléguée. Cette méthode est aussi connue sous le nom de, « *Filter Paper Press Method* » ou « méthode à pression sur papier filtre ».

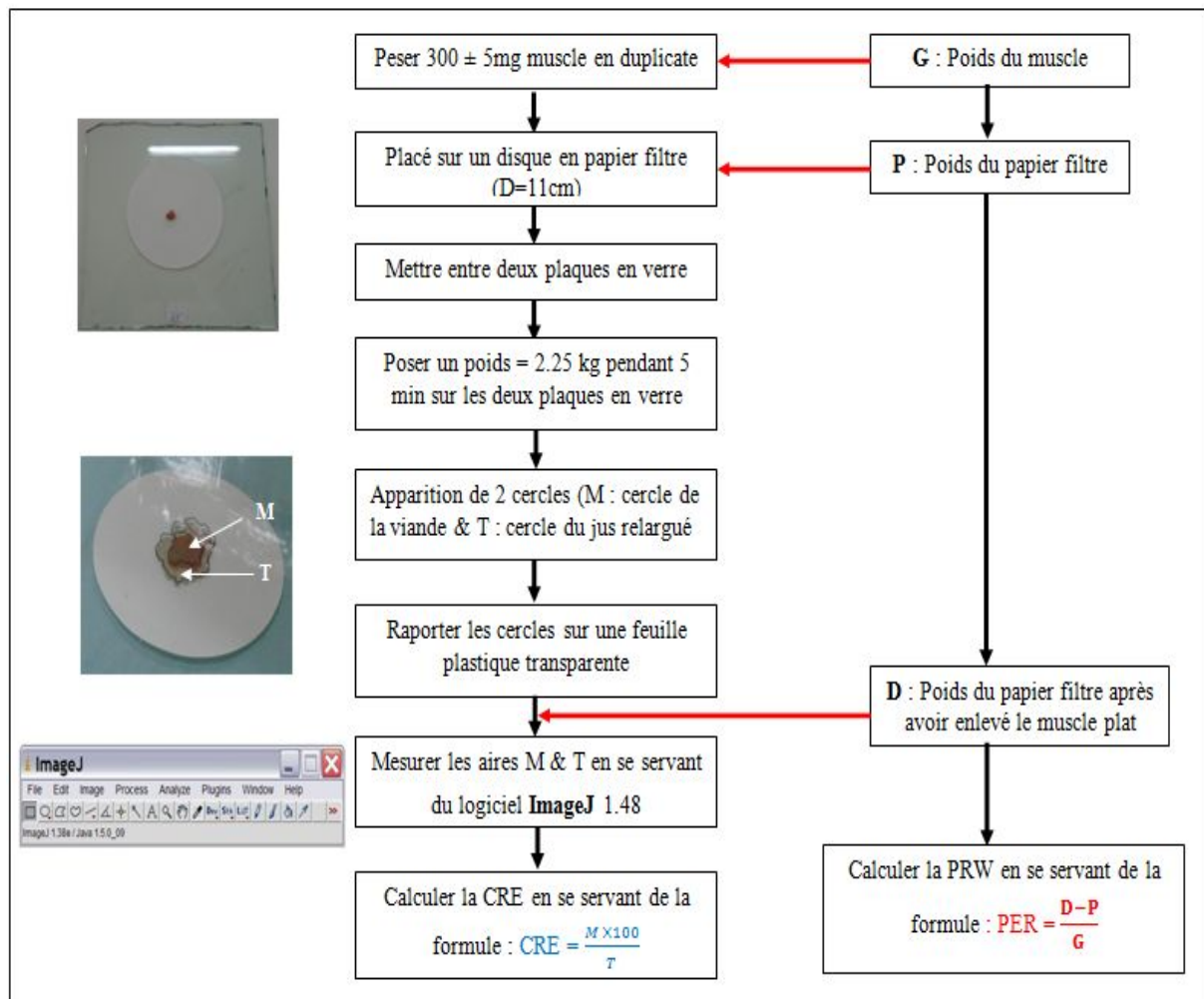
Après une pesée de 300 + 5 mg de viande intacte, nous avons, d'abord, placé le morceau sur un papier filtre Wathmann n°1 de 11cm de diamètre préalablement séché et pesé (environ 0.81g). Ensuite, l'échantillon est installé, entre deux plaques en verre, puis un poids de 2,25 kg a été appliqué pendant 5 min. Ainsi, les cercles de la viande (M) et du jus relégué (T) obtenus ont été soigneusement rapportés sur une feuille plastique transparente. Puis, le papier filtre humide est pesé après avoir ôté la viande compressée. Les aires de la tache de viande (M) et de liquide libéré (T) ont été mesurées, en utilisant le logiciel Image J 1.48, en libre accès, il suffit d'ouvrir l'image scannée des aires reportées sur la feuille plastique transparente par le logiciel Image J, puis se servir de l'application « *freehand section* » pour délimiter les aires. Ensuite, appuyer sur « *analyze* » puis « *measure* » pour obtenir les surfaces en mm ou en pixel. Cette méthode, représentée dans la figure 18, a été utilisée en duplicate. La capacité de rétention d'eau (CRE) et de pourcentage d'eau reléguée (PER) ont été déterminés en suivant les formules suivantes :

$$CRE = \frac{M \times 100}{T}$$

M : aire du muscle

T : aire du liquide reléguée

$$\text{PER} = \frac{\text{poids du papier filtre humide} - \text{poids du papier filtre sec}}{\text{poids de l'échantillon de viande}} \times 100$$



**Figure 18:** Etapes de mesure de la capacité de rétention d'eau (CRE) et pourcentage d'eau reléguée PRW (Hafid 2015)

#### 4.4.4. Pertes en eau à la cuisson

Durant la cuisson, les différentes protéines de la viande dénaturent à des températures variées (37 – 75°C). La dénaturation cause des changements structuraux comme la destruction des membranes cellulaires, un rétrécissement transversal et longitudinal des fibres musculaires, l'agrégation des protéines sarcoplasmiques et un rétrécissement du tissu conjonctif. Tous ces événements, particulièrement les changements du tissu conjonctif, aboutissent à la perte de cuisson de la viande (Honikel 1998).



- **But**

Mesurer les pertes en eau durant la cuisson.

- **Principe**

L'évaluation des pertes en eau à la cuisson est basée sur la mesure du rapport entre le poids du morceau de viande avant et après cuisson.

- **Mode opératoire**

Le protocole de (Pascual & Pla 2007) a été adopté pour la détermination du pourcentage des pertes en eau à la cuisson. En effet, les morceaux traités ont été pesés (P1), puis placés dans des sachets en plastique résistant à la chaleur et scellés avant d'être conservés à -20°C. Une fois requis, les muscles ont été décongelés au réfrigérateur pendant 24h avant l'analyse. Les échantillons ont été maintenus 1h dans un bain marie thermostaté à 80°C. Après cuisson, les muscles ont été légèrement séchés avec un papier absorbant puis pesés (P2). Cette mesure a été effectuée en duplicate.

Les pertes en eau à la cuisson ont été calculées suivant la formule :

$$\text{Perte en eau} = \frac{P1 - P2}{P1} \times 100$$

#### 4.4.5. Indice de fragmentation myofibrillaire

- **But**

La mesure indirecte de la tendreté de la viande s'effectue par transmission de lumière visible dans des suspensions de myofibrilles car la fragmentation des myofibrilles musculaires est directement reliée à la tendreté du muscle (Veiseth *et al.* 2001)..

- **Principe**

La fragmentation des myofibrilles musculaires correspond au phénomène de cassure des myofibrilles en plus petits segments, au niveau des stries Z du sarcomère, pendant la conservation du muscle. Or l'absorption de la lumière par une suspension de myofibrilles est proportionnelle à la taille de ces éléments. Il suffit donc de mesurer l'absorption (ou la transmission) de la lumière à une longueur d'onde bien choisie (540 nm), pour déterminer un index de fragmentation et, par suite, une valeur de tendreté (Roudot 2002).



- **Mode opératoire**

L'IFM a été déterminé selon le protocole (Culler *et al.* 1978) légèrement modifié par (Li *et al.* 2012). 2g de chaque échantillon ont été homogénéisés, pendant 15 secondes au polytron, avec 10ml du tampon d'extraction (*rigor buffer* RB), contenant 75mM de KCl, 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 2mM EGTA, 1 mM  $\text{NaN}_3$  à pH 7,0, puis centrifugé à 2000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot a été récupéré puis solubilisé avec 5-10ml de RB. Une seconde centrifugation a été réalisée (2000 rpm pendant 15 min à 4°C), le culot a encore une fois été solubilisé dans 5-10ml RB et filtré à l'aide d'un papier filtre afin d'enlever les tissus conjonctifs et le gras. 10 ml supplémentaires de RB ont été utilisés pour faciliter le passage des protéines myofibrillaire, à travers le filtre.

Le filtrat a été conservé dans des tubes eppendorfs à -20°C (Li *et al.* 2012). Le jour du dosage, les échantillons ont été décongelés afin de déterminer la concentration des protéines, dans les suspensions de protéines myofibrillaires, par la méthode Bradford à 595 nm (Bradford 1976). Ensuite, les suspensions ont été diluées avec RB afin d'obtenir une concentration en protéines de  $0.5 \pm 0.05$  mg/ml. L'indice de fragmentation myofibrillaire est la valeur de l'absorbance de la suspension diluée de protéines myofibrillaires, mesuré à 540 nm multiplié par 200.

#### **4.5. Analyses statistiques**

Les données de cette étude ont été analysées statistiquement par analyse de variance à un ou deux facteurs, en comparaison à un témoin. Les facteurs concernent l'effet muscle et effet traitement d'attendrissement. Le seuil  $P < 0.05$  a été considéré pour les comparaisons de moyens par Duncan. Par ailleurs, une analyse multivariée, par analyse en composantes principales, de type Pearson a été effectué, pour à la fois visualiser la projection des variables et les facteurs (traitements et muscles). Le logiciel statistique XLStat a été réalisé pour l'ensemble des analyses sous le logiciel Office Excel 2007.

## II. Extraction, purification, caractérisation et application de la pepsine

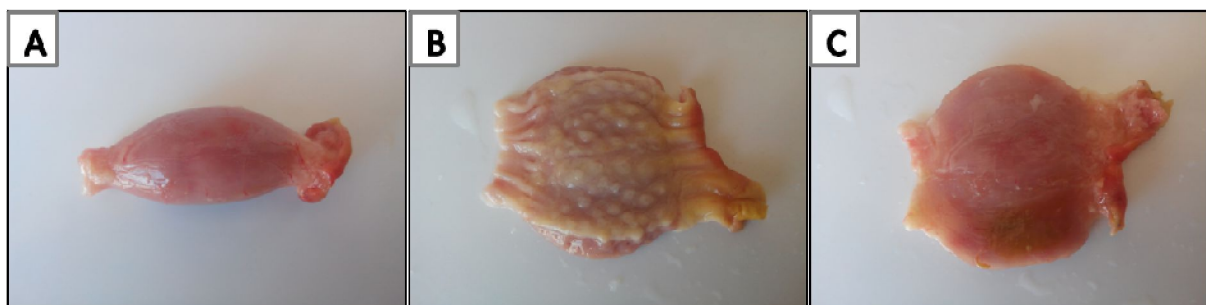
### 1. Extraction de la pepsine de poulet

La pepsine a été extraite à partir du gésier et des proventricules de poulet, ils sont connus pour être riche en pepsine. Des études préliminaires ont été effectuées pour optimiser les différents paramètres d'extraction de la pepsine à savoir i) Le choix du tampon pour une meilleure extraction de la pepsine, ii) Quand activer l'enzyme, avant ou après purification ? iii) Le temps nécessaire pour l'activation complète de la pepsine. Pour cela, nous avons opté pour un moyen rapide : le test d'activité étant la mesure de l'activité coagulante. Pour l'optimisation du protocole de purification par le système TPP, nous avons choisi de présenter les résultats obtenus sur les proventricules de poulet.

#### 1.1.Échantillonnage de proventricules de poulet

Les proventricules ont été obtenus, auprès d'un abattoir agréé par l'État nommé Abattoir Massinissa situé à la Cité du 1<sup>er</sup> novembre 1954 à Constantine (Est de l'Algérie), à partir de poulet, âgés entre 50 et 60 jours. Après abattage, plumage et éviscération, les proventricules sont séparés du tube digestif, par incision au niveau de la partie supérieure reliée au jabot et au niveau du col inférieur relié au gésier. Elles ont été aussi tôt acheminées au laboratoire dans une glacière.

La matière grasse couvrant les proventricules est complètement éliminée. Les proventricules de poulet, d'un poids 222 g (24 proventricules) sont ouverts par incision longitudinale et rincés à l'eau courante pour éliminer les particules d'aliments adhérentes (Figure 19). Ensuite, ils ont fait l'objet de deux lavages successifs, le premier a été effectué avec une solution de 0,1% NaCl et 0,1% d'acide acétique, (en vue d'éliminer les mucus adhérents), et maintenu sous agitation à froid pendant 30 min, et le deuxième a été réalisé avec de l'eau distillée.



**Figure 19** : proventricule de poulet : avant incision (A) et après incision : face intérieure (B) face extérieure (C)

## 1.2. Extraction de pepsinogène à partir de proventricules de poulet

Ainsi, ces proventricules préalablement lavés, ont été coupés en petites morceaux pour faciliter le broyage avec un hachoir électrique. Le mélange obtenu est homogénéisé à l'aide d'un ultra Turrax (Ultra-Turrax T18, IKA Werke GmbH, Germany, à 20000 tr/min, 2 x 20 s en rafales), avec le tampon phosphate 50mM à pH 6,5. Il est maintenu, sous agitation à froid pendant 1h puis filtré avec 4 couches d'une bande à gaz, afin d'enlever les matières insolubles.

Le filtrat obtenu a été centrifugé à 4000 rpm/ 4°C pendant 10 min (Centrifugeuse de laboratoire/ de paillasse/ réfrigérée/ à godets mobiles NF 400R). Le surnageant récupéré a été saturé à 30% de sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Une masse de 176g/l de sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a été ajoutée à l'extrait brut de pepsine, à raison de 0,3 g/min, sous agitation. Une fois le sel d'ammonium dissous, la solution a été centrifugée (4000 rpm/10 min/4°C). Le surnageant récupéré a subi une deuxième concentration à 80% de saturation en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ; une masse de 356g /l de sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a été additionnée à l'extrait brut de pepsine à raison de 0,3 g/min, sous agitation. Une fois, le sel d'ammonium dissous, la solution a été, encore une fois, centrifugée (4000 rpm/10 min/4°C). Le culot retenu a été solubilisé dans le tampon phosphate 50 mM à pH 6.5 pour être dialysé (MWCO: 14 kDa) à 4°C pendant une nuit contre 5 litres du tampon phosphate 50mM à pH 6,5. La solution récupérée représente l'extrait brut de pepsinogène de poulet (EBPG). Les calculs ont été effectués, en se référant à la table d'England et Seifter, (1990) à 4°C.

Afin de choisir le meilleur tampon pour l'extraction de la pepsine, nous avons opté pour quatre tampons ; tampon A : Tris/HCl 50mM/pH7,5, Tampon, B : tampon phosphate de potassium 50mM/pH7, Tampon C : phosphate de potassium 50mM pH6,5 et enfin le tampon D : Acétate de sodium 40mM/pH5,5. Nous avons suivi, les étapes citées, ci-dessus pour chacun des tampons d'extraction choisis (tampon A, B, C ou D). Au final, des aliquotes ont été récupérés des différents extraits bruts de pepsine obtenus pour les quatre types de tampons, en vue d'être testés pour l'activité coagulante et le dosage de protéines, par la méthode de Bradford (1956). Au vu des résultats obtenus, on a choisi le tampon d'extraction, donnant le meilleur résultat. Ces conclusions ont montré que le tampon C : phosphate de potassium 50mM pH6,5 a donné le meilleur résultat, suivis par le tampon B puis A et enfin D.

### 1.2.1. Détermination de l'activité coagulante

Le pouvoir coagulant des protéases est déterminé par mesure de l'activité coagulante. Cette activité s'exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme employée coagule le lait. L'activité coagulante est testée sur du lait écrémé, comme substrat par mesure du temps de floculation à 30°C, selon la méthode décrite par Berridge (1952). Le temps de floculation correspond à la durée s'écoulant depuis l'addition de l'extrait enzymatique jusqu'à l'apparition de fins flocons, sur la paroi interne du tube à essai.

La préparation du substrat consiste en la dissolution à 12% (p/v) de lait écrémé (0% de matière grasse), en poudre (lait gracieusement fourni par l'unité SAFILAIT de Constantine), dans une solution de CaCl<sub>2</sub> à 0,01 M et avec un ajustement de pH à 6,4, à l'aide d'une solution NaOH 0,1N. Le temps de floculation en triplicates est mesuré à l'aide d'un chronomètre qui est déclenché, lors de l'ajout de 0,2 ml de la pepsine partiellement purifiée à 2 ml du lait écrémé qui a été préalablement pré-incubé à 30°C, pendant 10 minutes. Le contenu a été maintenu dans un tube à essai au bain-marie à 30°C. Le chronomètre est arrêté dès l'apparition des premiers flocons visibles à l'œil nu sur la paroi interne du tube à essai.

La force de coagulation est définie comme le volume de lait coagulé par unité de volume d'un extrait enzymatique ou d'une enzyme, en 40 min (2400 s), à 35°C et pH égal à 6,4. Elle est exprimée selon la formule :

$$\text{Force de coagulation (U/ml)} = (2400 \times V)/(t \times v)$$

Avec :

**V** : volume du lait ;

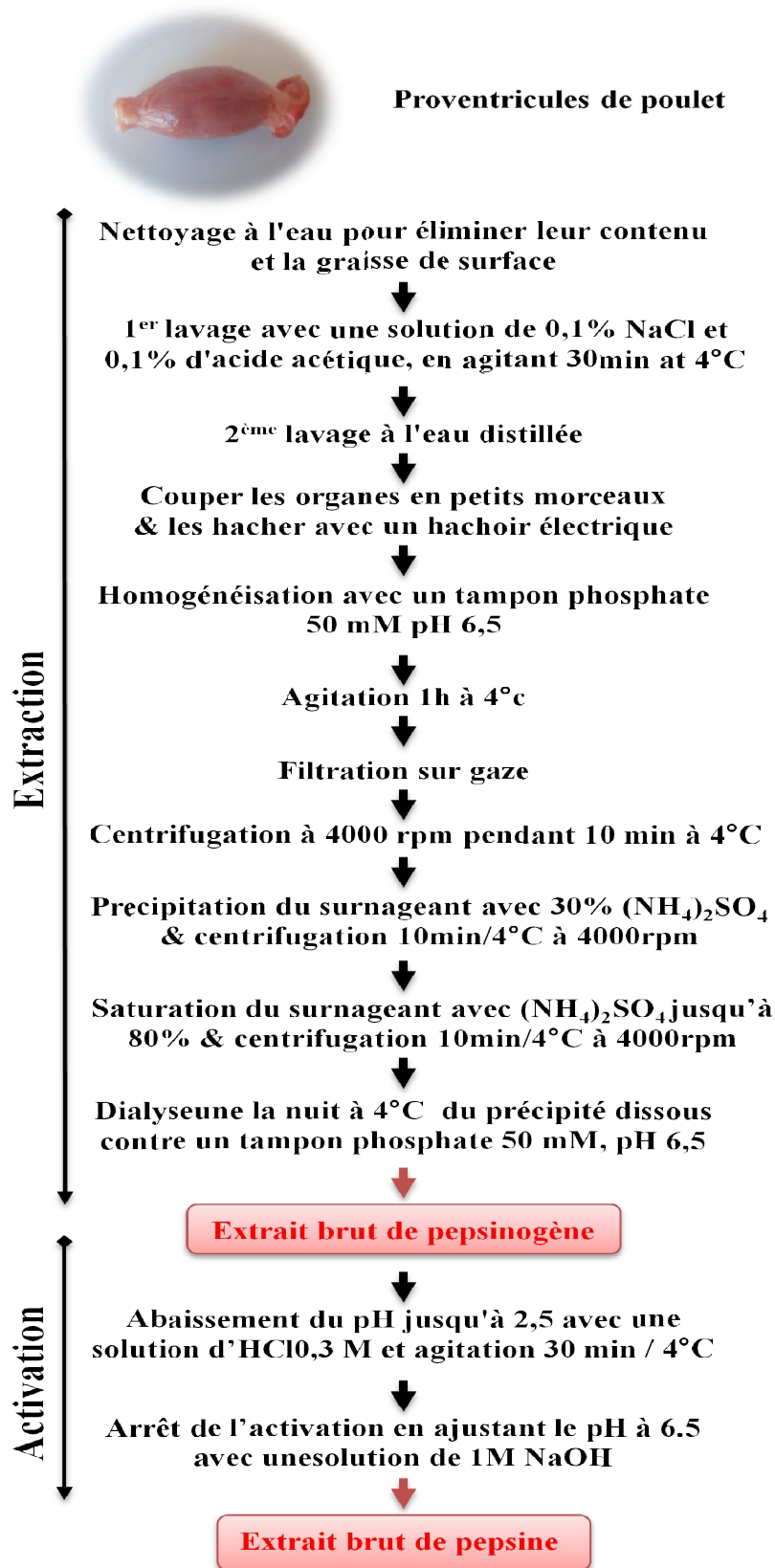
**v** : volume de la solution enzymatique ;

**t** : temps de coagulation en secondes ; 2400s :40×60.

### 1.3. Activation du pepsinogène en pepsine

Afin d'activer la pepsine, nous avons suivi le protocole de Zhao *et al.* (2011). Lors de cette étape, le pepsinogène est suspendu en condition acide pour être complètement converti en pepsine par autolyse. En effet, le pH de l'extrait brut de pepsinogène récupéré, après dialyse, a été abaissé jusqu'à 2,5 avec une solution d'HCl 0,3M et laissé sous agitation (200 rpm) à 4°C pendant 30 min. Ensuite, la réaction a été arrêtée en ajustant le pH à 6,5 avec une solution de NaOH 1M, on obtient alors l'extrait brut de pepsine active. La figure 20 résume

les différentes étapes d'extraction et d'activation de la pepsine à partir des proventricules de poulet.



**Figure 20 :** Diagramme résumant les différentes étapes entreprises afin d'extraire et d'activer la pepsine à partir de proventricules de poulet

## **2. Purification de la pepsine par le système TPP**

### **2.1. Mise au point du protocole de purification de la pepsine par le système TPP**

Le système TPP a été réalisé, comme décrit par Gagaoua & Hafid (2016). Initialement, l'extrait brut de pepsine de poulet active a été saturé à 20°C, avec du sulfate d'ammonium à 50%, suivi par l'addition d'un volume égal de t-butanol. Le mélange a été doucement vortexé puis laissé au repos pendant 1 h à 20°C. Alors, le mélange a été centrifugé à 4000 tr/min pendant 10 min à 15°C, pour faciliter la séparation des trois phases. La phase supérieure de t-butanol a été éliminée au moyen d'une pipette Pasteur. La phase aqueuse inférieure et la phase interfaciale ont été soigneusement séparées et analysées pour l'activité enzymatique et la teneur en protéines par la méthode de Bradford (1976). Le précipité interfacial a été dissous dans du tampon phosphate 50 mM, pH 6,5

L'effet des concentrations de sel d'ammonium sur le système de répartition en trois phases de l'extrait enzymatique a été étudié, en variant la concentration de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (20, 30, 40, 50, 60, 70% et 80%) (p/v), tout en gardant un rapport constant d'extrait brut: t-butanol (1,0: 1,0). Par la suite, divers rapports de t-butanol (extrait brut: t-butanol; 1,0: 0,5, 1,0: 0,75, 1,0: 1,0, 1,0: 1,25, 1,0: 1,5, 1,0: 1,75, 1,0: 2,0) ont été utilisés avec une saturation en sulfate d'ammonium constante à 40% à 20°C. Après, le t-butanol et le sulfate d'ammonium, l'effet du pH du milieu a été étudié. En effet, l'extrait brut a été saturé avec du sulfate d'ammonium à 40% et le pH a été ajusté à 3, 4, 5, 6, 7, avec du HCl 0,5M ou NaOH 0,5M, puis 1,0: 0,75 t-butanol a été ajouté et la meilleure valeur de pH sur le comportement de partitionnement de la pepsine a été analysée.

Après optimisation des paramètres (40% de sulfate d'ammonium, rapport 1,0: 0,75 extrait brut au t-butanol et pH 4,0), la phase de précipité interfacial contenant toujours l'activité de pepsine la plus élevée a été collectée et dissoute dans 50 mM, pH 6,5 le tampon phosphate, dialysée une nuit contre le même tampon. L'enzyme récupérée a été stockée à -20°C jusqu'à son utilisation pour des études de caractérisation supplémentaires afin de déterminer les propriétés biochimiques générales de l'enzyme.

### **2.2. Vérification de la pureté de la pepsine**

#### **2.2.1. Analyse électrophorétique (glycine SDS-PAGE)**

La glycine SDS-PAGE a été réalisée selon Laemmli (1970), en utilisant des gels de séparation à 12% et des gels de concentration à 5%. Les échantillons ont été mélangés à un rapport de 1: 1, avec l'échantillon tampon contenant 0,5 M Tris – HCl (pH 6,8), 10% (p / v)

SDS, 20% (v / v) glycérol, 10% (v / v)  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0,1% (p / v) de bleu de bromophénol et chauffés pendant 10 min dans un bain marie à 95°C. Dix microgrammes de protéines ont été chargés puis soumis à une séparation pendant 2 h à 140 V. Après séparation, le gel a été fixé pendant 10 min (dans 30% (v/v) d'éthanol et 5% (v/v) d'acide acétique), puis coloré 1h avec une solution de coloration (0,12% de bleu brillant de Coomassie R-250 dans 30% (v/v) d'éthanol et 5% (v/v) d'acide acétique). Les bandes de protéines ont ensuite été visualisées, après décoloration du gel jusqu'à ce qu'un fond clair soit obtenu. Un mélange de protéines, avec un standard de poids moléculaire connu (precision plus protein dual color, #161-0374) obtenu auprès de Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, a été utilisé. Le poids moléculaire des bandes de protéines a été calculé, en utilisant le programme d'analyse Un-Scan-It gel 6.5 (SilkScientific, Orem, UT).

### 2.2.2. Zymographie

Afin de détecter la bande avec activité protéolytique de la pepsine récupérée, le zymogramme (Développement de la zone d'activité) a été réalisé selon Gagaoua *et al.* (2015) avec de légères modifications. Après électrophorèse en condition dénaturante SDS-PAGE comme présenté ci-dessus, si ce n'est que les échantillons n'ont pas été chauffés, après dénaturation. Les protéines dans le gel ont été renaturées par traitement dans 2,5% (v/v) Triton X-100 pendant 30 min, puis lavées deux fois avec une eau déminéralisée. Le gel a été immergé dans 50 ml de caséine à 2% dans le tampon phosphate 50 mM, pH 6,5 à 30°C pendant 2h. Puis, le gel a été coloré et décoloré comme décrit précédemment. L'apparition d'une zone claire et incolore dans le gel révèle l'activité protéolytique de la protéase.

## 3. Caractérisation de la pepsine purifiée

En vue d'évaluer les conditions optimales pour une activité protéolytique idéale, il est important d'optimiser les paramètres influençant l'activité de la pepsine. Il s'agit de la température, le pH et la concentration de substrat, ainsi que la présence d'inhibiteurs et d'ions métalliques. La mesure de l'activité sous les différents paramètres est déterminée en utilisant la démarche présentée précédemment. L'activité optimale est exprimée en pourcentage (activité relative), par rapport à la plus forte activité obtenue.

### 3.1. Détermination de l'activité protéolytique de la pepsine

L'activité peptique potentielle a été déterminée selon une modification de la méthode d'Anson (1938). Un volume de 1250  $\mu$ l de solution aqueuse à 2% d'hémoglobine acidifié et dénaturé (Annexe 4) a été pré incubé pendant 5min à 37°C, puis 250  $\mu$ l de la solution



enzymatique a été ajouté et mélangé pour être incubé pendant 10 minutes à 37°C. Ensuite, la réaction de protéolyse de l'hémoglobine est arrêtée (déprotéinisation), par addition de 2500 µl d'une solution 5% d'acide trichloracétique (TCA).Après une période d'incubation supplémentaire de 10 minutes à 37°C, le mélange a été centrifugé 5 min / 4 000 tr / min et le surnageant clair a été soigneusement versé et transféré dans des cuvettes de quartz. L'absorbance du surnageant a été lue à 280 nm. Tous les dosages ont été réalisés en double avec des mélanges de dosage à temps zéro appropriés (blancs), dans lesquels les zymogènes activés ont été ajoutés à la solution d'hémoglobine après l'addition de TCA. La densité optique du surnageant est mesurée à 280 nm, contre 0,01 M HCl. Une unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui augmente l'absorbance de 0,001 min<sup>-1</sup>, dans des conditions d'essai données.

$$\text{Activité protéolytique (U/ml)} = \frac{\Delta A_{280\text{nm}} \times \text{FD}}{t \times 0.001}$$

$A_{280\text{ nm}}$  (test)- $A_{280\text{nm}}$  (témoin)

**FD** = facteur de dilution

**t** = temps d'incubation (min) =10

**0.01** = facteur pour expliquer le changement de l'extinction de 0.001

### 3.1.1. Détermination de la teneur en protéines

La concentration en protéines a été quantifiée par la méthode de liaison de colorant de Bradford (1976), par utilisation de la solution de Bradford 5×concentré (Bio-Rad). Le sérum d'albumine de bovin (BSA) à une concentration de 2 mg / ml a été utilisée comme standard.

### 3.2. Étude des constantes cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ )

Les constantes cinétiques de la pepsine purifiée ont été déterminées en réalisant le test d'activité protéolytique avec hémoglobine comme substrat à différentes concentrations de substrat (0-50mg/mL). Les paramètres cinétiques  $V_{max}$  et  $K_m$  sont calculés, à partir des courbes de Michaelis-Menten  $V_i = f([S])$  et Lineweaver-Burk ( $1/V_i = f(1/[S])$ ).

### 3.3. Étude de l'effet de température sur l'activité et la stabilité de la pepsine

La température optimale d'activité protéolytique est déterminée en réalisant le test d'activité protéolytique avec hémoglobine à des températures variant de 20°C à 90°C, avec des pas de 10°C. Tous les autres paramètres sont établis selon les conditions standards.



L'étude de la thermo résistance de l'enzyme a été effectuée par le maintien de l'enzyme à différentes températures (de 20°C à 90°C), pendant un temps fixé à 1h. L'activité relative de la pepsine est déterminée après dosage de l'activité protéolytique sous les conditions standards.

### **3.4. Étude de l'effet de pH sur l'activité et la stabilité de la pepsine**

Le pH optimum d'activité protéolytique est évalué, en réalisant le test d'activité protéolytique avec hémoglobine comme substrat à différents pH, de 3 à 8 avec un intervalle de 1 ; les autres paramètres sont fixés selon les conditions standards.

L'effet de pH sur la stabilité de la pepsine a été évalué par le maintien de l'enzyme pendant 1h à différents pH (3 à 8). Nous avons utilisé les tampons suivants : citrate de sodium (pH 3-5), phosphate de potassium (pH 6-7), et Tris-HCl (pH 8). L'activité relative de la pepsine est déterminée, après dosage de l'activité protéolytique, sous les conditions standards

### **3.5. Étude de l'effet des ions métalliques sur l'activité de la pepsine**

Les différentes solutions (2 mM) d'ions métalliques (KCl, NaCl, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub> et MgCl<sub>2</sub>) la solution enzymatique pendant 30min à 37°C. L'activité relative est déterminée après dosage de l'activité protéolytique sous les conditions standards. L'enzyme non traitée avec les ions métalliques est considérée comme témoin (100%).

### **3.6. Étude de l'effet des inhibiteurs sur l'activité de la pepsine**

L'effet des inhibiteurs: β-mercaptaéthanol, Ethylène-diamine-tétraacétique acide (EDTA), Ethylène-glycole-tétraacétique acide (EGTA), iode (I<sub>2</sub>), iodoacetamide, phényle-méthyle-sulfonylchlorure (PMSF) sur l'activité de l'enzyme a été déterminé par la pré-incubation de l'enzyme avec les inhibiteurs différents (5mM) à 37°C pendant 1 h. L'activité relative est déterminée après dosage de l'activité protéolytique sous les conditions standards. L'enzyme non traitée avec les inhibiteurs est considérée comme témoin (100%).

### **3.7. Effet du stockage sur la stabilité de la pepsine**

La stabilité au stockage à 25°C, 4°C et -20°C de l'enzyme pendant 30 jours a été testée. L'activité de la pepsine a été déterminée comme mentionné ci-dessus.

#### **4. Application de la pepsine purifiée sur la viande de poules.**

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet attendrisseur de la pepsine extraite de proventricules de poulet et purifiée par le système de répartition en trois phases sur la viande de poulet repro-chaire (de réforme). Nous avons réalisé des caractérisations biochimique et physico-chimique, afin de comparer l'impact des différents traitements d'attendrissement enzymatique artificiel, sur la qualité de la viande de poulet.

L'ensemble des opérations qui suivent ont été effectuées, au niveau du laboratoire de Biotechnologie et qualité des aliments BIOQUAL, l'équipe marqueurs de la qualité des viandes MaQuaV, à l'Institut de Nutrition, d'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires INATAA.

#### **4.1. Matériel biologique**

##### **4.1.1. Viande**

Nous avons travaillé avec 8 poules reproductrices (repro-chaire), de la souche cobb500 (Figure 21A), âgées entre 47 et 49 semaines et toutes issues d'un même poulailler, appartenant à l'entreprise SARL Nutri Aliment Plus (NAP), situé à la Zone Industrielle N° 98, Etaref Ouled Rahmoune, dans la commune de El Khroub, wilaya de Constantine. Les poules ont été abattues sur place, pour éviter les effets de stress dus au transport. Après la saignée, les poules sont transportées au laboratoire où elles ont subi un plumage à chaud (70°C), une éviscération et un ressuage pour enfin être mises au réfrigérateur (4°C) pour la maturation.

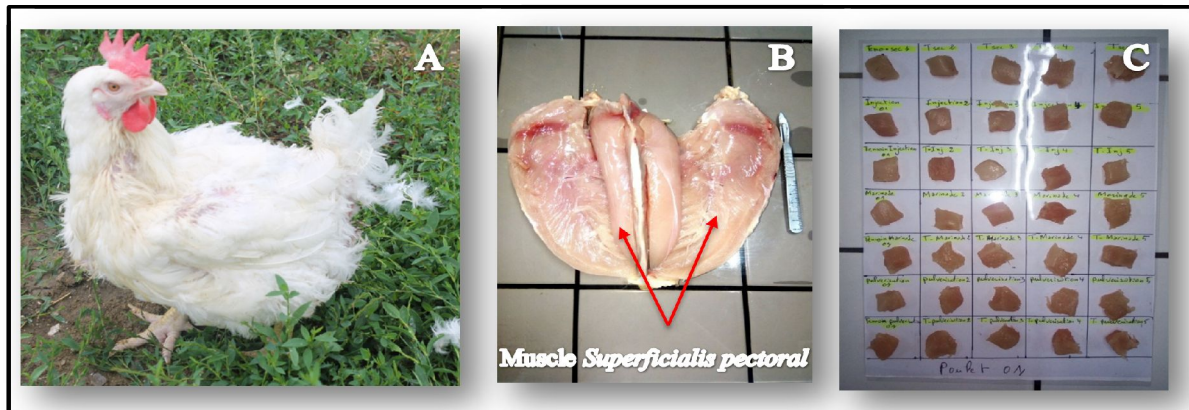
##### **4.1.2. Enzyme**

L'enzyme utilisé dans cette expérience est la pepsine extraite de proventricules de poulet et purifiée par le système de répartition en trois phases avec les paramètres optimisés : 40% de sulfate d'ammonium, un rapport extrait brut : t-butanol de 1.0 :0.75 (v :v) et pH 4.0. L'activité enzymatique choisie est de 100U/ml

Dans le but de déterminer quelle dilution correspond à une activité enzymatique 100 U/ml, l'étude de l'effet de la dilution de l'extrait enzymatique est réalisée en mesurant l'activité protéolytique, avec hémoglobine comme substrat, en utilisant une gamme de dilution de l'extrait enzymatique (1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/16, 1/30, 1/35 et 1/40). Tous les paramètres sont établis selon les conditions standards.

#### 4.2. Préparation des échantillons de viande

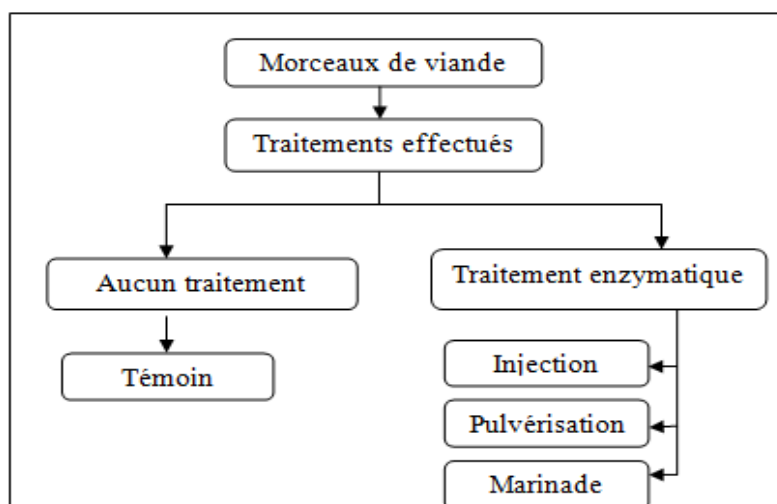
A 24h post mortem, le muscle pectoral (*superficialis pectoral*) du poulet a été séparé manuellement avec une lame de bistouri stérile. Une fois le muscle séparé ; 35 morceaux (1.5×1×1cm) ont été découpés longitudinalement dans le sens des fibres (Figure 21C). Les morceaux de viande ont été pesés et installés dans des boîtes en plastiques individuelles, étiquetées et utilisées pour les différents traitements d'attendrissement.



**Figure 21:** Etapes de préparation des échantillons de viande pour traitement. (A) Poule de souche Cobb500, (B) Muscle *superficialis pectoral*, (C) Morceaux de 1×1×1cm utilisés pour traitement d'attendrissement.

#### 4.3. Traitements appliqués pour l'attendrissement enzymatique artificiel

Différents traitements d'attendrissement par utilisation de la pepsine à 100U/ml existent, quatre traitements ont été appliqués. La figure 22 résume les traitements d'attendrissement enzymatique artificiel utilisé.



**Figure 22:** Différents traitements d'attendrissement enzymatique artificiel effectués

### 4.3.1. Marinade

Les morceaux du muscle pectoral (1.5×1×1cm) sont immergés (Figure 23A), dans 7ml de solution enzymatique (100U/ml). Les échantillons ont été placés dans des boîtes étiquetées puis conservées à 4°C pendant 24h.

### 4.3.2. Injection

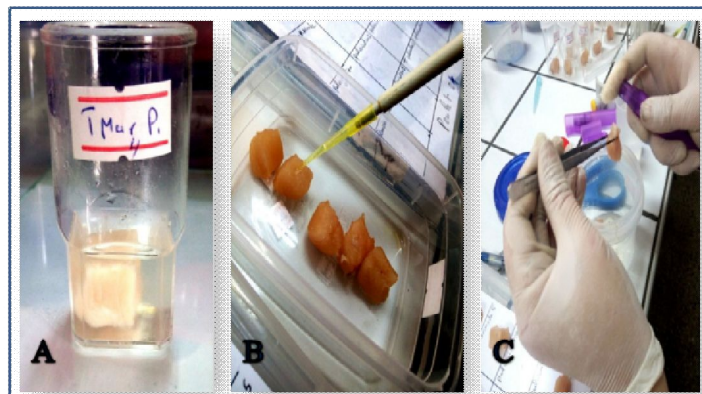
Un morceau de compresse cylindrique a été placé au centre des morceaux du muscle pectoral (1.5×1×1cm), dans le sens des fibres, puis, à l'aide d'une micropipette, 50µl de la solution enzymatique (100U/ml) ont été injectés (Figure 23B), dans le morceau de compresse afin d'assurer une diffusion homogène de la solution de pepsine dans le morceau de viande traité. L'eau pure est utilisée pour le témoin. Les échantillons seront placés dans des boîtes étiquetées puis placées à 4°C pendant 24h.

### 4.3.3. Pulvérisation

Les morceaux du muscle (1.5×1×1cm) sont pulvérisés, à l'aide d'un pulvérisateur, avec 100 ml (100U/ml) de l'enzyme (Figure 23C). La pulvérisation se fait sur toute la surface du muscle. Les échantillons seront placés dans des boîtes puis incubés à 4°C pendant 24 h.

### 4.3.4. Témoin

On dispose de 4 témoins, un pour chaque traitement (marinade, pulvérisation et injection), où l'eau pure est utilisée, en substitution à l'enzyme et un témoin qui n'a subi aucun traitement.



**Figure 23:** Images représentant les traitements d'attendrissement enzymatique appliqué (A) Marinade, (B) Injection, (C) Pulvérisation

#### 4.4. Mise en évidence de l'effet attendrisseur de la pepsine

Au final, nous avons étudié l'effet attendrisseur de la pepsine extraite de proventricule de poulet et purifiée par le système de répartition en trois phases, sur la viande de poulet repro-chaire (de réforme). Nous avons procédé à des caractérisations biochimique et physico-chimique poussées. Malheureusement, la mesure instrumentale de la tendreté n'a pas été possible, vu la panne du pénétromètre PNR10. Sachant que ce dernier est le seul instrument disponible pour la mesure instrumentale de la tendreté, des méthodes alternatives ont été réalisées, dans notre laboratoire, nous avons opté pour la mesure des peptides solubles dans le TCA, l'eau et le sel et l'hydrolyse des protéines myofibrillaires.

Après 24h à 4°C, les échantillons ont servi pour les différentes analyses biochimiques notamment : le pH, la capacité de rétention d'eau, le pourcentage en eau reléguée, l'indice de fragmentation myofibrillaires, les pertes à la cuisson et le dosage des protéines solubles dans le TCA, l'eau et le sel. Seuls les protocoles d'analyses qui n'ont pas été présentés, dans les expériences précédentes seront exposés, ci-dessous.

##### 4.4.1. Peptides solubles dans l'acide trichloroacétique

La teneur en peptides solubles dans le TCA des échantillons de viande traitée a été mesurée selon la procédure décrite par Benjakul *et al.* (2002). 1g de viande traitée a été hachée puis homogénéisée pendant 2 minutes à 2000 tr / min, avec 9 ml d'une solution de TCA à 5% (p / v). L'échantillon homogénéisé a été stocké à 4°C, pendant 1h, suivi d'une centrifugation à 4000rpm pendant 15 min. Le surnageant a été utilisé pour l'analyse des protéines par la méthode de Bradford.

##### 4.4.2. Protéines solubles dans l'eau et le sel

Les protéines solubles dans l'eau et le sel ont été analysées, en utilisant le protocole présenté par Chaurasiya *et al.* (2015), afin de vérifier le degré de protéolyse des protéines de viande. Pour les protéines hydrosolubles, 1 g de viande traitée et hachée a été homogénéisé pendant 2 min à 2000 tr/min, mélangé à 7.5 ml d'eau pure puis réfrigéré et maintenu à 4°C pendant 16 h. L'échantillon homogénéisé a été centrifugé à 4000rpm, pendant 10 min. Le surnageant a été utilisé pour l'analyse de la teneur en protéines. Le culot obtenu après l'extraction de protéine soluble dans l'eau a servi à l'extraction de protéines solubles dans le sel. Les culots ont été homogénéisés pendant 2 min à 2000 tr / min, avec du NaCl 0,67 N et

maintenus à 4°C pendant 16 h. L'échantillon homogénéisé a été centrifugé pour collecter le surnageant pour l'estimation de la teneur en protéines.

#### 4.4.3. Hydrolyse des protéines myofibrillaires :

Les protéines myofibrillaires ont été extraites, selon la méthode de Li *et al.* (2012). 2g de muscle pectoral de poulet ont été homogénéisés, pendant 15 secondes au polytron, avec 10ml du tampon d'extraction. Par la suite, deux centrifugations successives à 2000 rpm, pendant 15 minutes, à 4°C ont été réalisées. Le surnageant de chaque centrifugation a été jeté et le culot a été récupéré puis solubilisé avec 5-10ml de tampon d'extraction. La solution (culot solubilisé) obtenue est filtrée à l'aide d'un papier filtre. Le filtrat ainsi obtenu représente la solution de protéines myofibrillaires. La teneur en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (1976). Et enfin, la dégradation des protéines myofibrillaires a été estimée par la méthode décrite par Ashie *et al.* (2002). En effet, 50µl d'enzyme (1 mg/ml) ont été ajoutés à 1,95 ml d'extrait de myofibrilles et incubés à 37°C, pendant 1h. La réaction est arrêtée, par addition de 2 ml d'acide trichloracétique à 15% (TCA), et le mélange a reposé, à température ambiante pendant 15 minutes, puis centrifugé. L'absorbance du surnageant a été mesurée par spectrophotométrie à 280 nm. Les activités de la protéase ont été déterminées par la formule :

$$\text{Activité protéolytique (U/ml)} = \frac{\Delta A_{280\text{nm}} \times \text{FD}}{t \times 0.001}$$

$A_{280\text{ nm}}$  (test)- $A_{280\text{ nm}}$  (témoin)

**FD** = facteur de dilution

**t** = temps d'incubation (min) =60

**0.01** = facteur pour expliquer le changement de l'extinction de 0.001

#### 4.4.4. Caractérisation électrophorétique des protéines myofibrillaires

La séparation des protéines myofibrillaires a été effectuée avec la glycine SDS-PAGE selon Laemmli (1970), en utilisant des gels de séparation à 12% et des gels de concentration à 5%, comme expliqué ci-dessous. Avant cette opération, les protéines myofibrillaires ont été extraites en utilisant le protocole de Joo *et al.* (1999). Un échantillon de 0.5g de muscle a été additionné à 10ml du tampon d'extraction contenant 75mM de KCl, 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2ml  $\text{MgCl}_2$ , 2mM EGTA, 1mM  $\text{NaN}_3$  à pH 7.0), puis homogénéisé 15 secondes au polytron

(Polytron® PT- MR 2100, Kinematica AG, Switzerland). L'homogénat a été filtré sur une gaze, puis le filtrat est centrifugé à 4000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines sarcoplasmiques est récupéré dans des tubes eppendorfs. Le culot contenant les protéines myofibrillaires, quant à lui, est solubilisé avec 2,5ml du tampon d'extraction (RB) puis filtré sur un papier filtre et conservé dans des tubes eppendorfs. Les tubes eppendorfs contenant les solutions de protéines sont conservés à -20°C, jusqu'à utilisation, pour le dosage des protéines et le suivi de degré de protéolyse par électrophorèse.

#### **4.5. Analyse statistique**

Pour répondre aux objectifs fixés et exploiter nos données, nous avons réalisé une analyse de variance sur les différents paramètres étudiés afin de déceler les variations dues à l'effet enzyme et l'effet des traitements artificiels appliqués. Ensuite, nous avons effectué l'analyse en composante principale (ACP) nous permettant, de visualiser les relations entre les paramètres étudiés ainsi que la distribution des échantillons en fonction des paramètres reliés à texture de la viande. Notre travail s'est achevé par une caractérisation électrophorétique des protéines myofibrillaires des échantillons traités ou non par la pepsine.



### III. Extraction et purification de la ficine

La ficine a été extraite et purifiée par le système TPP en suivant le protocole d'extraction et de purification établi par Gagaoua M., Boucherba N., Bouanane-Darenfed A., Ziane F., Nait-Rabah S., Hafid K. & Boudechicha H.-R. (2014) (Annexe 5). En effet ce protocole a été développé et établi par Dr. Gagaoua au sein de l'équipe MaQuaV et rentre dans le cadre d'un projet de développement d'une enzymothèque regroupant des enzymes protéolytiques d'origines végétale et animale purifiées par le système de répartition, en trois phases (Gagaoua *et al.* 2014; Gagaoua *et al.* 2015; Gagaoua *et al.* 2017).

#### 1. Extraction de la ficine à partir de *Ficus carica*

##### 1.1. Collecte du latex

Le latex de figue fraîche a été recueilli en brisant les fruits vert immature cultivé de l'arbre figuier *F. carica L* qui pousse à Rass el Agba dans la willaya de Guelma (Est algérien), dans un tube propre. Tous les échantillons de latex utilisés dans cette étude ont été prélevés tôt le matin. Le fluide de latex a été transporté vers le laboratoire dans des conditions adéquates (4°C à l'abri de la lumière) et immédiatement stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

##### 1.2. Préparation de l'extrait brute de ficine

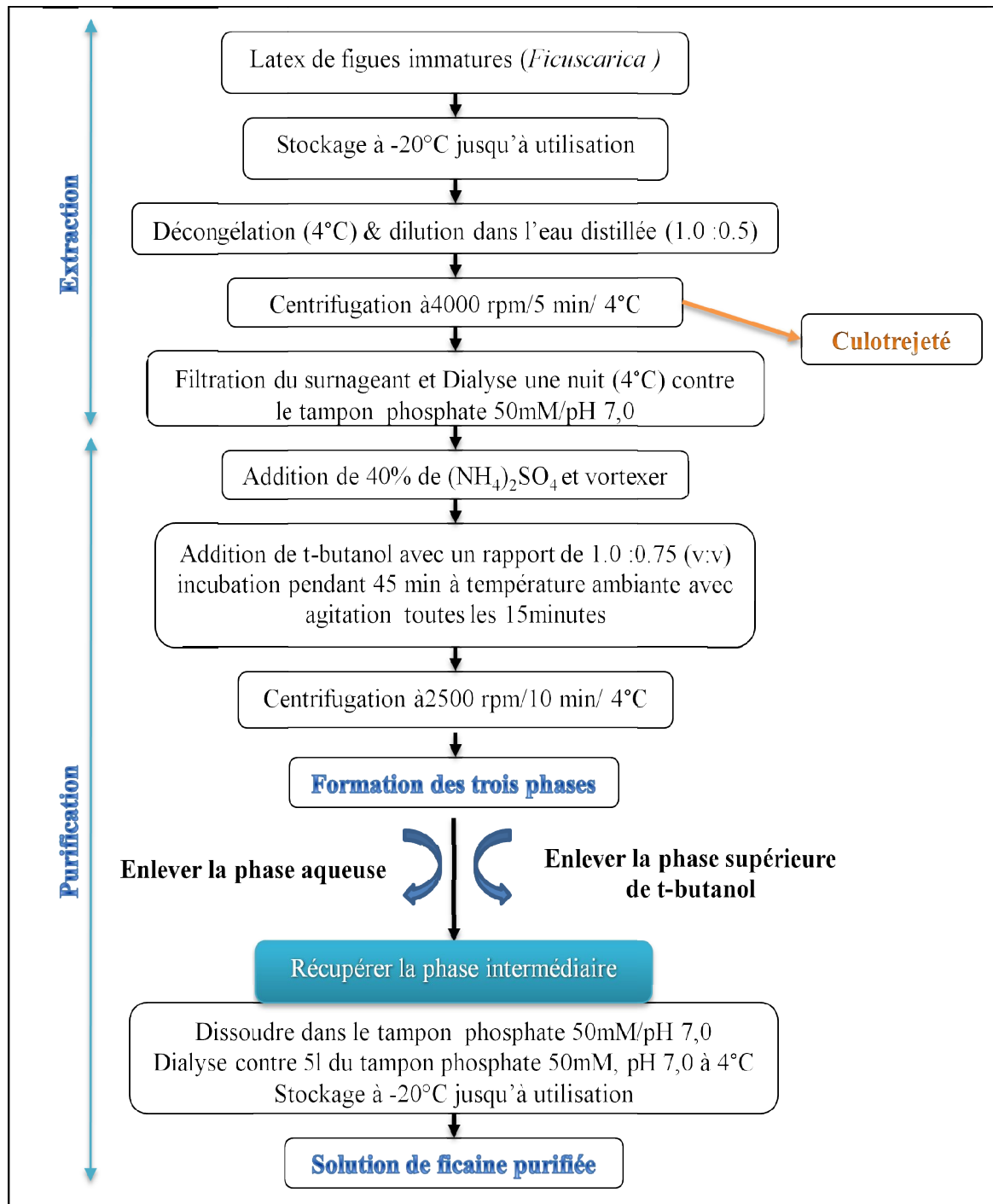
Le latex congelé a été décongelé à 4°C et dilué avec de l'eau distillée 1,0: 0,5(v/v) puis soumise à une centrifugation à 4000 tr/min pendant 15 min à 4°C, pour éliminer les gommages et autres débris. La matière insoluble a été jetée et le surnageant a été filtré à travers le papier Whatman N°1. Le jus clarifié appelé «extrait brut de ficine» a été dialysé pendant la nuit (membrane moléculaire avec un seuil de coupure de 14 kDa) contre 5l du tampon phosphate 50 mM/pH 7 à 4°C. Après dialyse, l'échantillon d'extrait brut a été soumis au système de purification TPP.

#### 2. Purification de la ficine par le système TPP

L'extrait brut enzymatique de la ficine clarifié et dialysé a été saturé à température ambiante, avec 40% de sulfate d'ammonium, suivi d'une addition de t-butanol, avec un rapport de 1.0 :0.75 (v:v) à pH 7. Le mélange a reposé, pendant 45min à température ambiante avec agitation toutes les 15minutes. Ensuite, le mélange a été centrifugé à 3000tr/min, pendant 10 min à +4°C pour faciliter la séparation des trois phases. La phase de t-butanol a été éliminée par une pipette Pasteur. La phase aqueuse inférieure et la phase interfaciale ont été soigneusement séparées et analysées pour l'activité enzymatique et la teneur en protéines (Les



protocoles adoptés sont les même utilisé pour la papaïne). Le précipité interfacial représentant la ficine purifiée a été dissous dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7 puis dialysé pendant la nuit contre 5l du tampon phosphate 50 mM/pH 7,0 à 4°C. Un schéma des différentes étapes de purification est représenté dans la figure 24.



**Figure 24:** Diagramme représentant les étapes d'extraction et de purification de la ficine à partir de latex de *Ficus carica* (Gagaoua *et al.* 2014).

## IV. Études de l'effet des protéases purifiées sur la macro et la microstructure de la viande bovine

Cette partie a été réalisée au cours d'un stage de 03 mois à l'INRA Auvergne-Rhône-Alpes -Theix, 63122, l'unité QuaPA, UR370, en collaboration avec le Dr. Thierry ASTRUC. Mon stage vise à caractériser la microstructure de la viande après traitement avec des enzymes protéolytiques, par microscopie électronique à transmission (TEM). Au cours de ce stage, nous avons évalué l'effet attendrisseur de 3 enzymes purifiées par le système de répartition en 3 phases, à savoir la ficine, la papaïne et la pepsine, sur la viande bovine. En effet, différents traitements d'attendrissement enzymatique notamment par injection, pulvérisation et marinade ont été réalisés sur le muscle *Semi tendinosus*. Des caractérisations biochimique et histologique (HES : Hématoxyline Eosine Safran, Coloration du collagène avec du Rouge Sirius et marquage immunohistologique) et immunohistologique (par marquage spécifique du collagène, la laminine et la myosine) ont été ensuite effectuées. Une étude par microspectroscopie infrarouge a aussi été entreprise.

### 1. Matériel biologique

#### 1.1. Viande

Nous avons travaillé sur le muscle *Semi tendinosus* (rond de gîte), excisé 7 jours *post mortem* d'une vache de race Charolaise, âgée de 65 mois. Le muscle a été apporté de l'abattoir de Vichy Rhue, à Creuzier-Le-Vieux (03300), France, appartenant à l'entreprise HASSENFORDER et Fils. 65 morceaux de 1.5×1×1cm (2.54± 0.05g) ont été découpés avec soin, parallèle au sens des fibres, du muscle *Semi tendinosus*. Les échantillons ont été placés dans des boîtes en plastique individuelles et étiquetées.

Dans cette étude, le muscle semi-tendineux a été sélectionné car il est vendu au détail comme un steak de valeur relativement faible, en raison de sa teneur élevée en tissu conjonctif. Ce muscle est plus résistant, à l'intervention de méthodes thermiques, mécaniques, chimiques et enzymatiques pour augmenter la sensibilité des muscles (Istrati *et al.* 2012), contrairement au muscle *longissimus* (Faridnia *et al.* 2014).

## 1.2. Enzymes

Les enzymes utilisées dans cette expérience sont la papaine de *Carica papaya* et la ficine de *Ficus carica*, les deux purifiées par le système de répartition en trois phases avec les paramètres optimisés qui sont: 40% de sulfate d'ammonium, un rapport extrait brute : t-butanol de 1.0 :0.75 (v :v) et pH 7.0 pour la ficine et 40% de sulfate d'ammonium, un rapport extrait brute : t-butanol de 1.0 :0.75 (v :v) et pH 6.0 pour la papaine. Nous avons également préparé une solution mix qui est un mélange des deux protéases purifiées la papaine et la ficine, avec un rapport 1:1(v :v). La pepsine de proventricules de poulet, purifié par le système TPP à 40% de sulfate d'ammonium, avec un rapport extrait brut : t-butanol de 1.0 :0.75 (v :v) et pH 4.0 a également été appliqué sur le muscle *Semi tendinosus* bovin, uniquement par injection.

Afin d'homogénéiser les solutions enzymatiques et de travailler avec la même activité enzymatique choisie de 100U/ml, des dilutions ont été réalisées, en mesurant l'activité protéolytique, avec la caséine comme substrat, en utilisant une gamme de dilution des solutions enzymatiques (1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/16, 1/30, 1/35 et 1/40). Tous les paramètres sont établis selon les conditions standards.

## 2. Traitements appliqués pour l'attendrissement enzymatique artificiel

Les échantillons préparés ont été divisés en quatre groupes: ceux traités par la papaine purifiée (100U/ml) et ceux traités par la ficine purifiée (100U/ml). Les autres sont traités par un mélange des deux enzymes papaine et ficine, avec un rapport 1:1(100U/ml) et le dernier groupe a été traité par eau pure. Trois traitements d'attendrissement ont été appliqués: Pour chaque traitement d'attendrissement, nous avons utilisé 5 échantillons (3 pour la microscopie optique et 2 échantillons pour la caractérisation biochimique).

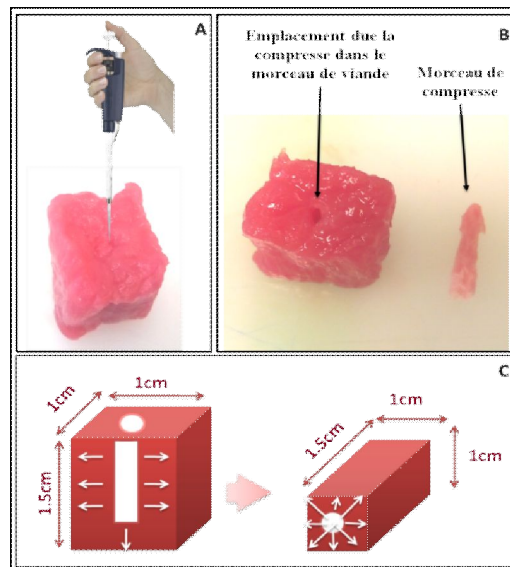
- (i) **Marinade** : Les morceaux du muscle (1.5×1×1cm) ont été immergés, dans 7ml de la solution enzymatique (100U/ml) ;
- (ii) **Pulvérisation** : Toute la surface du muscle (1.5×1×1cm) a été pulvérisé, à l'aide d'un pulvérisateur, avec 1ml de la solution enzymatique (100U/ml) ;
- (iii) **Injection** : Un morceau de compresse cylindrique a été placé, au centre des morceaux du muscle(1.5×1×1cm), parallèlement au sens des fibres. à l'aide d'une micropipette, 50µl de la solution enzymatique (100U/ml) ont été injectés, dans le morceau de

compresse, afin de faciliter la diffusion homogène de l'enzyme dans le muscle (Figure 25) ;

- (iv) **Témoins :** Un témoin pour chaque traitement d'attendrissement (marinade, pulvérisation et injection) a été réalisé dans les mêmes conditions avec l'eau pure, un autre témoin a été réalisé sans aucun traitement.

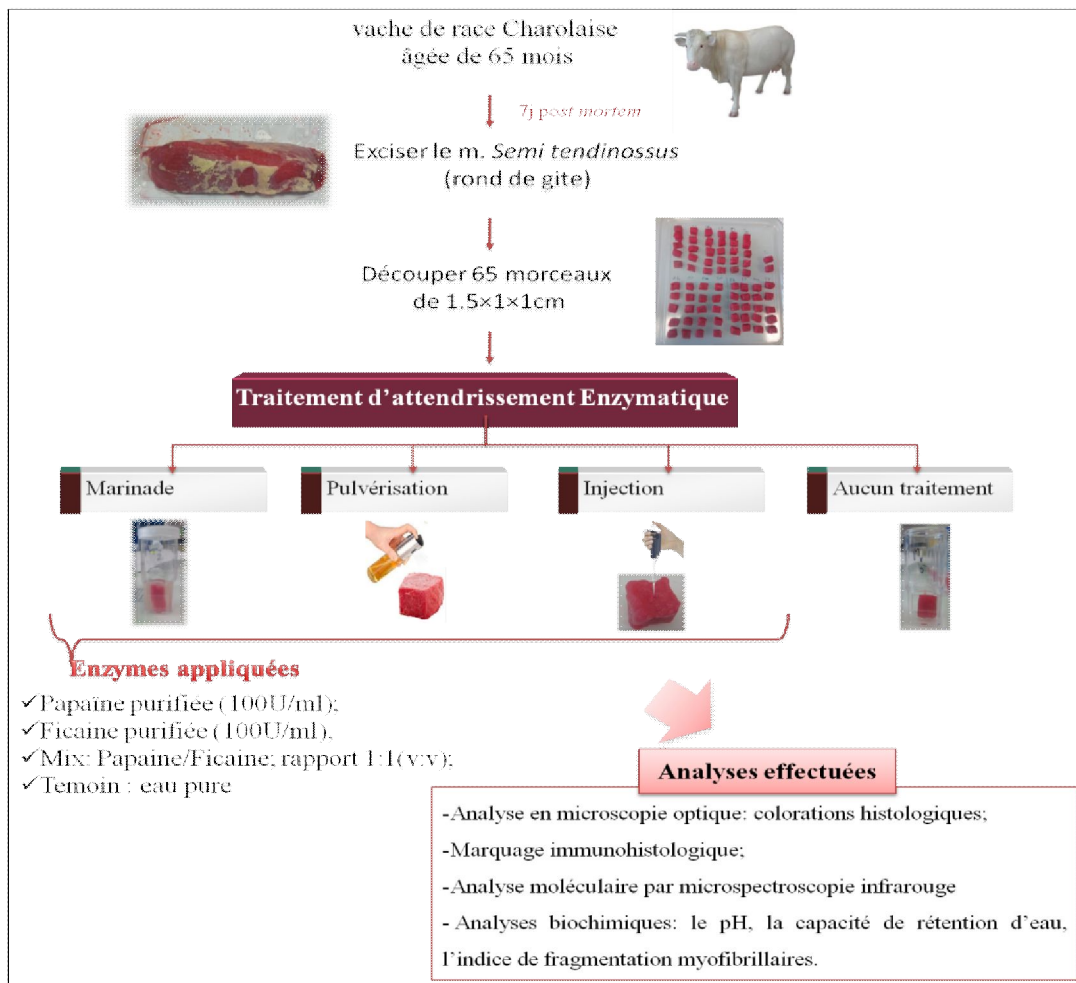
Par la suite, tous les échantillons traités ont été placés, 24h à 4°C, avant de faire l'objet d'analyses biochimique et structural.

**NB :** La procédure appliquée, pour le traitement d'attendrissement par injection a été adoptée, après optimisation. Plusieurs essais, en vue d'une meilleure procédure, permettent la diffusion homogène de l'enzyme dans le muscle et en particulier, de garantir la visibilité de la diffusion lors des traitements photoscopiques.



**Figure 25:** Traitement d'attendrissement par injection A) Mode d'application de l'enzyme par micropipette. B) Image montrant le morceau de compresse et son emplacement. C) Schéma représentatif de la diffusion de l'enzyme dans le morceau de viande

La figure 26 résume toutes les étapes d'application des solutions de protéase dans les morceaux de muscle semi tendineux.



**Figure 26:** Étapes de préparation et application de protéases sur le muscle semi tendineux de la vache charolaise

### 3. Analyse en microscopie optique

#### 3.1. Cryofixation

C'est une méthode de congélation ultrarapide permettant la conservation des structures, sans l'utilisation de produits chimiques. Dans un premier temps, l'isopentane (environ 200ml) a été versé dans un récipient en téflon (environ 400 ml, diamètre de l'ordre de 8 cm), il a été placé dans un bac de polystyrène, remplie, par la suite, avec de l'azote liquide (-196 °C). Cette opération permet le refroidissement de l'isopentane à -160°C (température d'équilibre entre la phase solide et la phase liquide). La présence de cristaux, dans le fond du bûcher d'isopentane atteste que celui-ci est à bonne température (-160°C). La présence des cristaux est régulièrement vérifiée, en piquant avec une aiguille, sinon de l'azote liquide est constamment rajouté.

Dans un deuxième temps, les échantillons de viande ont été collés sur un support de liège  $1,5 \times 1,5$  cm, à l'aide d'un milieu d'enrobage OCT compound (Milieu de montage OCT COMPOUND *Tissue - Tek Embedding medium for frozen tissue specimens* ref45 83 SAKURA). Par la suite, l'échantillon de muscle placé sur le liège est plongé, à l'aide d'une pince, dans le fond du récipient d'isopentane et maintenu en mouvement de rotation pendant au moins 30 secondes. Après congélation, l'échantillon est placé, dans un sac en plastique résistant préalablement identifié et coupé dans l'extrémité, puis stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse. Nous avons préparé 3 blocs, par type de traitement.

### 3.2. Réalisation des coupes

Pour la réalisation de coupe, du cryostat (Leica CM1950), cet instrument tranchant permet d'effectuer des sections à congélation rapides, pour la préparation de coupes utilisées en microscopie. Les microtomes permettent des coupes extrêmement fines, d'une épaisseur de 0,1 à 100  $\mu\text{m}$ .

Au départ, la température des échantillons de viande est remontée, de  $-80^{\circ}\text{C}$  à  $-20^{\circ}\text{C}$  (en les mettant dans un congélateur). Par la suite, l'échantillon est fixé sur la platine du microtome, à l'aide de l'OCT puis refroidi (appuyer sur \*\*\*). Ensuite, la platine supportant l'échantillon est placée sur le support de coupe situé dans le cryostat (Leica CM1950). Le couteau est déplacé par manipulation micrométrique en direction de l'échantillon. Ce dernier est alors dégrossi jusqu'à l'obtention d'une surface plane homogène. Le cryostat est ensuite réglé pour débiter des coupes de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur qui sont déposées par adsorption sur des lames de verre destinées à l'histologie ou des coupes de 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur adsorbées sur des lames de Fluorure de Baryum (BaF<sub>2</sub>) pour l'analyse en infrarouge. Les coupes sont ensuite déshydratées par un séchage à l'air libre et à température ambiante, pendant environ 10min et peuvent être conservées au congélateur à l'abri de l'air et de la lumière.

### 3.3. Colorations histologiques

Dans le but de visualiser l'impact des traitements d'attendrissement enzymatiques sur la structure et l'intégrité de la viande, les coupes ont été colorées avec deux types de colorations histologiques : Coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) et coloration Rouge Sirius (RS).

### 3.3.1. Coloration avec HES (Hématoxyline Eosine Safran)

La coloration à l'Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) est une coloration trichromique dite « topographique » en histologie. Elle permet de visualiser la morphologie des cellules afin de déterminer leur répartition, architecture et structure. Elle permet de distinguer les différents éléments qui constituent le muscle. C'est une coloration alliant une laque nucléaire (hématoxyline basique), colorant les noyaux en bleus, un colorant cytoplasmique (éosine acide) et le safran se fixant sur les structures acidophiles lâches du collagène (Astruc *et al.* 2010). Cette coloration est réalisée sur des lames de verre standard (lames *star frost*).

Les lames contenant les coupes ont été déposées, sur un portoir de lames, afin de faciliter les étapes de colorations. Le portoir de lames a été plongé dans le bac à coloration pendant 5min, en effet la solution d'Hématoxyline de Harris colore les noyaux en bleu violet. Ensuite, il a été placé dans les bacs à eau distillée (2 bains de 1min). Une deuxième coloration a été effectuée pendant 15sec dans le bac de la solution d'Eosine qui colore les fibres musculaires en rose, s'ensuit un autre lavage à l'eau distillée (2 bains de 1min). Par la suite, les coupes ont été déshydratées par 3 solutions d'éthanol ; la première à 80° (2min), la deuxième à 95° (5min) et enfin le dernier à 100° (5min). Les lames ont été plongées, pendant 8 min, dans le bac de la troisième coloration de Safran alcoolique. Cette dernière colore le tissu conjonctif en orangé. Ensuite, les lames ont subi deux passages (rinçages rapides), dans l'alcool à 100°, suivis de deux autres passages dans le Méthyl-cyclohexane.

Une fois les colorations réalisées, on peut procéder au montage entre lame et lamelle, afin de pouvoir conserver les coupes. Après avoir éliminé l'excès de colorant présent autour de la coupe et derrière la lame pour éviter toute coloration aspécifique, deux à trois gouttes du liquide de montage Eukitt (Eukitt O. Kindler GmbH Ziegelhofstra Be 79110 Freiburg Allemagne) ont été déposées sur la lame. La lamelle a été aussitôt posée, sur la préparation en évitant la formation de bulles d'air, pouvant être chassées avec un pic.

### 3.3.2. Coloration du collagène avec du Rouge Sirius

Cette coloration adaptée par Liu *et al.* (1994) permet de mettre en évidence la matrice extracellulaire des muscles. La coloration Rouge Sirius (RS) colore en rouge le collagène et, en jaune les fibres musculaires. Cette coloration est basée sur la compétition de deux colorants acides, l'acide picrique et le Rouge Sirius. En effet, lorsqu'une coupe est traitée successivement avec un mélange de deux colorants acides à coefficients de diffusion



différents, le plus diffusible des colorants se fixe sur les composants les plus denses, le moins diffusible sur les plus lâches. Dans le cas présent, le Rouge Sirius est moins diffusible que l'acide picrique qui se fixe sur les trames de collagène, moins denses que les fibres musculaires. Cette coloration est réalisée sur des lames de verre « *Super Frost +* » car elles sont chargées positivement, ce qui permet une meilleure adhérence des tissus.

Les lames ont été disposées dans un portoir spécial non teinté avant d'être plongé dans le bac d'acétone pendant 60min. Cette opération permet la fixation des coupes. Ensuite, les lames ont été transférées dans un autre portoir, avant de les plonger, durant 10min dans la solution de fixation de pico-formalin (aldéhyde formique 5%, éthanol 90%, acide picrique saturé). Par la suite, deux rinçages successifs ont été effectués : le premier dans l'éthanol à 90%, pendant 1min suivi, de 10min dans l'eau distillée. Après, les coupes ont subi une coloration dans la solution de rouge Picro-Sirius (Rouge Sirius 0.1%, acide picrique saturé), pendant 60min, avant de subir un passage dans le bac d'HCl 0.01M durant 5min, suivis de deux passages de 1min dans l'eau distillée. En vue de déshydrater les coupes, les lames ont été plongées dans les bacs à éthanol ; un premier passage dans l'éthanol 95°, suivi de deux passages successifs dans l'éthanol à 100° (deux bacs distincts). Et enfin, les lames ont subi deux autres passages dans le Méthyl-cyclohexane (deux bacs distincts). Pour le montage, deux à trois gouttes du liquide de montage Eukitt ont été déposées sur la lame, sur laquelle une goutte de Méthylcyclohexane (augmente la fluidité) a été ajoutée, pour que le milieu se diffuse sur toute la coupe. La lamelle a été aussitôt posée sur la préparation.

### **3.4. Marquage immunohistologique**

L'immunohistologie est une méthode de localisation de protéines, dans les cellules d'une coupe de tissu, par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps. Elle exploite le fait qu'un anticorps se lie spécifiquement à des antigènes dans les tissus biologiques. Les anticorps peuvent être d'origine polyclonale ou monoclonale, les anticorps monoclonaux étant plus spécifiques par essence.

Deux doubles marquages immunohistologiques ont été réalisés : Myosine (My) / collagène III et laminine / collagène I. Les chaînes lourdes globales de la myosine (MyHC) ont été identifiées, à l'aide d'un anticorps polyclonal primaire, l'anti-myosine développé chez le lapin (M7523 Sigma) et d'un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin, Cyanine Cy3 (rouge) IgG (Jackson Immuno Research Réf.111-165. Interchim). Les fibres de collagène III ont été identifiées, à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-collagène III, développé chez la souris (C7805 Sigma) et révélées par l'anticorps secondaire IgG anti-souris de chèvre (vert)



marqué Alexa Fluor 488 (A 11001Sigma). La laminine a été colorée en utilisant un anticorps polyclonal primaire (anti-laminine de lapin, L9393, Sigma), avec un anticorps secondaire de chèvre, anti-lapin marqué par IgG Cyanine Cy3 (jaune) (111-165-008, Jackson). Les fibres de collagène I ont été identifiées en utilisant, un anticorps monoclonal anti-collagène I (C2456 Sigma) et révélées par un anticorps secondaire, IgG de chèvre anti-souris marqué Alexa fluor 488 (vert) (A 11001Sigma).

Le double marquage a été effectué selon Meunier *et al.* (2010), après avoir encerclé les sections avec un marqueur hydrophobe. Toute la surface de la section a été recouverte d'une solution de sérum de chèvre normal à 10% (G9023 Sigma), dans du tampon PBS, pendant 10 min, pour réhydrater les coupes et éliminer les sites non spécifiques. Puis, elles ont été soumises, aux deux premiers anticorps appropriés, pendant 1h dans une boîte, ne filtrant pas la lumière et humide. Puis, elles sont lavées trois fois pendant 5 min, avec une solution de PBS Tween 20 (0,1%). Ensuite, elles ont été soumises au 2<sup>e</sup> anticorps approprié, pendant 1 h dans une boîte opaque et humide et également lavés, trois fois pendant 5 minutes avec une solution de PBS Tween 20 (0,1%). Ils ont finalement été recouverts de Fluoromount (F4680, SIGMA, USA). Des contrôles ont été effectués sans les premier et deuxième anticorps pour valider les résultats.

### **3.5. Acquisition d'images**

Les acquisitions des images ont été réalisées à l'aide d'un microscope à transmission Olympus BX61, équipé d'une caméra numérique couleur Olympus DP 71 et du logiciel Cell Sens. Pour toutes les colorations : HES et Rouge Sirius, des images ont été acquises, en fond clair, tandis que les images d'immunohistochimie ont été acquises en mode fluorescence. Pour chacun des trois blocs, de tous les échantillons, nous avons utilisé plusieurs grossissements : l'objectif x2, pour avoir une vision d'ensemble de la coupe, et l'objectif x4, pour avoir une définition suffisante pour détecter des altérations sur l'intégralité de la surface de la coupe. Par ailleurs, à l'objectif x10, nous avons acquis 30 champs représentatifs de l'ensemble de la coupe pour évaluer la dégradation des fibres.

## **4. Analyse moléculaire : la microspectroscopie infrarouge**

### **4.1. Acquisition de spectre**

Les analyses moléculaires ont été réalisées, selon Astruc *et al.* (2012), avec un microscope IR équipé d'un détecteur de mercure-cadmium-tellure (Nicolet iN10, Thermo Fisher) et du logiciel Omnic Picta (v7.3, Thermo Scientific, USA). Des coupes en série (6

$\mu\text{m}$ ), déposées sur des fenêtres BaF<sub>2</sub>, ont été placées sur la platine du microscope et en utilisant le logiciel de mise au point Omnic Picta. Des mosaïques à fond clair ont été réalisées pour avoir une vue générale des échantillons, afin de se tenir sur les zones d'intérêt. Les spectres IR ont été collectés point par point, en myofibre avec une résolution spatiale de 30 X 30  $\mu\text{m}$  et 10 X 10  $\mu\text{m}$  dans le périmètre, dans une gamme de 4000–650  $\text{cm}^{-1}$  et enregistrés à une résolution spectrale de 8  $\text{cm}^{-1}$ . Le détecteur a été refroidi par de l'azote liquide pour avoir la meilleure résolution spectrale. 64 balayages sont effectués par spectre, nécessitant 12 secondes, pour chaque acquisition de spectre. Le blanc (arrière-plan) a été acquis sur la diapositive à l'extérieur de la section avec 128 balayages, nécessitant 25 secondes, avant de commencer l'analyse. Il a été automatiquement soustrait de chaque lot d'acquisitions spectrales. Environ 25 spectres IR pour les myofibres et 20 spectres pour le tissu conjonctif ont été collectés le long d'une ligne dans une zone sélectionnée. En outre, des cartes spectrales IR, de zones définies, ont été obtenues par balayage raster, de l'échantillon à l'aide d'un étage x-y commandé par ordinateur avec des étapes de 10  $\mu\text{m}$   $\times$  10  $\mu\text{m}$ . Les valeurs obtenues, à partir de l'analyse spectrale ont été cartographiées, sur l'image optique correspondante pour créer les images chimiques des échantillons traités et non traités.

Les paramètres étant fixés, on a ciblé les fibres (ouverture 30 $\mu\text{M}$ ) et le tissu conjonctif (15 $\mu\text{M}$ ), sur le bord de la coupe et au centre de la coupe (autour du trou, dans le cas de l'injection). On a fait le choix de prendre entre 20 et 40 points. On a aussi pris 30 points, dans le trou pour les échantillons injectés (15 points sur les fibres du coton et 15 points sur les cellules digérées).

#### 4.2. Prétraitements des spectres

Les spectres ont été prétraités, avant l'analyse multivariée, à l'aide du logiciel Unscrambler (v9.8, Camo Software AS, Norvège). La correction multiplicative étendue du signal (EMSC) a été utilisée pour corriger les artefacts spectraux (Kohler *et al.* 2005), en supprimant les effets physiques de diffusion, de la lumière des effets chimiques d'absorbance de la lumière. Le spectre de référence représentatif pour l'ensemble de données a été calculé comme la moyenne de tous les spectres. Afin d'améliorer la résolution spectrale, une seconde dérivée, basée sur 9 points de lissage de Savitzky-Golay et utilisant un troisième degré polynomial, a été appliquée. Les données dérivées secondes ont été multipliées par (-1), pour plus de clarté.

## 5. Analyses statistiques

L'analyse en composants principaux (PCA) a été réalisée à l'aide du logiciel Unscrambler (v9.8, Camo Software AS, Norvège). Dans le présent travail, le calcul de l'ACP est basé sur des projections itératives non linéaires par l'algorithme NIPALS (Alternating Meast-Squares). Des graphiques de score ont été utilisés pour montrer des cartes de similarité, permettant de comparer les spectres indépendamment des catégories d'échantillons. Des graphiques de charge de corrélation dérivés des graphiques de charge X des premier et second composants principaux ont été adoptés, pour révéler et identifier les bandes d'absorption vibratoire caractéristiques.

Avant de choisir les différents paramètres des protocoles adoptés pour l'application des protéases sur la viande, nous avons fait une synthèse des études qui ont travaillé sur ce sujet et nous avons réalisé cette synthèse présentée dans le tableau 05.

**Tableau 05:** Paramètre et conditions appliqués pour l'attendrissage enzymatique

Paramètre	Conditions	Références
Muscles choisis	<i>Semi tendinosus</i>	Foegeding & Larick (1986) Botinestean <i>et al.</i> (2017) Akpan <i>et al.</i> (2015) Wada <i>et al.</i> (2002) Mckeith <i>et al.</i> (1994) Tappel <i>et al.</i> (1956)
	<i>Semi membranosus</i>	Lee <i>et al.</i> (1986) Toohey <i>et al.</i> (2011) Kang <i>et al.</i> (1974)
	<i>Longissimus lumborum</i>	Lee <i>et al.</i> (1986) Liu <i>et al.</i> (2011) Barekat & Soltanizadeh (2017) Schenkova <i>et al.</i> (2007)
	<i>Longissimus thoracis</i>	Schenkova <i>et al.</i> (2007)
	<i>Biceps femoris</i>	Lee <i>et al.</i> (1986) Pawar <i>et al.</i> (2007) Naveena & Mendriatta (2001) Christensen <i>et al.</i> (2009) Naveena & Mendriatta (2004) Miyada & Tappel (1956)
	<i>Triceps brachii</i> et <i>Supraspinatus</i>	Sullivan & Calkins (2010)
	côtés gauche et droit de la douzième côte de deux vachest matures	Lewis & Liu (1988)
	Epaule	Qihe <i>et al.</i> (2006 Gerelt <i>et al.</i> (2000)
	Cuisse de bœuf	Kolle <i>et al.</i> ,2004
	Cuisse et poitrine de bœuf	Ashie <i>et al.</i> (2002)
	Muscle pectoral et cuisse	Bhaskar <i>et al.</i> , (2006)
	Muscle pectoral	Gao <i>et al.</i> (2011) Doneva <i>et al.</i> (2015) Fogle <i>et al.</i> (1982)

		Tsai <i>et al.</i> (2012)
	Gros morceaux de jarret (porc, bœuf et poulet)	Rawdkuen <i>et al.</i> (2013)
	Morceaux uniformes de bœuf, poulet et calmar	Ketnawa & Rawdkuen (2011)
	Morceaux de bœuf (500g avec total de 2 kg)	Islam & Molinar-toribio (2013)
<b>Dimension de viande</b>	1.5×1.5×1.5cm	Barekat & Soltanizadeh (2017) Lewis <i>et al.</i> (1988)
	2 cm <sup>3</sup>	Lee <i>et al.</i> (1986) Naveena & Mendriatta (2001)
	1.5×2cm pour un poids de 150-200g	Istrati <i>et al.</i> (2012)
	2,5 ×2.5×2.5cm	Foegeding & Larick (1986)
	2.54cm d'épaisseur	Kolle <i>et al.</i> , (2004) Botinestean <i>et al.</i> (2017) Sullivan & Calkins (2010)
<b>Dimension de viande</b>	3 ×3×3 cm	Naveena & Mendriatta (2004) Pawar <i>et al.</i> (2007) Barekat & Soltanizadeh (2017) Naveena <i>et al.</i> (2004) Gao <i>et al.</i> (2011) Ketnawa & Rawdkuen (2011)
	3×3×0.5cm (calmar)	Ketnawa & Rawdkuen (2011)
	3×3×2 cm	Gerelt <i>et al.</i> (2000)
	5×5×3cm	Qihe <i>et al.</i> (2006)
	2.5×0.5cm	Fogle <i>et al.</i> (1982)
	6×2×2cm	Chaurasiya <i>et al.</i> (2015)
	7×5×5mm	Wada <i>et al.</i> (2002)
	5mm d'épaisseur	Tsai <i>et al.</i> (2012)
	Cylindrique (5/8 pouce (inch) d'épaisseur et 1 inch de diamètre)	Tappel <i>et al.</i> (1956)
	Même dimensions pour un poids de 120g	Istrati <i>et al.</i> (2008)
	Muscle pectoral et la cuisse	Bhaskar <i>et al.</i> (2006)
	Morceaux de 500g	Islam & Molinar-toribio (2013)
	100g	Akpan & Omojola (2015)
	500g	Schenkova <i>et al.</i> (2007)
	3 – 5g de viande de dinde	Doneva <i>et al.</i> (2015)
5-g. de viande de bœuf séchée congelée	Miyada & Tappel (1956)	
<b>Quantité d'enzyme</b>	3g ou 6g d'enzyme (collagenase, bromelaine, ficine et papaïne)/ 100g de viande	Foegeding & Larick (1986)
	2.5% d'enzyme (zingibaine)	Bhaskar <i>et al.</i> (2006)
	0, 1, 3 et 5% zingibaine(v/w) pour un volume final de 10% (10ml/100g de viande)	Naveena & Mendriatta (2001)
	0, 1, 3, 5 et 7% zingibaine (v/w) + 600ppm acid ascorbique + 2%NaCl + 0.5% STPP pour un volume final de 15% (15ml/100g de viande)	Pawar <i>et al.</i> (2007)
	0.1% papaïne (marinade + ultason)	Barekat & Soltanizadeh (2017)
	335g/1000g papaïne (marinade)	Barekat & Soltanizadeh (2017)
	30ml actinidine ou papaïne (retourner le morceau 4 fois)	Lewis <i>et al.</i> (1988)
	6, 12, 18, 24 et 30mg papaïne +100ml d'eau distillée	Gao <i>et al.</i> (2011)

	2, 4, 6, 8 et 10ml ananas +100ml d'eau distillée 3, 4, 5, 6 et 7ml ginger 100ml d'eau distillée	
	2% (cucumisine), 5% (zingibaine) et 0.2% (papaïne)	Naveena <i>et al.</i> (2004)
	0.3 papaïne ou bromelaine/100g de viande et 0.15 :0.15 (P&B)/100g de viande	Botinestean <i>et al.</i> (2017)
	10mg/100g de viande (bromelaine)	Arshad <i>et al.</i> (2016)
	Poudre de bromelaine (200U/g de viande reconstituée avec de l'eau triple distillée à un rapport 1/1 (w/v)	Chaurasiya <i>et al.</i> (2015)
	0, 3, 7, 10 et 20% de poudre de bromelaine	Ketnawa & Rawdkuen (2011)
	0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 et 1% d'extrait de papaïne	Akpan & Omojola (2015)
	0.01% (w/v) solution de papaïne	Schenkova <i>et al.</i> (2007)
Quantité d'enzyme	0%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, and 0.5% (w/w) du latex de <i>Calotropis procera</i>	Rawdkuen <i>et al.</i> (2013)
	Bromelaine ou papaïne avec 50U/ml, 100U/ml et 200U/ml dissoute dans une solution contenant 0.9% NaCl, Sodium hydrogen carbonate et acide citrique pH 6.3	Doneva <i>et al.</i> (2015)
	10 ml. de 1% de solution enzymatique (Bromelain, papain, ficin, pepsin, .....)	Miyada & Tappel (1956)
	500ml d'extrait de zingibain	Tsai <i>et al.</i> (2012)
	0.002 à 0.05 AU /100g viande pour une augmentation de 5% du poids (asparticprotease ou papain)	Ashie <i>et al.</i> (2002)
	93g/l de marinade neutre (81% maltodextrine +19% amidon) + 0.2, 5.5, 8.3, et 11g/l d'actinidine pour un gain de poids de 16%	Christensen <i>et al.</i> (2009)
	0.1% papaïne et 1% protease de aspergillus	Gerelt <i>et al.</i> (2000)
	Saumure (2g sel) + 0.005, 0.007 et 0.010mg papaïne/ 100g de viande pour un gain de 10% de poids	Istrati (2008)
	Saumure (2g sel) + 2mg (soit papain ou bromelaine ou (1 :1) papaine : bromelaine) d'enzyme /100g de viande pour un gain de 10% de poids	Istrati <i>et al.</i> (2012)
	0, 0.05, 0.1, 0.2 et 0.4ml zingibaine par 6.5cm <sup>3</sup> en pressant 2 fois avec un bloc de six aiguilles espacé de 1cm	Lee <i>et al.</i> (1986)
	0.02% enzyme (liquide du pancréas du porc) + 0.5%NaCl + 0.25% sodium tripolyphosphate	Pietrasik <i>et al.</i> (2010)
	25% du jus de kiwi par rapport au poids initial de viande	Toohey <i>et al.</i> (2011)
	0.004% de broméline jusqu'à un gain de 103% du poids avec un injecteur multi-aiguilles	Kolle <i>et al.</i> (2004)
	Injection jusqu'à augmentation de 105% du poids initial.	Sullivan & Calkins (2010)
	Bromelaine et papaïne avec un gain de 10% du poids	Fogle <i>et al.</i> (1982)
	0, 3, 5 et 7% zingibaine (v/w) pour un volume final de 15%	Naveena & Mendriatta (2004)
	A) 10g (30 g poudre de pelure de papaye + 30g de Garam Musala + 35g NaCl + 5g de sodium glutamate (total 100g) B) 13g (60 g poudre de pelure de papaye + 30g de Garam Musala + 35g NaCl + 5g de sodium glutamate (total 130g) C) 7g (30g de Garam Musala + 35g NaCl + 5g de sodium glutamate (total 70g)	Islam & Molinar-Toribio (2013)
	Poudrer la papaïne en surface	Tappel <i>et al.</i> (1956)
	50 ppm bromeline. 100 ppm bromeline, 50 ppm papaine et 100 ppm	Mckeith <i>et al.</i> (1994)

	papaine. traitées par: Marinade, injection,. tunibled	
Temps et température	4°C /1 à 14 jours puis congélation à -20°C (kiwi)	Toohey <i>et al.</i> (2011)
	5°C/ 0, 1, 3, 5 et 7 jours	Tsai <i>et al.</i> (2012)
	10 min dans un tambour à vide puis repos 30min ensuite 4°C/7 jrs	Sullivan & Calkins (2010)
	4°C / 24, 48 et 168h (papaine et protéases d' <i>aspergillus</i> )	Gerelt <i>et al.</i> (2000)
	4°C / 24, 48 et 72h (papaine et Bromelaine)	Doneva <i>et al.</i> (2015)
	4°C /48h puis 20min/180°C au four pour T° final 75°C (zingibaine)	Naveena & Mendriatta (2004)
	4°C / 48h puis cuit au four à 75°C/20 min (papaine, zingibaine et cucumis)	Naveena <i>et al.</i> (2004)
	4°C /24h puis cuisson dans un four pour une température au cours de 70°C (zingibaine)	Naveena & Mendriatta (2001)
Temps et température	4°C/24h accroissement de la température à 1°C/min jusqu'à 70°C (bromélaïne)	Arshad <i>et al.</i> (2016)
	4°C/24h puis congélation à -28C. 4°C/20h puis cuisson à l'eau à 74°C pour une T° à cœur de 68°C	Mckeith <i>et al.</i> (1994)
	4°C /1h puis cuisson au four jusqu'à 70°C (zingibaine)	Lee <i>et al.</i> (1986)
	4°C /1h puis traitement de pression	Schenkova <i>et al.</i> (2007)
	4°C /1h	Rawdkuen <i>et al.</i> (2013)
	Culbuter à 5rpm (8pas) à 2 à 4°C (pour assurer une distribution adéquate de l'enzyme « papaine ou enzyme microbienne) puis cuisson 55, 65 et 75°C	Ashie <i>et al.</i> (2002)
	2 ± 2°C /14 à 21 jours (emballé dans des sacs sous vide) (bromélaïne)	Kolle <i>et al.</i> (2004)
	2°C / 48h (emballé sous vide) (actinidine)	Christensen <i>et al.</i> (2009)
	8-10°C / toute la nuit (13 à 16h), ajouter 5ml d'eau distillée pour cuisson au bain marie (plusieurs modes)	Fogle <i>et al.</i> (1982)
	20°C/ 2h puis cuisson dans un bain marie à 20°C jusqu'à 65°C à 1°C/min (collagenase, bromelaine, ficine et papaine)	Foegeding & Larick (1986)
	28°C+2 /3h puis cuisson à la vapeur 1h sans pression (gingembre)	Bhaskar <i>et al.</i> (2006)
	20°C /30min tourner 4 fois sur les quatre faces puis griller 10 à 15min/70°C (actinidine et papaine comme témoin)	Lewis <i>et al.</i> (1988)
	Assaisonner puis piquer avec une fourchette, ensuite enrouler par un papier aluminium et laisser 2h à température ambiante, enfin cuire au four 1h /150°C	Islam & Molinar-Toribio (2013)
	25°C+3°C /2h puis lavé et séché (bromelain)	Chaurasiya <i>et al.</i> (2015)
	T° ambiante /60min dans une boîte en plastique	Ketnawa & Rawdkuen (2011)
	20°C/15min (kiwi proteases)	Wada <i>et al.</i> (2002)
	3h/T° ambiante, 30 min/T° ambiante et 10min de grillade (papaine)	Tappel <i>et al.</i> (1956)
	37°C/ 90min, pH7 ; (papaine) 50°C/ 60min pH7 ; (ananas) 40°C /60min, pH8 (gingembre)	Gao <i>et al.</i> (2011)
	Cuisson au bain marie 60°C/1h	Miyada & Tappel (1956)
	65°C/30min (T° optpapaine entre 65°C et 80°C) in temperature-controlled incubation chamber	Barekat & Soltanizadeh 2017
	20min dans des sacs sellé avec une continuelle agitation puis cuisson dans un bain marie agitateur 68°C/20min et enfin	Botinestean <i>et al.</i> (2017)

	inactivation de l'enzyme 5min/82°C. puis réfrigération toute la nuit	
	Cuisson 100°C/ 20min (papaïne)	Akpan & Omojola (2015)
Témoïn	Aucun traitement	Toohey <i>et al.</i> (2011) Wada <i>et al.</i> (2002) Doneva <i>et al.</i> (2015) Schenkova <i>et al.</i> (2007) Mckeith <i>et al.</i> (1994) Sullivan & Calkins (2010) Tsai <i>et al.</i> (2012)
	Eau potable 1 :1 (v/w)	Bhaskar <i>et al.</i> (2006)
	Eau distillée	Naveena & Mendriatta (2001) Gao <i>et al.</i> (2011) Naveena <i>et al.</i> (2004) Toohey <i>et al.</i> (2011)
Témoïn	Eau déminéralisée	Gerelt <i>et al.</i> (2000) Foegeding & Larick (1986)
	Eautridistillée	Chaurasiya <i>et al.</i> (2015)
	2% NaCl	Foegeding & Larick (1986) Istrati (2008)
	0.6% NaCl + 0.3% Sodium triphosphate jusqu'à un gain de 110% du poids.	Kolle <i>et al.</i> , (2004)
	7g (30g de Garam Musala + 35g NaCl + 5g de sodium glutamate	Islam & Molinar-Toribio (2013)
Volume solution de marinade	100ml	Gao <i>et al.</i> (2011)
	200ml	Foegeding & Larick (1986)
	30ml	Lewis <i>et al.</i> (1988)
	15ml	Naveena <i>et al.</i> (2004)

# Résultats et discussion



## Chapitre II : Résultats et discussion

### I. Papaïne

#### 1. Résultat de l'optimisation du protocole de purification de la papaïne

Les protéases sont les principaux agents actifs, dans plusieurs secteurs industriels grâce à leurs propriétés d'activité, sur une large plage de températures et pH. Compte tenu de leurs utilisations industrielles à forte potentialité, le développement de méthodes simples et efficaces pour leur récupération et leur purification est devenu une nécessité. Comme indiqué ci-dessus, TPP convient parfaitement à cet objectif car il est économique, rapide et simple à mettre en œuvre, en vue d'atteindre un maximum de pureté et un haut rendement de la protéase, en une seule étape.

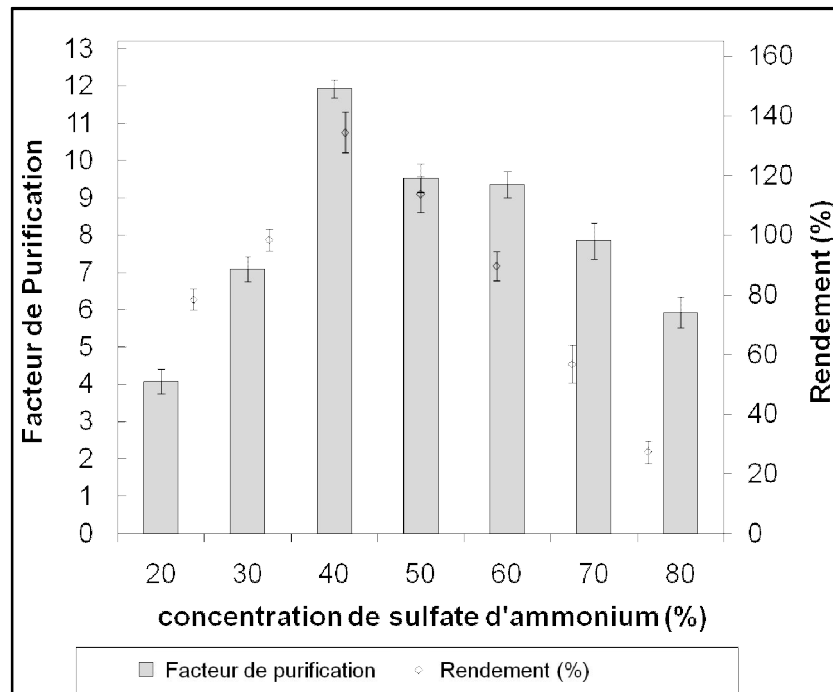
Le système TPP est innovant dans son utilisation, pour la récupération et la purification de la papaïne du latex de papaye. L'objectif principal de son emploi était d'atteindre une pureté maximale et un rendement en papaïne de latex. Par conséquent, les effets de divers paramètres sur TPP ont été étudiés. La concentration de protéine de départ, de l'extrait brut et son activité enzymatique étaient de 9,6 mg/mL et 52,1 U/mL, respectivement (tableau 1). A partir de cet extrait brut, différentes expériences de partitionnement à diverses (i) saturations (p/ v) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% et 80%; (ii) rapports extrait brut / t-BuOH (v / v): 1,0: 0,5, 1,0: 0,75, 1,0: 1,0, 1,0: 1,25, 1,0: 1,5 et 1,0: 2,0; (iii) pH: 3,0,4,0, 5,0, 6,0, 7,0 et 8,0; et (iv) températures: 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C et 40°C, ont été optimisées afin d'obtenir le taux de purification et le rendement les plus élevées.

Dans toutes les expériences TPP de cet essai, la papaïne se répartit exclusivement dans la phase aqueuse (Figure 33A). Dans cette phase inférieure, un rendement d'activité enzymatique et une pureté élevée ont été retrouvés tels évalués par SDS-PAGE (Figure 33B).

##### 1.1. Résultats de l'effet de la saturation en sulfate d'ammonium

Le taux de purification maximal de 11,92 fois, avec un rendement de 134,4% de l'activité de la papaïne dans la phase aqueuse, a été obtenu avec 40% de saturation à  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (figure 27). En dessous et au-delà de cette concentration de sel, une diminution du pourcentage de récupération de la protéase de papaye de latex a été observée. Cela s'expliquerait par la dénaturation irréversible de la protéine (Dennison & Lovrien 1997; Dhananjay & Mulimani 2008; Gagaoua *et al.* 2015). À cet égard, la saturation en sulfate

d'ammonium est d'une importance cruciale et joue un rôle majeur dans le système TPP, car elle est responsable d'interaction protéine – protéine et la précipitation. Par conséquent, La concentration de 40% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a été choisie comme le meilleur pourcentage pour l'optimisation des autres paramètres de purification.



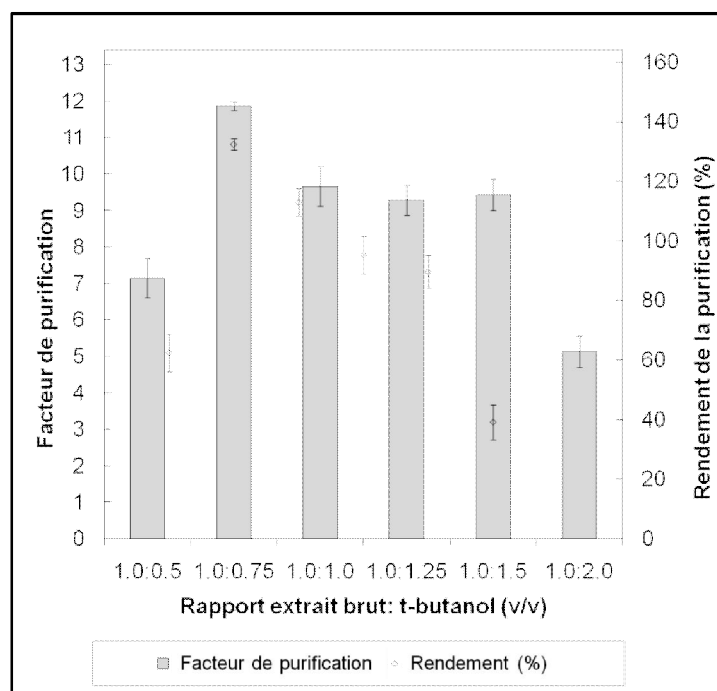
**Figure 27:** Effet de la concentration de sel de sulfate d'ammonium sur le rendement et le facteur de purification de la papaïne par le système TPP

Cette concentration de sel était suffisante pour concentrer la protéase avec la pureté souhaitée. Nous pouvons suggérer qu'à une saturation inférieure, le sulfate d'ammonium était incapable de modifier la surface hydrophobe de la papaïne. En augmentant la concentration de sel, les tensions superficielles et interfaciales du système TPP ont augmenté après le comportement interfacial des protéines dans le système TPP (Kiss *et al.* 1998; Gagaoua 2018). Il est bien connu que dans le système TPP, le relargage d'une protéine par  $\text{SO}_4$  peut être visualisé de différentes manières: (i) effets de force ionique, (ii) kosmotropie, (iii) déshydratation (facteur de stress osmotique), (iv) encombrement d'exclusion et (v) liaison du  $\text{SO}_4^{2-}$  aux sites cationiques de la protéine ciblée (Gagaoua 2018).

Les résultats obtenus pour ce premier paramètre sont en accord avec les propriétés connues des protéases, pour précipiter à 40–60% de saturation  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Par exemple, dans l'étude de Chaiwut *et al.* (2010), les principales protéases extraites des écorces séchées de papaye se sont précipitées dans la phase aqueuse du système TPP en deux étapes.

## 1.2. Résultats de l'effet du rapport l'extrait brut :t-BuOH

La quantité relative de t-BuOH dans l'extrait protéique est très importante dans le système TPP. La saturation en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a été fixée à 40% et le rapport de l'extrait brut au t-BuOH variait de 1,0: 0,5 à 1,0: 2,0 (Figure 28). Le meilleur facteur de purification (11,87) et le rendement (132,3%) ont été obtenus avec des rapports de 1,0: 0,75 (v / v). Auparavant, Gagaoua (Gagaoua 2018) a constaté que le rapport optimal de t-BuOH résulte de deux conditions. Si la quantité de t-BuOH est inférieure, elle ne suffit pas pour synergiser avec le sel (Gagaoua *et al.* 2014; Gagaoua & Hafid 2016); cependant, s'il est plus élevé, il est probable de provoquer une saturation du milieu et donc, de diminuer fortement l'activité de la protéase ciblée (Dennison 2011). La raison de cette baisse du rendement de production serait due à une augmentation de la viscosité du milieu. Cependant, en raison de la grande taille moléculaire et de la structure ramifiée de t-BuOH, aucune perméation à l'intérieur des protéines repliées ne peut se produire, et nous supposons qu'aucun effet de dénaturation direct ne peut être observé.



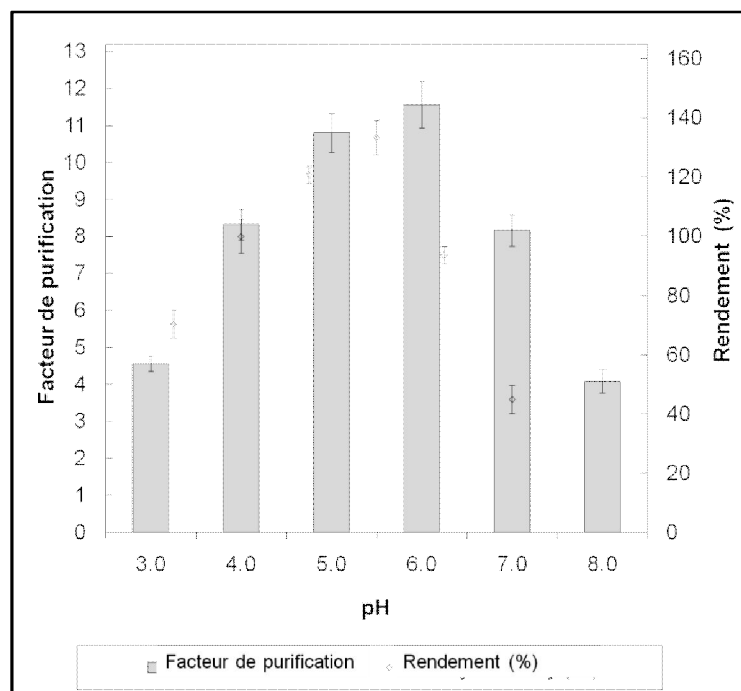
**Figure 28:** Effet du rapport extrait brut : t-butanol sur le rendement et le facteur de purification de la papaine par le système TPP

A noter que la plupart des études ont rapporté une augmentation des activités des enzymes récupérées dans les mélanges t-BuOH / eau (Tan & Lovrien 1972), c'est une particularité du t-BuOH. Cela est confirmé, suite à plusieurs études (Gagaoua & Hafid 2016; Nadar *et al.* 2017; Gagaoua 2018; Yan *et al.* 2018; Chew *et al.* 2019). Nous pensons que cela

est lié à la nature kosmotrope de ce C4alcool non ionique, qui stabilise les interactions intramoléculaires dans les protéines et offre ainsi un processus de déshydratation plus doux par rapport aux petites molécules de méthanol, d'isopropanol ou d'éthanol (Gagaoua *et al.* 2016; Gagaoua *et al.* 2017), qui peuvent pénétrer facilement, et donc dégradent de nombreuses protéines (Dennison & Lovrien 1997; Dennison 2011)

### 1.3. Résultats de l'effet du pH

Le pH du milieu est très important pour une meilleure récupération et une meilleure activité de la protéase ciblée. En effet, cela affecterait la concentration en protéines de manière que la charge nette dépendant du pH, en raison des interactions électrostatiques entre les phases et les résidus chargés de la protéine (Gagaoua 2018).



**Figure 29:** Effet du pH sur le rendement et le facteur de purification de la papaïne par le système TPP

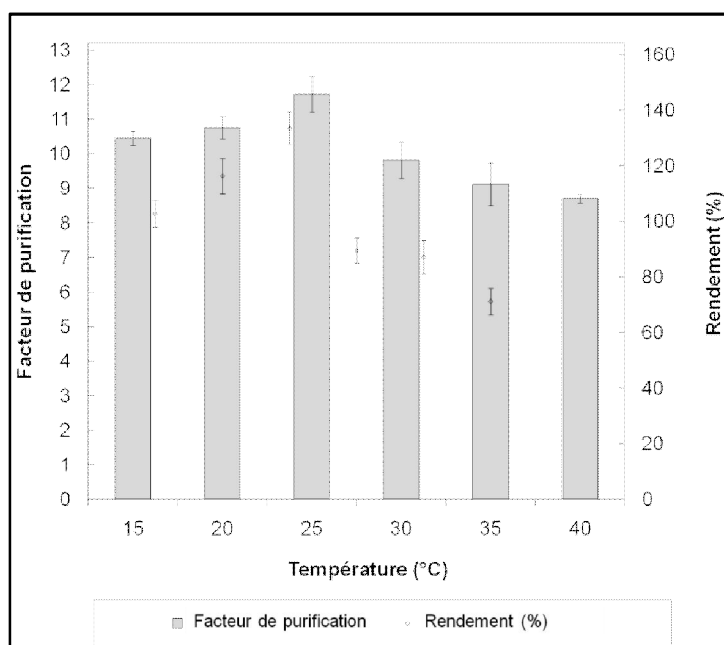
La papaïne récupérée a été séparée sélectivement dans la phase aqueuse à pH 6,0, comme la meilleure condition, permettant ainsi d'atteindre le facteur de purification et le rendement les plus élevés, à raison de 11,55 et 133%, respectivement. Le comportement du système TPP pour le pH, est illustré dans la figure 29. Le rendement élevé à ce pH pourrait être le résultat d'une meilleure stabilité conformationnelle de la papaïne vis-à-vis du t-BuOH et du sel à ce pH. Sans quoi, le rendement est très faible à pH 3,0, 4,0 ou 7,0 et 8,0, mais aussi

intéressant à pH 5,0. Selon Pike & Dennison (1989), la solubilité des protéines était maximisée, lorsque le système TPP était effectué au pI de la protéine. Selon Gagaoua (2018), lorsque le pH du système est bien inférieur au pI de la protéine, il y aura une accumulation de protéine cible dans la phase interfaciale; et lorsque le pH du système est beaucoup plus élevé que le pI de la protéine, il y aura une accumulation de la protéine cible dans la phase aqueuse.

L'analyse en électrophorèse bidimensionnelle (Figure.33D) confirme cette affirmation car le pI de la papaïne récupérée est principalement autour de 4,3, cela concorde avec à la récupération dans la phase aqueuse, de plusieurs cystéine protéases telles que la zingibaïne (Gagaoua *et al.* 2015), calotropaine (Rawdkuen *et al.* 2010) ou la papaïne de feuilles de papaye séchées (Chaiwut *et al.* 2010).

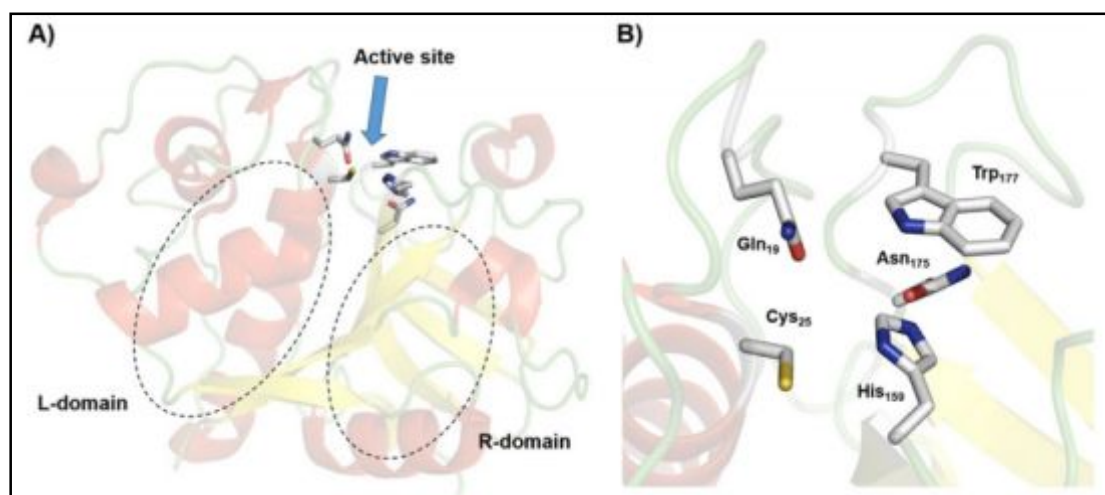
#### 1.4. Résultats de l'effet de la température

L'effet de la température sur la configuration de la protéase et la stabilité globale ont été également étudiées aux paramètres optimisés, ci-dessus à savoir 40% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , un rapport de 1: 0,75 (v / v) de l'extrait brut : t-BuOH et pH 6,0. La récupération de la papaïne a augmenté avec l'augmentation de la température de 15 à 25°C, puis elle a diminué (Figure 30). À des températures supérieures à 25°C, il peut ne pas y avoir d'effets kosmotropes et d'encombrement, qui ont entraîné une diminution du rendement et de la pureté de la papaïne. Ainsi, le facteur de purification (11,74) et le rendement d'activité (134%) les plus élevés ont été obtenus à 25°C.



**Figure 30:** Effet de la température sur le rendement et le facteur de purification de la papaïne par le système TPP

En accord avec nos conclusions, l'étude de Jian *et al.* (2015) ont étudié l'effet de la température sur le rendement et le facteur de purification de la papaïne séparés par partitionnement, par affinité métallique dans les systèmes aqueux bi-phasiques à 25, 35 et 45°C. Ils ont observé que le rendement et le facteur de purification de la papaïne étaient quasiment identiques aux trois températures étudiées, indiquant ainsi, moins de variation quelle que soit la température. On peut relier cette résistance à la température et à l'augmentation de l'activité de la papaïne, à sa structure tridimensionnelle car elle affiche une protéine globulaire avec trois liaisons disulfure et deux domaines catalytiques L et R (Figure 31).

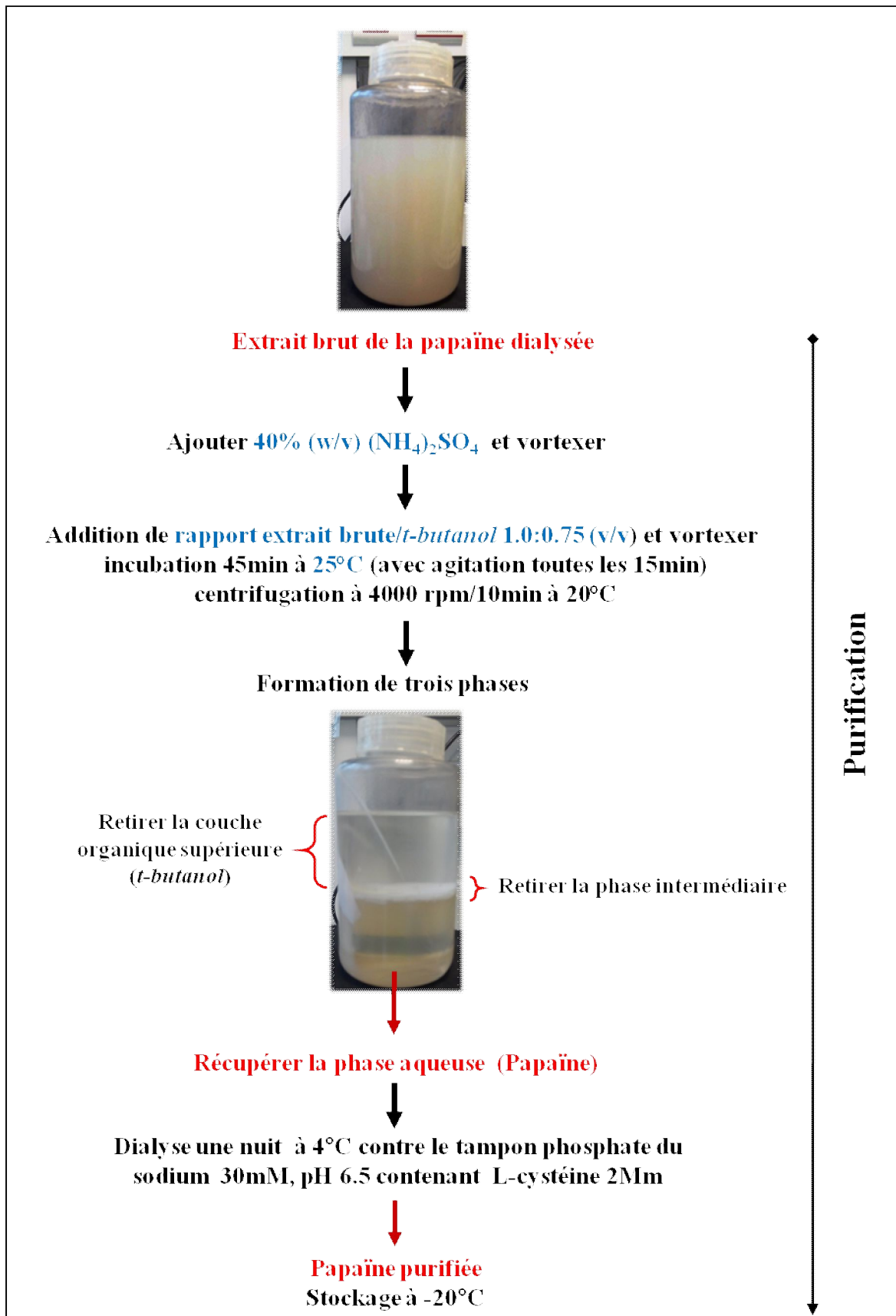


**Figure.31** : (A) Structure tridimensionnelle de la papaïne (PDB code d'accès 1PPN). La flèche indique l'emplacement du site actif. (B) résidus catalytiques dans le site actif de la papaïne. Cys25 et His159 forment la paire d'ions catalytiques (Fernández-Lucas *et al.* 2017).

À partir de ce graphique, Fernández-Lucas *et al.* (2017) ont souligné que le Trp177, impliqué dans la génération du caractère nucléophile de la paire d'ions Cys25 / His159, joue un rôle important dans sa stabilité.

### 1.5.Évaluation globale du profil de purification de la papaïne par le système TPP

Le protocole de purification mis en place, lors de cette étude consiste en une série d'étapes d'extraction, suivi d'une concentration de l'extrait enzymatique dialysé (EBD) par l'ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , puis un fractionnement par l'addition du *t*-butanol et enfin une stabilisation par dialyse contre le tampon phosphate de sodium 30mM pH 6.5. La figure 32 illustre l'ensemble des étapes d'extraction et de purification avec les conditions opératoires correspondantes, après optimisation.



**Figure 32:** Protocole optimisé de la purification de la papaïne du latex de papaye par le système de répartition en trois phases.

La séparation et la concentration de la papaïne du latex de *C. papaya* avec le système TPP est donné dans le profil de purification global du tableau 6 ci-dessous, la papaïne partitionnée a tendance à se concentrer dans la phase inférieure du système TPP, en utilisant des paramètres optimaux de 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , rapports de l'extrait brut au t-BuOH 1,0: 0,75 (v :v) à pH 6,0 et à 25°C, où un rendement de purification de l'ordre de 134% et un facteur de purification de 11,45 ont été atteints. L'activité spécifique de la fraction récupérée est 62,11 U/mg.

**Tableau 06** : Profil de purification global de la papaïne du latex de *C. papaya* par le système TPP

Étapes de Purification	Activité enzymatique (U/ml)	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	52.1	9.60	5.43	1.00	100
Phase aqueuse	69.57	1.12	62.11	11.45	134
Phase intermédiaire	1.16	6.49	0.18	0.03	2.2

Le tableau 07 résume les différentes méthodes et stratégies utilisées pour la purification de la papaïne de différentes parties de *C. papaya*, en comparaison avec notre étude. Dans l'ensemble, le protocole que nous avons développé a donné, approximativement, les meilleurs résultats en termes de rendement et de taux de purification. Par exemple, He *et al.* (2014) ont purifié la papaïne des fruits de papaye vertes par chromatographie d'adsorption sur lit expansé en phase inversée ; ils ont obtenu d'une fraction de papaïne de 23,4 kDa, avec un rendement d'activité de 74,98% et un facteur de purification de 7,04. Purwanto (2016) a utilisé la chromatographie d'échange d'ions après 60% de saturation, au sulfate d'ammonium, et il a trouvé un très faible rendement de purification de 10,7. D'autres études ont appliqué le système aqueux à deux phases, et ont rapporté un rendement global allant de 72 à 88% (Nitsawang *et al.* 2006; Rocha *et al.* 2016). Tandis que Chaiwut *et al.* (2010). Ils ont eu recours à deux cycles de TPP pour la purification de la papaïne, à partir des écorces séchées de la papaye, avec un rendement de 253%, lors du premier cycle de TPP et 89.4% après le deuxième cycle, ce résultat est très proche du nôtre.

A travers ce survol bibliographique, il est facilement remarquable que l'ensemble de ces méthodes utilisées incluent au moins deux étapes et l'une d'entre elles est certainement chromatographique. Par contre, le système de purification en trois phases mis en place dans cette étude, nécessite une seule étape. Donc, à travers ces résultats, nous rejoignons ce qui a



été souvent rapporté dans la littérature qualifiant le système TPP, comme étant une technique rentable et facilement applicable à grande échelle (Dennison & Lovrien 1997; Roy & Gupta 2002; Gagaoua & Hafid 2016).

**Tableau 07:** Comparaison de plusieurs protocoles d'extraction et de purification de la papaïne à partir de diverses parties de la papaye

Source	Partie utilisée	Technique	Rendement (%)	Facteur de purification	Réf
Papaïne commerciale	Papaïne commerciale	Système de répartition en deux phases aqueuse avec affinité aux métaux	90.3	3.6	[1]
	Papaïne cristallisée	Chromatographie d'affinité			[2]
	Latex	Précipitation du complexe insoluble entre l'enzyme et le poly vinylsulfonate.	86	2	[3]
	Latex	Chromatographie échangeuse de cation sur SP-Sepharose haut débit Chromatographie d'interaction Hydrophobique sur Fractogel EMD Propyl 650 (S)			[4]
	Latex	Système de répartition en deux phases aqueuse	88		[5]
		Deux étapes de précipitation de sel.	49		
	Latex	-Isolation et cristallisation - Filtration sur gel de Sephadex G-75 -Chromatographie			[6]
<i>Carica papaya</i>	Latex	Chromatographie sur column, Chromatographie échangeuse de cation			[7]
		Chromatographie échangeuse d'ions (IEC)	10.7		
	Latex	Fractionnement par le sulfate d'ammonium Chromatographie échangeuse d'ions (IEC),	6.3		[8]
	latex	Système de répartition en deux phases aqueuse en utilisant un polymère naturel biodégradable d'alginate comme macro-ligand affinité	72	2.41	[9]
	Fruits verts non mûrs	Chromatographie d'adsorption (RP-EBAC) en utilisant une column de Fastline™ 10 EBAC bourré d'Amberlite™ XAD7HP	74.98	7.04	[10]
	Écorce séchée	Deux cycles de système de répartition en trois phases	253.5 89.4	15.8 10.1	[11]
	Latex	Système de répartition en trois phases (TPP)	<b>134</b>	<b>11.45</b>	[12]

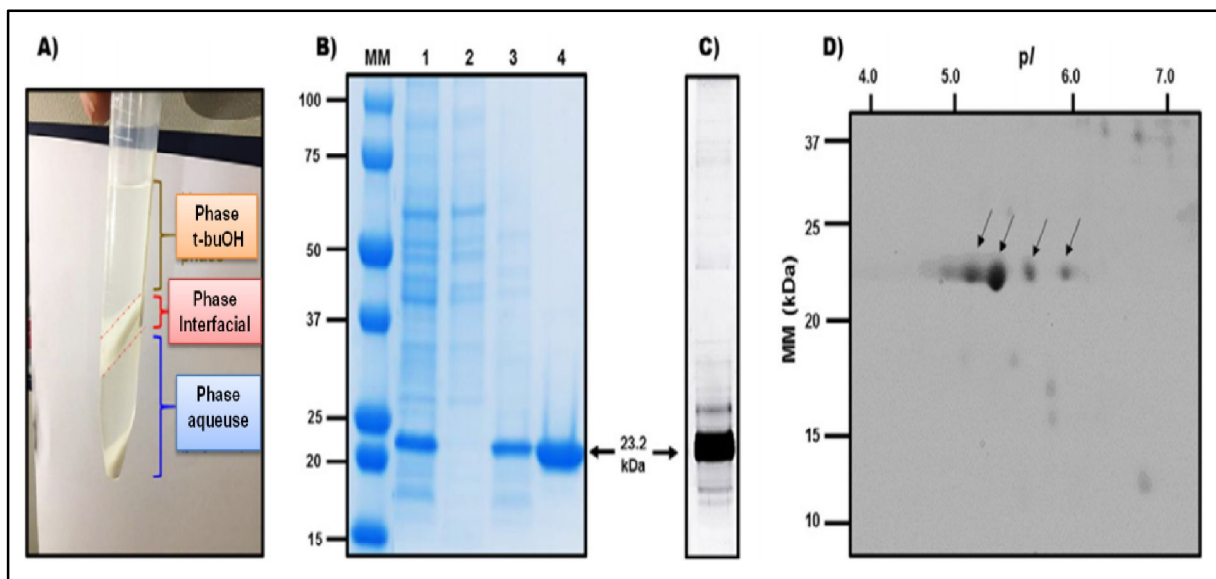
Réf : Référence.[1] Jiang et al., 2015 [2]Blumberg et al., 1970 [3]Braia et al., 2013 [4]Azarkan et al., 2006 [5]Nitsawang et al., 2006 [6]Monti et al., 2000 [7]Pendzhiev, 2002 [8]Purwanto 2016 [9]Rocha et al., 2016 [10]He et al., 2014 [11]Chaiwut et al., 2010 [12]Notre étude

Nous pouvons conclure encore une fois que le système TPP, connu comme une technique de concentration et de déshydratation, améliore d'une manière considérable l'activité catalytique de la papaïne tout en augmentant son efficacité protéolytique. Ce système de traitement qui a été largement discuté, conduit à l'activation simultanée de l'enzyme et une plus grande souplesse dans la structure moléculaire de l'enzyme comme suggéré dans de nombreuses études (Sharma & Gupta 2001; Roy *et al.* 2004; Narayan *et al.* 2008; Wati *et al.* 2009; Singh *et al.* 2010; Gagaoua *et al.* 2016).

## 2. Caractérisation de la papaïne purifiée

### 2.1. Vérification de la pureté des étapes de la purification par SDS-PAGE

L'analyse des différentes fractions du système TPP par l'électrophorèse, en conditions dénaturantes Tricine SDS-PAGE a confirmé que le système TPP permet, en une seule étape, de se débarrasser des protéines contaminantes ou d'autres molécules dans la phase intermédiaire et les phases supérieures, alors que la papaïne a été séparée dans la phase aqueuse (figure 33B).



(A) Résultat du système TPP représenté par une image du tube à essai en verre mettant en évidence l'aspect final de l'extrait de latex brut se divisant en trois phases distinctes séparées, montrant la papaïne récupérée dans la phase aqueuse. (B) Tricine SDS-PAGE (Gel de polyacrylamide à 10% de séparation): ligne MM, étalons de masse moléculaire; ligne 1, extrait brut dialysé; ligne 2, phase interfaciale de TPP; ligne 3, papaïne récupérée (phase aqueuse de TPP) avec une masse moléculaire apparente de 23,2 kDa et ligne 4, papaïne concentrée à l'aide du dispositif Amicon Ultra (10 kDa MWCO) après dialyse contre 30 mM, tampon phosphate pH 6,5 contenant 2 mM de L-cystéine à 4°C. (C) Western-Blot, en utilisant un anticorps anti-papaïne dirigé contre la fraction de la ligne 4. (D) Analyse d'électrophorèse bidimensionnelle révélée par Western blot de la fraction concentrée de papaïne (de la ligne 4 de (B)). les flèches dans le gel 2DE désignent les différentes isoformes par pI

**Figure 33.** Fractionnement en trois phases (TPP) et analyse du poids moléculaire et de la pureté de la papaïne récupérée à partir du latex de *Carica papaya*.

La fraction de papaïne était homogène et avait un poids moléculaire de 23,2 kDa. Ceci est en accord avec le poids moléculaire rapporté pour la papaïne dans plusieurs études. En effet, He *et al.* (2014), Braia *et al.* (2013) ainsi que Penddzhiev (2002) ont rapporté un poids moléculaire de 23.4KDa, tandis que Monti *et al.* (2000) ont trouvé un poids moléculaire d'environ 21KDa. Par comparaison avec les protéases à cystéine provenant de latex de plantes, présenté dans le tableau 08 ; il énumère certaines caractéristiques des protéases étudiées, y compris leur poids moléculaire. Nous constatons que le poids moléculaire de la papaïne se situe dans la plage, 19 à 29 kDa,

**Tableau 08:** Caractéristiques de certaines protéases à cystéine extraite de plantes

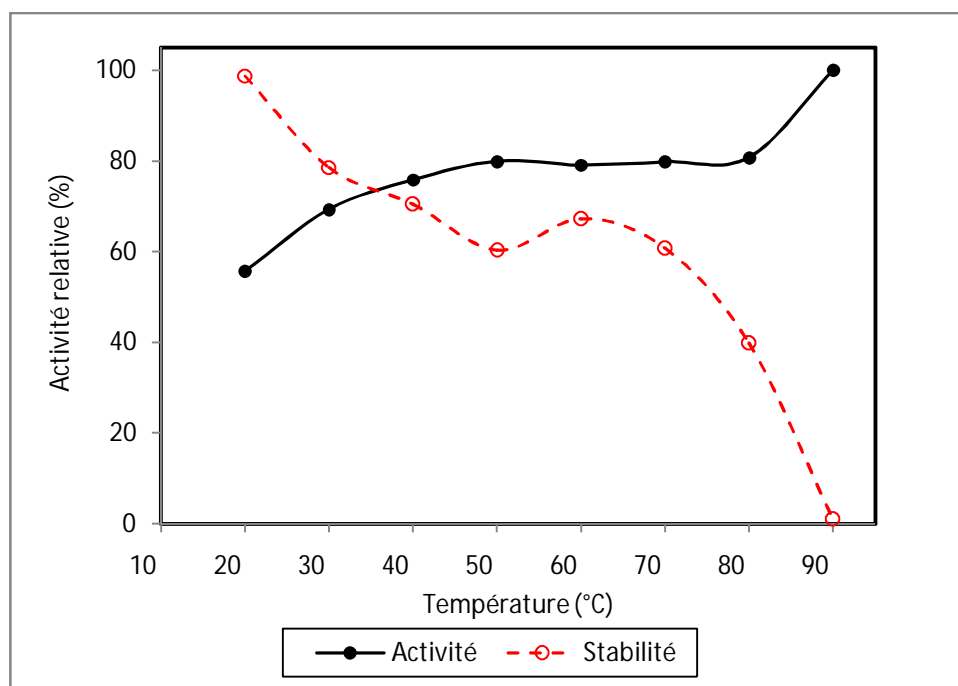
Protéase	Plante source	MM (kDa)	pH optimal	Température optimale(°C)	pH stabilité	Température stabilité(°C)
Ficine <sup>a</sup>	<i>Ficus carica</i>	23.1	7.0	-	6.5-8.5	-
Ficine <sup>b</sup>	<i>Ficus carica</i>	23.4	6.5	60	6.0-7.0	40-70
FicineS <sup>c</sup>	<i>Ficus carica</i> var. <i>Horaiishi</i>	26.0	8.0	60	2.0-8.0	60
Procerain <sup>d</sup>	<i>Calotropis procera</i>	28.8	8.0	55	7.0-9.0	55-60
Procerain B <sup>e</sup>	<i>Calotropis procera</i>	25.7	8.0	40	6.5-8.5	40-60
Araujain h I <sup>f</sup>	<i>Araujia hortorum</i>	24.03	8.5	60	8.0-9.5	-
Araujain h II <sup>g</sup>	<i>Araujia hortorum</i>	23.7	8.0	-	8.0-9.0	-
Araujain h III <sup>g</sup>	<i>Araujia hortorum</i>	23.5	8.5	-	8.0-9.0	-
ErvataminB <sup>h</sup>	<i>Ervatamia coronaria</i>	26.0	6.0	55	6.0-5.0	50-55
Ervatamin A <sup>i</sup>	<i>Ervatamia coronaria</i>	27.6	8.5	50	8.0-8.5	50-55
Funastrain c II <sup>j</sup>	<i>Funastrum clausum</i>	23.636	9.5	-	9.0-10.0	-
Papain <sup>k</sup>	<i>Carica papaya</i>	23.4	8.75	-	5.0-8.0	-
Papain <sup>l</sup>	<i>Carica papaya</i>	23.2	6.0	50	6.0-7.5	40-80
Heynein <sup>m</sup>	<i>Ervatamia heyneana</i>	23	8.0-8.5	52	2.5-11.5	10-60
Philibertain g I <sup>n</sup>	<i>Philibertiagilliesii</i> Ho ok. et Arn	23.53	7.0-8.0	-	-	-
Philibertain g II <sup>o</sup>	<i>Philibertiagilliesii</i> Ho ok. et Arn	23.977	9.0	-	7.0-10.0	25-45
Plumerin-R <sup>p</sup>	<i>Plumeria rubra</i> Linn	81.85	7.0	55	-	40-65
Caricain <sup>q</sup>	<i>Carica papaya</i>	23.2	7.0	50	5.5-9.5	40-55
CaricainII <sup>q</sup>	<i>Carica papaya</i>	18.8	6.5	45	5.5-9.5	40-45

<sup>a</sup>(Devaraj *et al.* 2008); <sup>b</sup>(Gagaoua *et al.* 2014); <sup>c</sup>(Sugiura & Sasaki 1974) ; <sup>d</sup>(Dubey & Jagannadham 2003) ; <sup>e</sup>(Singh *et al.* 2010) ; <sup>f</sup>(Priolo *et al.* 2000) ; <sup>g</sup>(Obregon *et al.* 2001) ; <sup>h</sup>(Kundu *et al.* 2000) ; <sup>i</sup>(Nallamsetty *et al.* 2003) ; <sup>j</sup>(Morcelle *et al.* 2004) ; <sup>k</sup>(Pendzhiev 2002) ; <sup>l</sup> notre étude; <sup>m</sup>(Patel & Jagannadham 2003); <sup>n</sup>(Sequeiros *et al.* 2005); <sup>o</sup>(Sequeiros *et al.* 2016); <sup>p</sup>(Chanda *et al.* 2011); <sup>q</sup>(Liu *et al.* 2005)

D'un autre côté, l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle de la fraction concentrée de papaïne (de la ligne 4 de B), révélée par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre la papaïne (Figure 33C) confirmant ainsi son identité. Elle a révélé quatre isoformes principales différentes (Figure 33D) qui avait un pI allant de 5,0 à 6,0, avec une abondance élevée d'un point proche de pH 5,0 que de 6,0. Notre étude est la première à mettre en évidence, ce polymorphisme, et d'autres études méritent d'être menées pour mieux caractériser chaque spote d'isoforme de protéine.

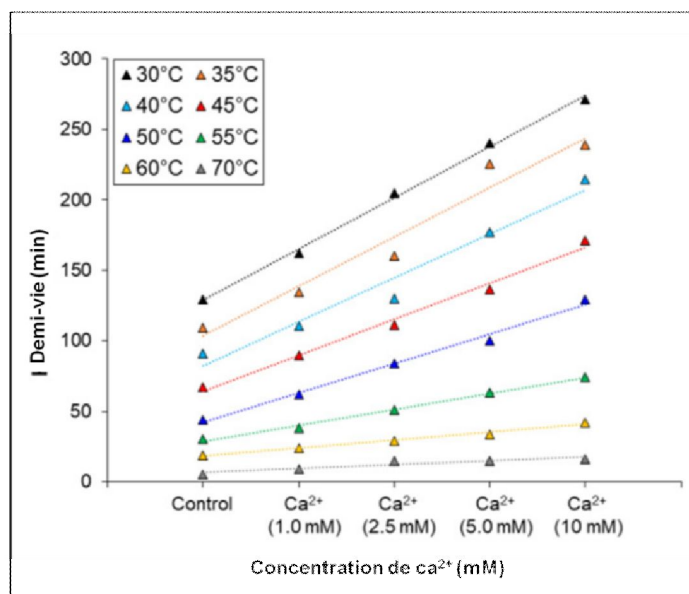
## 2.2. Résultats de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la papaïne

L'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la papaïne a été étudié dans la plage de températures de 20 à 90°C (Figure 34). La papaïne purifiée était très active sur une large gamme de températures, avec une température optimale de 40 à 80°C et une activité maximale à 50°C. L'enzyme était active à 80°C. La papaïne purifiée était également stable, sous une large gamme de température. Elle a conservé plus de 60% de son activité dans la plage de température de 30 à 70 °C, lorsqu'il a été incubé pendant 1 h et elle conserve 70% de son activité initiale à 40°C. Cependant, elle perd son activité lorsqu'elle est incubée pendant 1 h à une température supérieure à 70°C. Les résultats obtenus ont montré que notre protéase est plus stable aux températures industrielles habituelles.

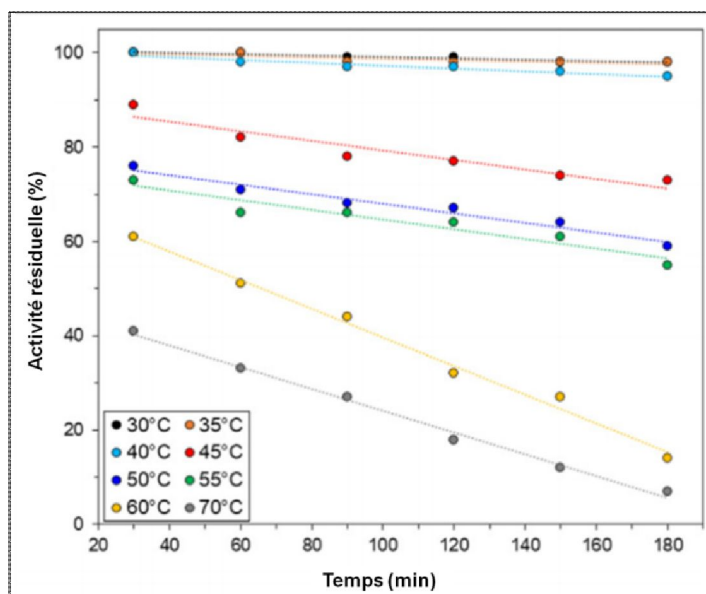


**Figure 34 :** Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la papaïne purifiée par le système TPP

De plus, le calcium à différentes concentrations(1 mM, 2,5 mM, 5 mM et 10 mM de  $Ca^{2+}$ ) a amélioré l'activité et la demi-vie de notre protéase aux températures entre 30 et 55°C mais pas au-dessus de 55°C (Figure 35). De même, l'analyse de l'effet de la température en prélevant des échantillons toutes les 30 min jusqu'à 3 h et à, des températures allant de 30 à 70°C, avec une élévation de température de l'ordre de 5°C (Figure 36), confirme la stabilité de la papaïne de latex récupérée à une large gamme de température. En accord avec nos résultats, des études sur la dénaturation thermique de la papaïne par balayage calorimétrie différentielle et par des méthodes spectrophotométriques ont indiqué que la papaïne commence à perdre son activité à partir de 55°C(Sumner *et al.* 1993).



**Figure 35:** Demi-vie de la papaïne du latex de *carica papaya* purifié par le système TPP, en présence de calcium ( $Ca^{2+}$ ) à différentes concentrations dans une gamme de températures de 30 à 70°C. Les valeurs sont des moyennes de trois expériences indépendantes déterminées après 3 h d'incubation.

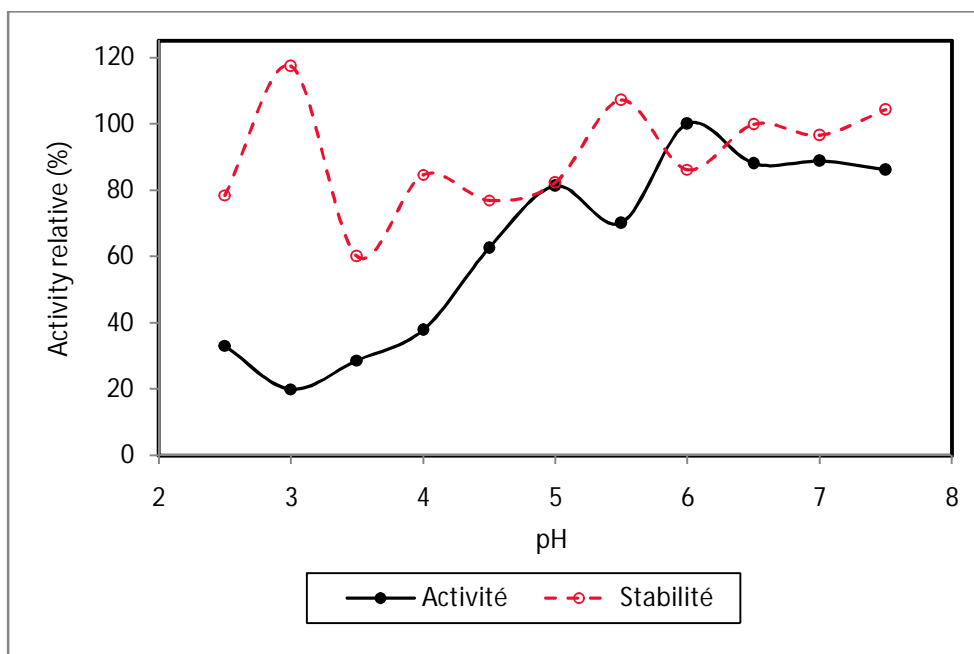


**Figure 36:** Effet de la température sur la stabilité de la papaïne purifiée récupérée à différents temps

D'autre part, la plupart des cystéines protéases répertoriées dans le tableau 8 avait des températures optimales, allant de 40 à 60°C et un plateau de stabilité de 40 à 70°C. Par exemple, Liu *et al.* (2005) ont trouvé que la caricaine extraite du latex de *Carica papaya* était stable à une température entre 40 et 55°C et avait une température optimale de 50°C. De même pour Nallamsetty *et al.* (2003) et Kundu *et al.* (2000), qui ont rapporté que l'ervatamine isolé de l'*Ervatamiacoronaria* (Fleur de moulin à vent) était stable entre 50 et 55°C. Gagaoua *et al.* (2014) ont également trouvé que la ficine du latex de *Ficus carica* était stable à une gamme de température entre 40 et 70°C. En effet, plusieurs auteurs (Roseiro *et al.* 2003; Sidrach *et al.* 2005; Chazarra *et al.* 2007; Claverie-Martin & Vega-Hernández 2007) précisent que les protéases d'origine végétales sont très thermostables, et elles ont généralement une température optimum d'activité beaucoup plus élevée que celle des protéases d'origine animale.

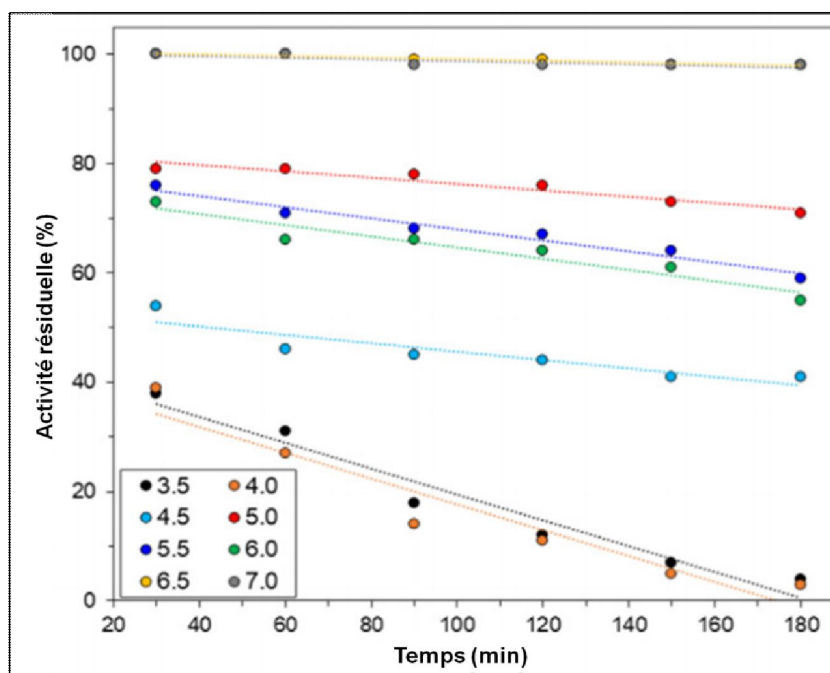
### 2.3. Résultats de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité de la papaïne purifiée

L'effet du pH est présenté dans la figure 37. Une augmentation de l'activité de la papaïne a été observée en augmentant le pH de 3,0 à 6,0. La protéase avait un pH optimal neutre ; et semble qu'il est plus stable à pH 6,5 à 7,5. Nous avons noté qu'il y avait une rétention d'activité, après 1 h d'incubation à cette gamme de pH.



**Figure 37 :** Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la papaïne purifiée par le système TPP

Le profil de pH obtenu dans notre étude est en accord avec des études antérieures (Purwanto 2016) qui décrivaient principalement un pH optimal de 6,0 lorsque la papaïne a été purifiée par chromatographie d'échange d'ions. Un pH optimal compris entre 5 et 8 a également été rapporté par Blumberg *et al.* (1970) et Pendzhiev (2002). La plupart des protéases à cystéine, y compris la papaïne, présentées dans le tableau 08, se sont avérées stable au pH neutre et basique qu'à pH acide. La grande stabilité du pH trouvé pour la papaïne est un facteur important pour l'application industrielle des enzymes. Citons pour exemple, il peut être facilement appliqué pour attendrir la viande ou coaguler le lait.

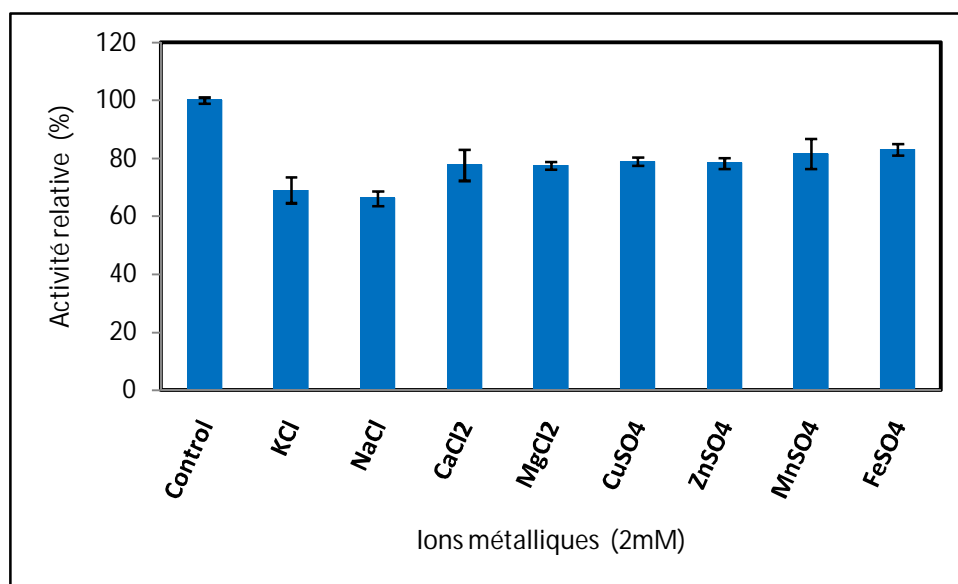


**Figure 38:** Effet pH sur la stabilité de la papaïne purifiée récupérée à différents temps

Quant à la température, la papaïne purifiée par le système TPP est très stable lorsqu'elle est incubée pendant 3 h à  $\text{pH} \geq 4,5$  (Figure 38). La grande stabilité de la papaïne contre le pH et la température réunis rendent cette protéase potentiellement bénéfique dans les applications industrielles.

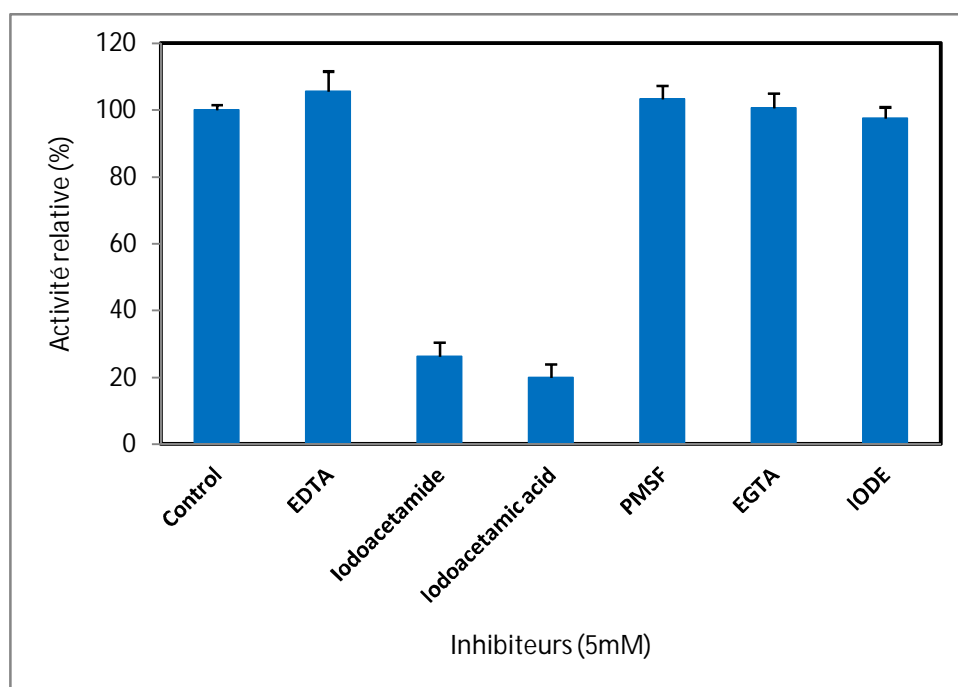
#### 2.4. Résultats de l'effet de divers effecteurs sur l'activité de la papaïne purifiée

Divers ions métalliques ( $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  et  $\text{Fe SO}_4$ ) à une concentration de 2 mM ont inhibé l'activité enzymatique pour plus de 20% (Figure 39), ce qui indique qu'il faut utiliser des chélateurs ioniques comme l'EDTA, pour maintenir ou améliorer l'activité protéolytique de la papaïne.



**Figure 39 :** Effet des ions métalliques sur l'activité et la stabilité de la papaïne purifiée par le système TPP.

Parmi les inhibiteurs que nous avons étudiés, l'iodoacétamide et l'iodoacétamique acide sont des inhibiteurs de la cystéine protéase. Elles ont inhibé plus de 75% de l'activité protéolytique de la papaïne récupérée, tandis que PMSF, EGTA et l'iode n'avait aucun effet sur la protéase (Figure 40). L'EDTA, un inhibiteur de métalloprotéase, a amélioré comme prévu, l'activité protéolytique de la papaïne.



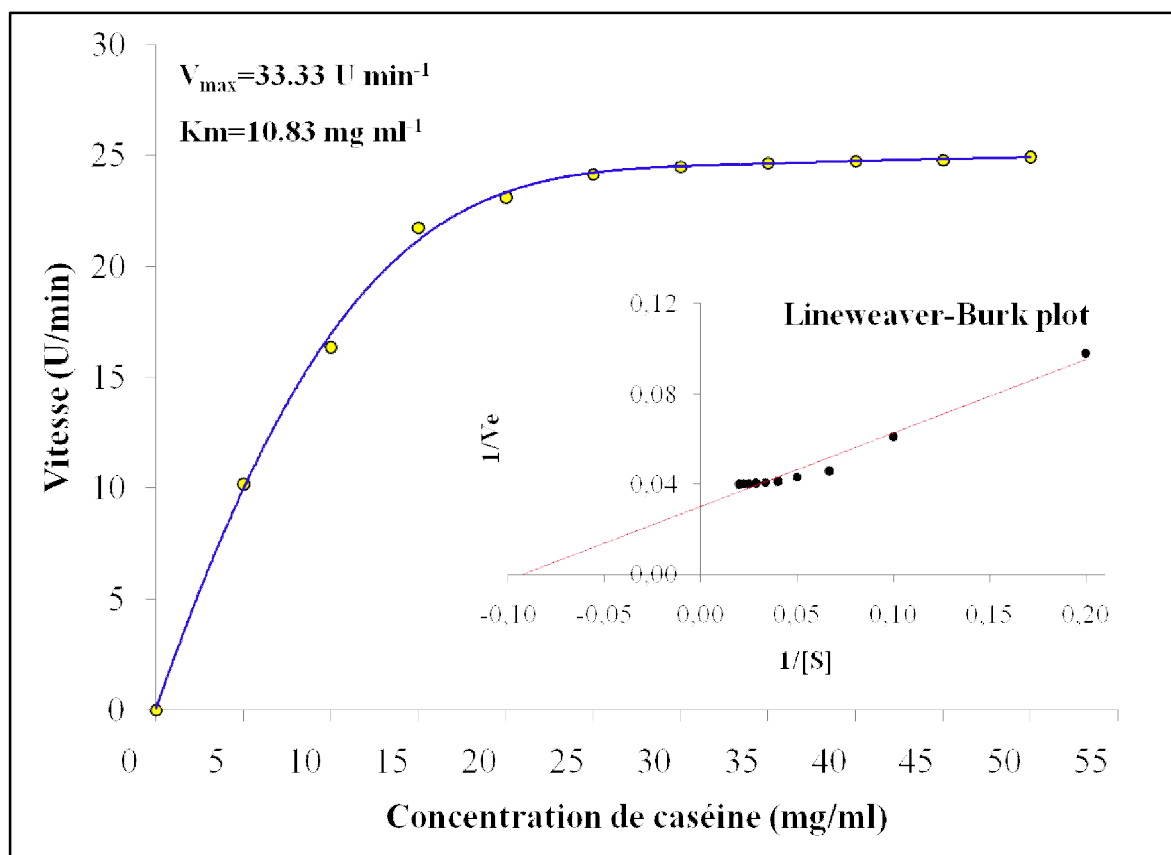
**Figure 40 :** Effet des inhibiteurs sur l'activité et la stabilité de la papaïne purifiée par le système TPP



Ces résultats pour les effecteurs étudiés, dans cette étude sont principalement en accord avec les données décrites dans la littérature, pour la purification de la papaïne (Monti *et al.* 2000 ; Pendzhiev 2002 ; Chaiwut *et al.* 2010 ; Braia *et al.* 2013 ; He *et al.* 2014 ; Rocha *et al.* 2016) qui sont résumés dans le tableau 8.

## 2.5. Résultats des paramètres cinétiques de la papaïne purifiée

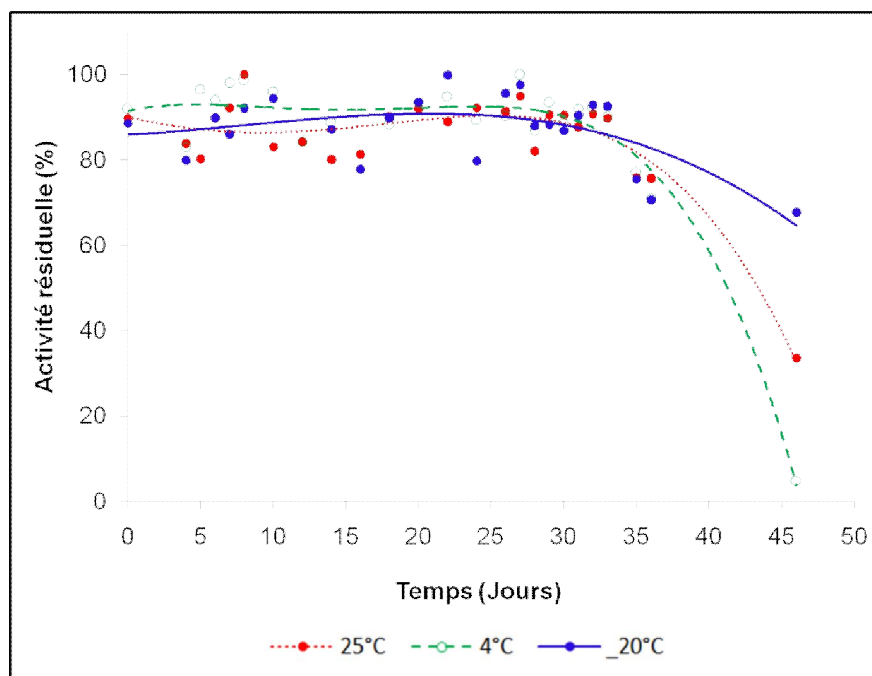
Afin de déterminer les constantes cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_m$ ) de la papaïne partitionnée, la variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration initiale de la caséine a été étudiée (Figure 41). La concentration initiale de la caséine a été modifiée entre 0 et 50 mg/ml. Les valeurs de  $V_{max}$  et  $K_m$  ont été calculées à partir de la courbe de Lineweaver-Burk ainsi, elles sont de l'ordre de  $33,33 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  et  $10,83 \text{ mg ml}^{-1}$ , respectivement. Les valeurs sont similaires à ceux de la cystéine ou des sérines protéases récupérées par le système TPP en une seule étape comme la ficine (Gagaoua *et al.* 2014), zingibaïne (Gagaoua *et al.* 2015) et cucumisine (Gagaoua *et al.* 2017). De plus, la courbe de Lineweaver-Burk indique que l'enzyme suit une cinétique simple de Michaelis-Menten.



**Figure 41:** Cinétique (Courbes de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk) de la papaïne purifiée à partir de latex de *Carica papaya* en utilisant le système TPP. Les données sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

## 2.6. Résultats de la stabilité au stockage à différentes températures

La papaïne récupérée a été fractionnée en différentes aliquotes en Tubes Eppendorf et stockées à trois températures ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  et  $25^{\circ}\text{C}$ ), jusqu'à 46 jours pour évaluer l'activité résiduelle basée sur l'activité protéolytique durant cette période (Figure 42). Une activité protéolytique élevée a été observée, quelle que soit la température de stockage, pendant les 33 premiers jours. Elle est au tour de 130 à 150U/ml. Au-delà, l'enzyme est devenu instable et perd progressivement de son activité jusqu'à atteindre 8U/ml à  $4^{\circ}\text{C}$ , après 46<sup>e</sup> jour de stockage, de ce fait, notre protéase perd jusqu'à 90% de son activité à  $4^{\circ}\text{C}$ . Nous constatons également, qu'à partir de 33<sup>e</sup> jour de stockage, la papaïne stockée à  $25^{\circ}\text{C}$ , perdait peu à peu son activité jusqu'au 46<sup>e</sup> jour, perdant environ 60% de son activité protéolytique initiale. Tandis qu'elle préserve 80% de son activité après 46 jours de conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 42:** Effet de la température de stockage sur l'activité protéolytique de la papaïne du latex de *Carica papaya* de purifiée par le système TPP. Les aliquotes de la protéase, conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  (ligne bleue),  $4^{\circ}\text{C}$  (ligne verte) et  $25^{\circ}\text{C}$  (ligne rouge) ont été prélevées à différentes périodes et les activités protéolytiques avec caséine comme substrat, ont été déterminées. Les données représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard de trois expériences indépendantes.

La meilleure condition de stockage de la papaïne de latex est  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ce profil d'activité protéolytique sur plusieurs jours, est similaire à celui que nous avons récemment rapporté pour la cucumisine (Gagaoua *et al.* 2017). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la papaïne partitionnée peut être conservée à  $25^{\circ}\text{C}$  et  $4^{\circ}\text{C}$  pendant une période de 35 jours, alors qu'une durée de vie plus longue peut être obtenue par stockage au congélateur, à -

20°C. Des études antérieures ont rapporté l'utilisation potentielle des additifs stabilisants tels que la cystéine, acide ascorbique, ascorbate de sodium, acide érythorbique, érythorbate de sodium et bien d'autres pour préserver l'activité protéolytique des enzymes industrielles, notamment la papaïne (Espin & Islam 1998; Nafi *et al.* 2014; Gagaoua *et al.* 2015).

### 3. Application de la papaïne sur la viande de dromadaire

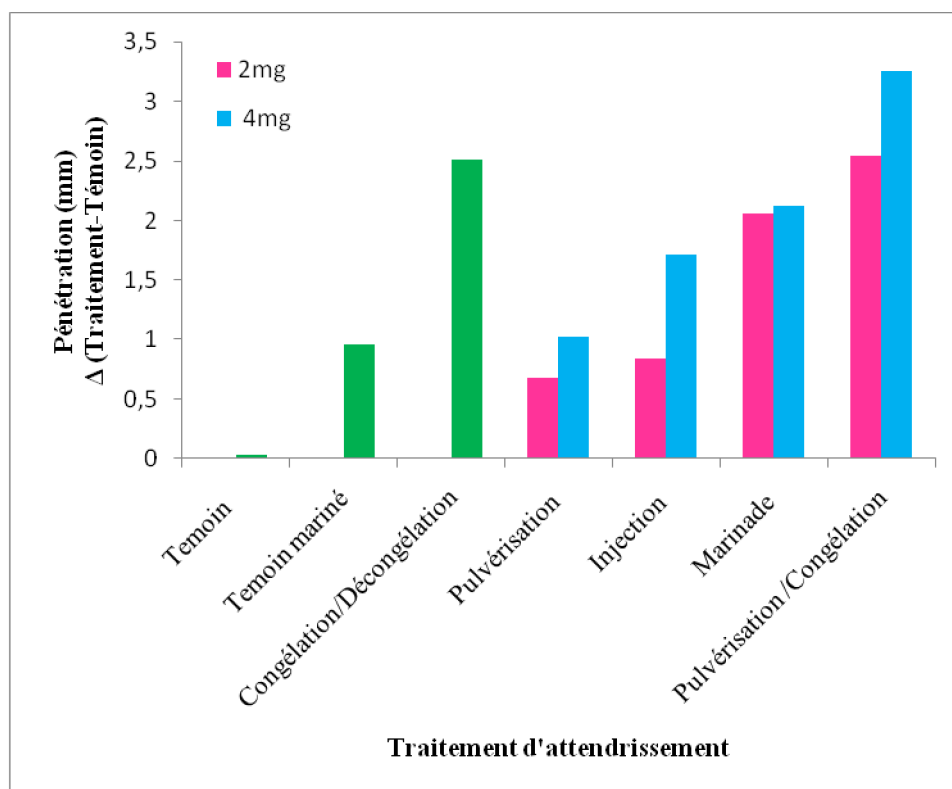
Cette étude avait pour objectif l'étude de l'effet attendrisseur, sur la viande de dromadaire par une protéase d'origine végétale, la papaïne, extraite par le système de répartition en trois phases. Elle vise aussi à comparer les effets de différents traitements en présence de la papaïne à savoir la marinade, l'injection et la pulvérisation et/ou physiques (cycle de congélation/décongélation). Pour caractériser les effets sur la texture de la viande, une série d'analyses physico-chimiques a été effectuée à savoir le pH, la profondeur de pénétration par pénétromètre, la capacité de rétention d'eau et le pourcentage d'eau relégué. Les traitements statistiques par l'analyse de variance à un ou deux facteurs, pour l'effet muscle et l'effet traitement ainsi que leur interaction ont montré qu'aucune différence n'a été trouvée pour le pH ( $P < 0.05$ ), raison pour laquelle, ces résultats n'ont pas été présentés.

#### 3.1. Effets du traitement d'attendrissement sur la profondeur de pénétration

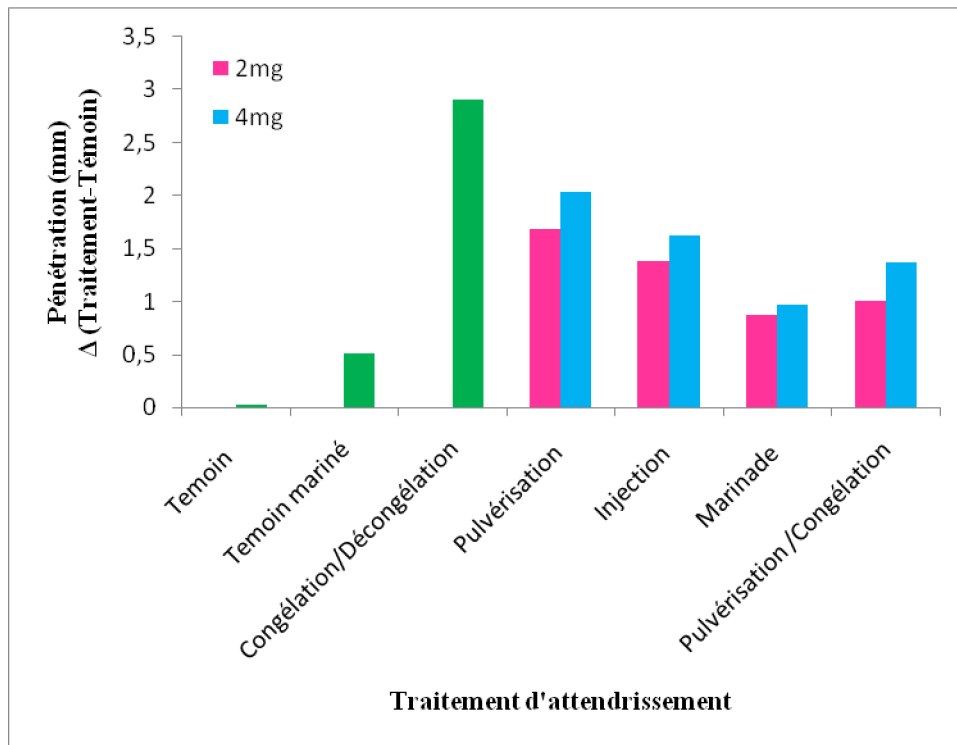
Sur les figures 43 et 44 représentant l'effet des différents traitements d'attendrissement artificiel sur la profondeur de pénétration des deux muscles traités, avec deux concentrations de papaïne (*Longissimus thoracis* et *Semi tendinosus*, respectivement), nous remarquons que les traitements avec la papaïne améliorent de 1 à 2 mm de profondeur la pénétration, et par conséquent la tendreté. La diminution marquée de la dureté de la viande peut être expliquée par la haute activité de la papaïne. Conformément à ces résultats, une étude a rapporté que la papaïne est une protéase puissante, qui catalyse efficacement la rupture des liaisons peptidiques dans les molécules protéiques, en tant que substrats et leurs produits de dégradation en acides aminés (Istrati 2008). Selon Ashie *et al.* (2002), l'hydrolyse enzymatique de protéines de la viande est connue généralement pour augmenter la solubilisation de groupes aminés libres et d'hydroxyproline qui peut résulter en une perte de l'intégrité du muscle et l'augmentation de la tendreté. Depuis les années 80, les cystéines protéases de plantes ont été proposées, pour permettre la dégradation des protéines myofibrillaires et la perturbation de la structure des fibrilles musculaires (Jorgova *et al.* 1989).

Il est évident que 4mg de papaine ont plus d'effet que 2mg ; vue une concentration plus élevée. Cependant, nous remarquons qu'au traitement d'attendrissement par marinade, nous avons obtenu, un résultat similaire, cela est dû, probablement, à la plus grande surface de contact, ainsi du fait que la solution facilite la pénétration de l'enzyme et lui-même a un effet fragilisant sur la structure du muscle, et le témoin mariné confirme cette hypothèse.

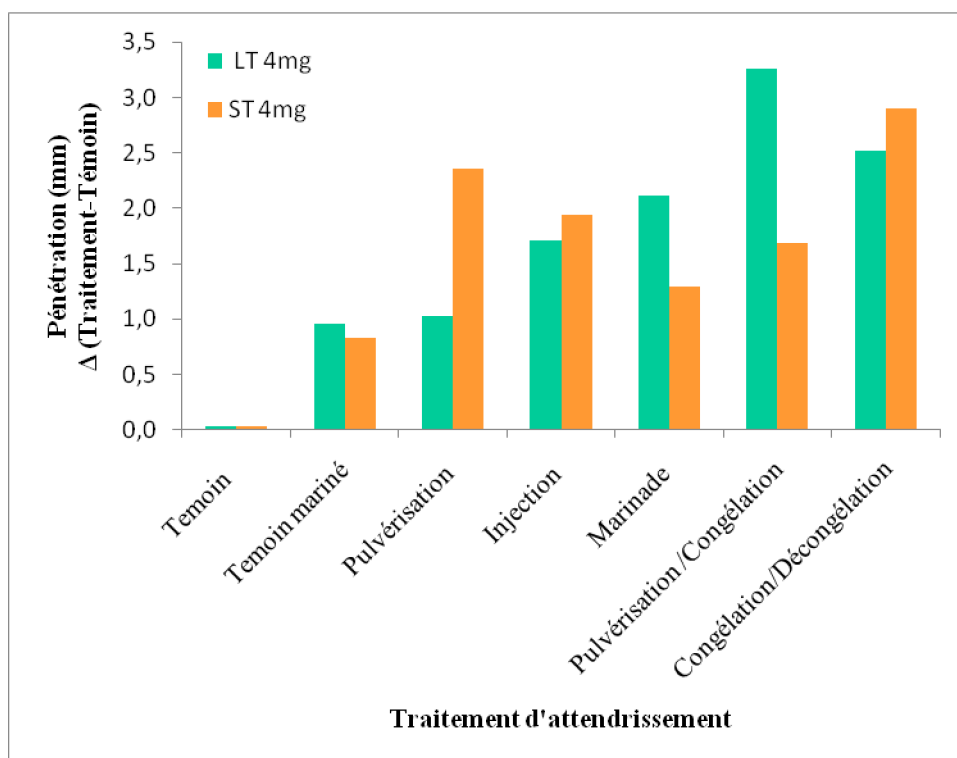
Ashie *et al.* (2002), en évaluant l'effet de la papaine injectée, sur la tendreté de la viande de bœuf, ont montré que la force de cisaillement a été réduite par cette enzyme. Des effets semblables ont été observés, avec de la viande de bœuf marinée, mais des doses plus grandes ont été exigées dans ce cas, probablement due à la surface de contact enzyme-substrat restreinte comparée à la viande injectée. Leurs résultats sont très comparables à ce que nous avons obtenu sur le muscle *Semi tendinosus* (Figure 44) où le traitement par injection a eu plus d'effet sur la profondeur de pénétration que le traitement par marinade.



**Figure 43:** Impact des traitements d'attendrissement enzymatique (papaine à 2 et 4 mg) et/ou physique sur la profondeur de pénétration mesurée par pénétromètre sur le muscle *Longissimus*. La différence ( $\Delta$ ) par rapport au témoin sans papaine et ni traitement physique a été calculée.



**Figure 44:** Impact des traitements d'attendrissement enzymatique (papaine à 2 et 4 mg) et/ou physique, sur la profondeur de pénétration mesurée par pénétromètre sur le muscle *Semi tendinosus*. La différence ( $\Delta$ ) par rapport au témoin sans papaine et ni traitement physique a été calculée.



**Figure 45:** Impact des traitements d'attendrissement enzymatique (papaine à 4 mg) et/ou physique sur la profondeur de pénétration, mesurée par pénétromètre, des deux muscles *Longissimus thoracis* (LT) et *Semi tendinosus* (ST). La différence ( $\Delta$ ) par rapport au témoin sans papaine et ni traitement physique a été calculée.

Nous constatons que pour le muscle *Longissimus thoracis*, le traitement par pulvérisation/congélation se caractérise par la plus profonde pénétration, suivi par le cycle congélation/décongélation, le traitement de marinade, par l'injection et enfin suivi par la pulvérisation (Figure 43). Cependant, pour le muscle *Semi tendinosus*, le traitement de congélation/décongélation présente le plus grand effet sur la tendreté, suivi par la pulvérisation puis l'injection ensuite la pulvérisation couplée à la congélation et enfin la marinade (Figure 44). Donc, le traitement de pulvérisation couplé au cycle de congélation a donné le meilleur résultat pour le muscle *Longissimus thoracis* du dromadaire. Néanmoins, pour le muscle *Semi tendinosus* c'est le traitement avec cycle de congélation/décongélation qui a donné le meilleur résultat (Figure 45). En effet, en terme de tendreté de la viande, il est le type de muscle trois fois plus important que l'espèce, en ce qui concerne la vitesse et l'intensité de l'attendrissement (Dransfield *et al.* 1981). Selon Ouali (1990), la vitesse de maturation est corrélée positivement à leur métabolisme glycolytique et à leur vitesse de contraction.

**Tableau 09:** Propriétés des enzymes (protéase à cystéine) d'attendrissement d'origine végétales (Payne 2009).

Enzyme	Numéro EC	Source	Masse molaire (kda)	Température (°C)		pH	Effet
				Optimum	Dénaturation		
Papaïne	3.4.22.2	Papaye	23.4	65	80-90	5-7	Plus active sur protéines myofibrillaire
Bromelaine (tige)	3.4.22.32	Ananas (tige)	20–33.2	50	70-75	5-9	Plus actives sur les protéines de collagène
Bromelaine (fruit)	3.4.22.33	Ananas (fruit)	20–33.2	50	70-75	5-9	Plus actives sur les protéines de collagène
Ficin	3.4.22.3	Ficus latex	25–26	65	70	5-7	La réaction est plus douce et plus facile à contrôler
Actinidin	3.4.22.14	Kiwi fruit	23–26	58–62	60	5-7	Active sur le collagène

Cette variation peut être expliquée par le fait que le muscle *semi tendinosus* est plus riche en collagène que le muscle *Longissimus*. Ce qui rend la pénétration et la diffusion de

l'enzyme dans le muscle plus difficile. Il faut savoir que la tendreté de la viande est déterminée par deux composants structurels. Le premier composant est le tissu conjonctif de la viande, contribuant à ce que l'on appelle communément, dureté de base. Le tissu conjonctif est essentiellement composé de protéines structurelles qui fournissent un soutien aux muscles à différentes hiérarchies (Bekhit *et al.* 2014). La contribution du tissu conjonctif à la tendreté de la viande dépend de la structure et/ou de la quantité de différents collagènes et élastine dans la viande (Lepetit 2008). Il faut noter que, selon Payne (2009), la papaïne est plus active sur les protéines myofibrillaires, contrairement aux autres protéases d'origine végétale, notamment la bromélaïne, ficine et actinidine, qui ont un effet sur le collagène (Tableau 09)

Liu *et al.* (2011) ont rapporté l'effet considérable des cycles de congélation/décongélation sur la tendreté du muscle *Longissimus* du porc. Et cet effet est plus important lorsque ce traitement est précédé par l'injection du jus de kiwi (Actinidine). Le résultat est semblable à celui rapporté par Xia *et al.* (2009) qui ont effectué de multiples cycles de congélation/décongélation de la viande de porc, ainsi que les résultats de Srinivasan *et al.* (1997), sur des cycles de congélation/décongélation de la crevette. L'interruption des fibres majeures et la formation de fissures dans les tissus des muscles congelés peuvent expliquer l'amélioration de la tendreté de la viande.

En outre, Christensen *et al.* (2009) ont rapporté l'amélioration de la tendreté de viande cuite du porc, après injection par l'actinidine dans le muscle *Biceps femoris* du porc. La dégradation des protéines, en particulier la fragmentation de la myosine, est le facteur principal pour l'amélioration de la tendreté ou la réduction de dureté induite par le traitement congélation/décongélation.

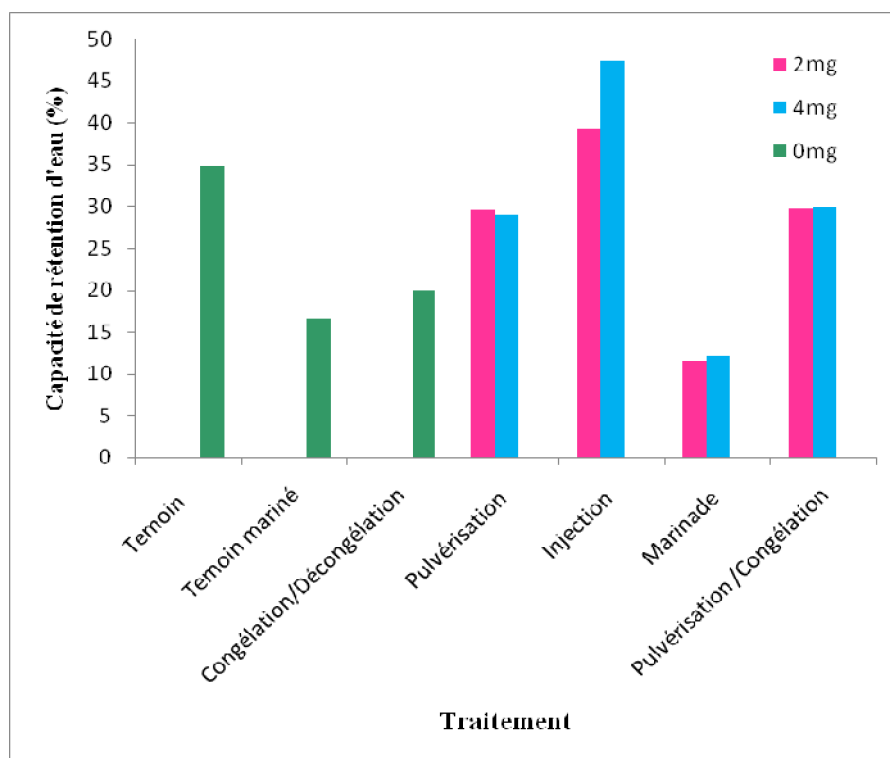
Des investigations complémentaires utilisant des méthodologies telles que la microscopie électronique, à transmission sont en cours d'élaboration pour mieux caractériser l'effet d'une concentration fixe de la papaïne de latex récupérée par TPP, sur les changements ultra-structuraux qui se produisent sur le muscle, en utilisant les différents traitements décrits ci-dessus.

### **3.2. Effets du traitement d'attendrissement sur la capacité de rétention d'eau et les pertes en eau**

La capacité de rétention d'eau (CRE) des protéines myofibrillaires est une caractéristique importante pour les consommateurs et les transformateurs; selon le point de

vue des consommateurs, la CRE influence de nombreux traits de qualité telles que valeur nutritionnelle, l'apparence et l'appétence (Kauffman *et al.* 1994). Pour l'industrie de transformation, La CRE a un impact considérable sur la valeur économique de poids, pour les produits à base de viande fraîche et le rendement en produits transformés: plus, il reste d'eau dans la viande, plus le poids de la viande, est conséquent (Cristofanelli *et al.* 2004).

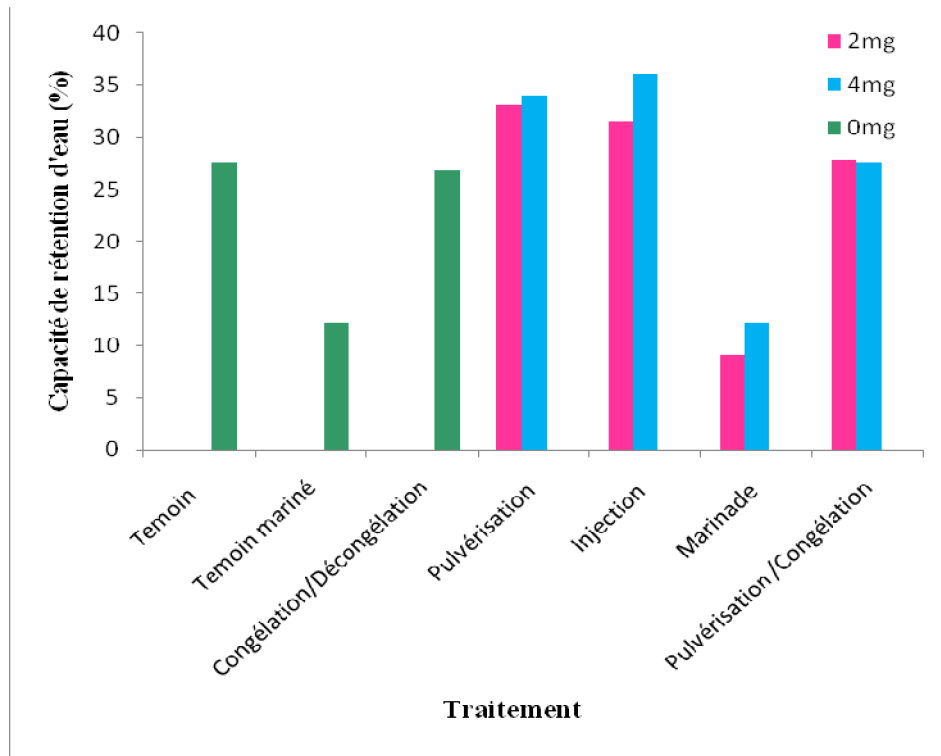
D'après les données des figures 46 et 47, nous remarquons qu'il n'y pas de différence significative entre la capacité de rétention d'eau des échantillons de viande traités par 2 et 4mg de papaïne. Ainsi, l'application de la papaïne a effet considérable sur la capacité de rétention d'eau de la viande. Selon Bond et Warner (2007), la protéolyse (gradation des structures du muscle) provoque également des changements irréversibles, dans l'espace entre les myofibrilles, ce qui facilite l'écoulement de l'eau vers l'extérieur et l'augmentation du jus libéré.



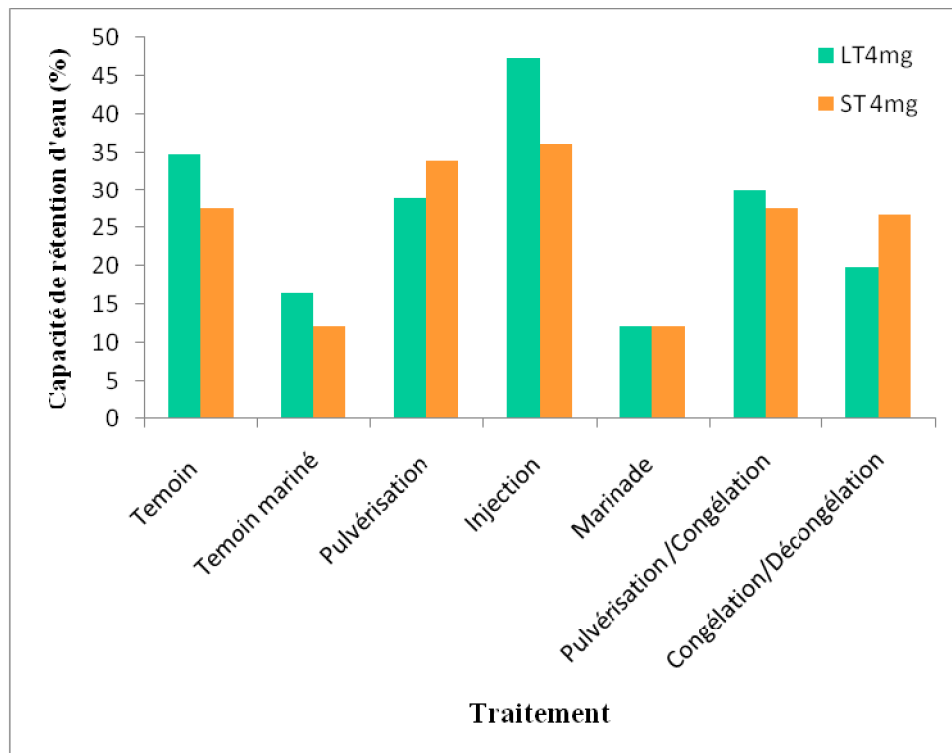
**Figure 46:** Impact des traitements d'attendrissement enzymatique (papaïne à 2 et 4 mg) et/ou physique sur la capacité de rétention d'eau (%) sur le muscle *Longissimus* du dromadaire

En comparant les valeurs de la capacité de rétention d'eau, nous pouvons constater une différence significative entre les différents traitements effectués pour les deux muscles (Figure 48). Le traitement enzymatique par injection présente le pourcentage le plus élevé 47% et 36% pour les deux muscles *Longissimus thoracis* et *Semi tendinosus*, respectivement.





**Figure 47:** Impact des traitements d’attendrissement enzymatique (papaine à 4 mg) et/ou physique sur la capacité de rétention d’eau (%) sur le muscle *Semitendinosus* du dromadaire

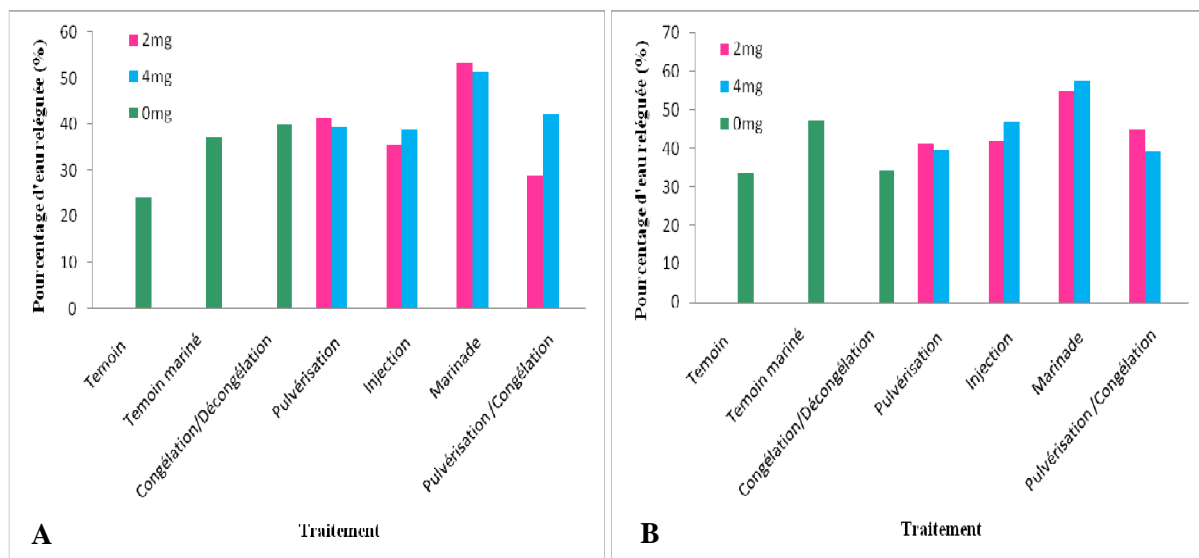


**Figure 48:** Impact des traitements d’attendrissement enzymatique (papaine à 4 mg) et/ou physique sur la capacité de rétention d’eau des deux muscles *Longissimus thoracis* (LT) et *Semi tendinosus* (ST)

Aussi, nous remarquons que le traitement de pulvérisation/congélation présente la même valeur que le témoin. Par contre, il y a une grande différence entre la capacité de rétention d'eau du témoin et le traitement par marinade, qui représente la plus faible valeur obtenue (12% pour les deux muscles). Contrairement aux résultats rapportés par Gao *et al.* (2011) qui ont déduit que la capacité de rétention d'eau ne diffère pas significativement entre le témoin et le traitement de marinade.

En raison de l'hydrolyse enzymatique partielle des protéines de la viande, une plus grande affinité pour les molécules d'eau est établie. L'hydrophilicité augmentée est déterminée par de nombreux groupes hydrophiles (hydroxy-OH, carboxylique-COO-amino-NH<sub>3</sub>, thiolique - SH, amide - CONH<sub>2</sub>), qui sont libérés à la surface de la molécule protéique. Par conséquent, lors de l'injection de la papaine, le taux de rétention d'eau est plus élevé pour les deux muscles. Cela est dû au taux plus élevé de l'hydrolyse des protéines de la viande, respectivement par la gélatinisation des échantillons et la libération de peptides terminaux et d'acides aminés (Doneva *et al.* 2015).

Les résultats du pourcentage d'eau reléguée présentés dans la figure 49, vient appuyer les résultats obtenus pour la capacité de rétention d'eau ; où le traitement par marinade présentent les valeurs les plus élevées, ce résultat est évident, vu du fait que le morceau de viande plongé, dans la solution, fragilise la structure du muscle.

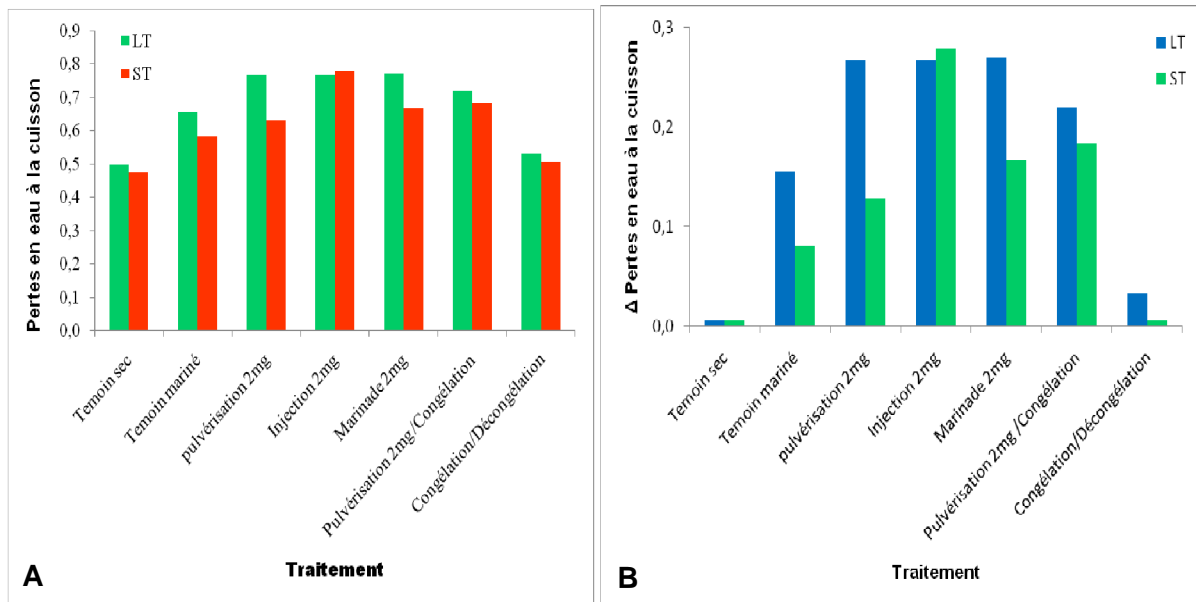


**Figure 49:** Impact des traitements d'attendrissement enzymatique (papaine à 2 et 4 mg) et/ou physique sur le pourcentage d'eau reléguée du muscle *Longissimus thoracis* (A) *Semi tendinosus* (B).

Les teneurs en eau reléguée plus ou moins importantes peuvent être liées à la composition de la viande de dromadaire, en particulier les lipides. Par exemple, Cristofanelli

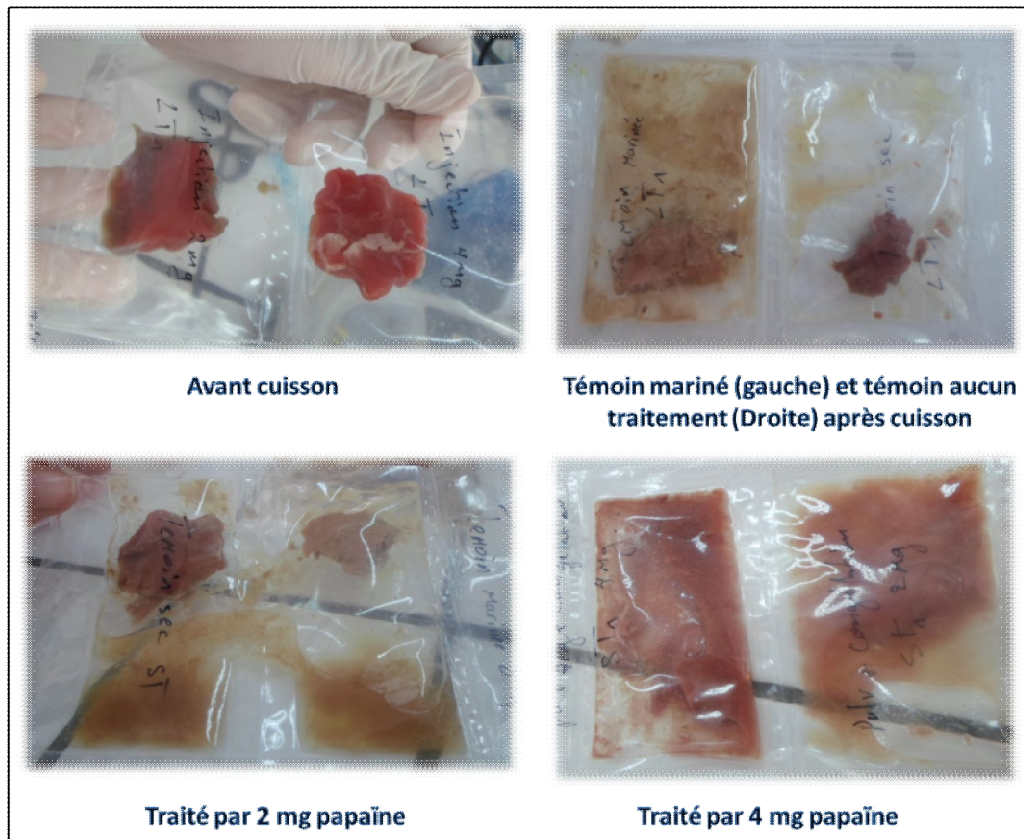
*et al.* (2004), rapportent que la viande de dromadaire contient plus de jus extractible que les autres camélidés, en raison de la contenance en gras plus faible. Ce jus extractible représente un manque d'hydratation des protéines. Ceci peut impliquer une moindre hydratation des substrats et des enzymes les rendant moins efficaces, néanmoins le mécanisme biologique impliqué reste à ce jour méconnu.

En ce qui concerne les pertes en eau après cuisson, des échantillons traités 1h à 80°C, les morceaux traités par 4mg de papaine ont été réduits en purée (Figure 51), due à l'action de la papaine qui a dégradé complètement la structure musculaire. Sachant que notre papaine a une activité maximale, dans la gamme de température comprise entre 30 et 80°C. Les résultats obtenus pour 2mg de papaine sont présentés dans la figure 50.



**Figure 50:** Impact des traitements d'attendrissement enzymatique (papaine à 2 mg) et/ou physique sur A) les pertes en eau à la cuisson du muscle *Longissimus thoracis* (LT) et *Semi tendinosus* (ST). B) Résultats présentés par la différence ( $\Delta$ ) par rapport au témoin sans papaine et ni traitement physique

Nous remarquons que les traitements d'attendrissement artificiel ont un effet considérable sur les pertes en eau à la cuisson, mais le traitement par un cycle de congélation/décongélation n'a presque pas d'effet sur les pertes en eau. Ce résultat prouve que la papaine a un effet considérable sur la structure des fibres musculaires, conduisant aux grandes pertes en eau après cuisson. Barbanti & Pasquini (2005) ont trouvé des corrélations statistiquement significatives entre la force de cisaillement et les valeurs de perte de cuisson, en travaillant sur le muscle pectoral de poulet cru et mariné.

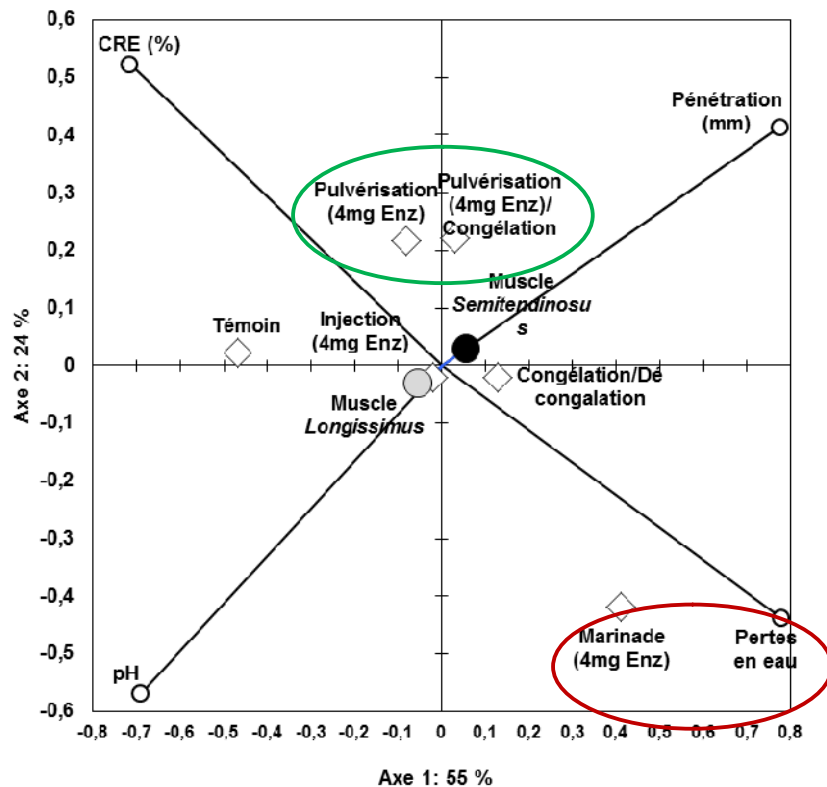


**Figure 51:** Images représentant des morceaux de viande traitée par la papaïne à 2 ou 4 mg avant et après cuisson 1h à 80°C

### 3.3. Relation entre les paramètres par analyse en composantes principales

L'analyse des corrélations entre les différents paramètres étudiés permet d'établir les liaisons entre ces derniers et de déterminer ceux qui sont susceptibles d'expliquer la texture de la viande dromadaire. Les variables étudiées sont: la profondeur de pénétration, le pH, la capacité de rétention d'eau et les pertes en eau.

L'analyse en composantes principales réalisée sur l'ensemble des données a permis de visualiser la distribution des variables étudiées, dans le plan défini par les deux premiers axes factoriels (Figure 52). Ces deux premiers axes expliquent 79 % de la variabilité. La première composante expliquant 55% de variabilité, se caractérise principalement par la perte en eau et la pénétration sur le côté positif et par le pH, sur le côté négatif. La deuxième composante expliquant 24% de la variabilité était principalement caractérisée par la capacité de rétention d'eau sur le côté positif.



**Figure 52 :** Analyse en composantes principales montrant la projection des différents traitements (en losanges) pour les deux muscles (*Longissimus* et *Semi tendinosus* en cercles), en fonction des variables physico-chimiques (cercles) étudiées à savoir la pénétration, la CRE, le pH et les pertes en eau

Comme vous pouvez le remarquer, le traitement par marinade est très lié aux pertes en eau, cela est probablement due au fait que, lors de traitement par marinade, le morceau de viande est plongé directement dans la solution contenant l'enzyme. Cette grande quantité d'eau fait que le muscle s'enrichit en eau et par conséquent sa structure se déstabilise.

Nous constatons également l'étroite relation entre les pertes en eau et la profondeur de pénétration. Barbanti & Pasquini (2005) ont remarqué une augmentation de la force de cisaillement avec l'augmentation de la perte de cuisson. Ils supposent que l'évaporation d'eau et l'échappement des graisses fondues de l'échantillon de viande réduisent la tendreté de la viande, diminuant éventuellement l'acceptabilité des consommateurs.

### 3.4. Appréciation visuelle des échantillons traités

Après récupération des échantillons préalablement traités par les différents traitements d'attendrissage enzymatique et/ou physique, nous avons remarqué quelques changements

dans les qualités organoleptiques visuelles en les comparant avec le témoin. La figure 53 montre les différents morceaux traités.

Après le traitement enzymatique par pulvérisation de la solution de papaïne, nous avons remarqué, pour les deux muscles *Longissimus* et *Semi tendinosus*, que les morceaux étaient de couleur rouge presque semblable à celle du témoin. Toutefois, ils perdent leur forme rectangulaire, avec une surface très lisse, en raison de l'application de l'enzyme à la surface de la viande. Nous avons aussi observé un aspect flasque et difficile à couper, due à la dégradation des protéines, à la surface des morceaux de viande.

Alors que, les échantillons traités par injection de la papaïne ont préservé la couleur originelle, ils apparaissent légèrement déformés, par rapport au témoin. La surface de cet échantillon était légèrement lisse et facile à trancher.

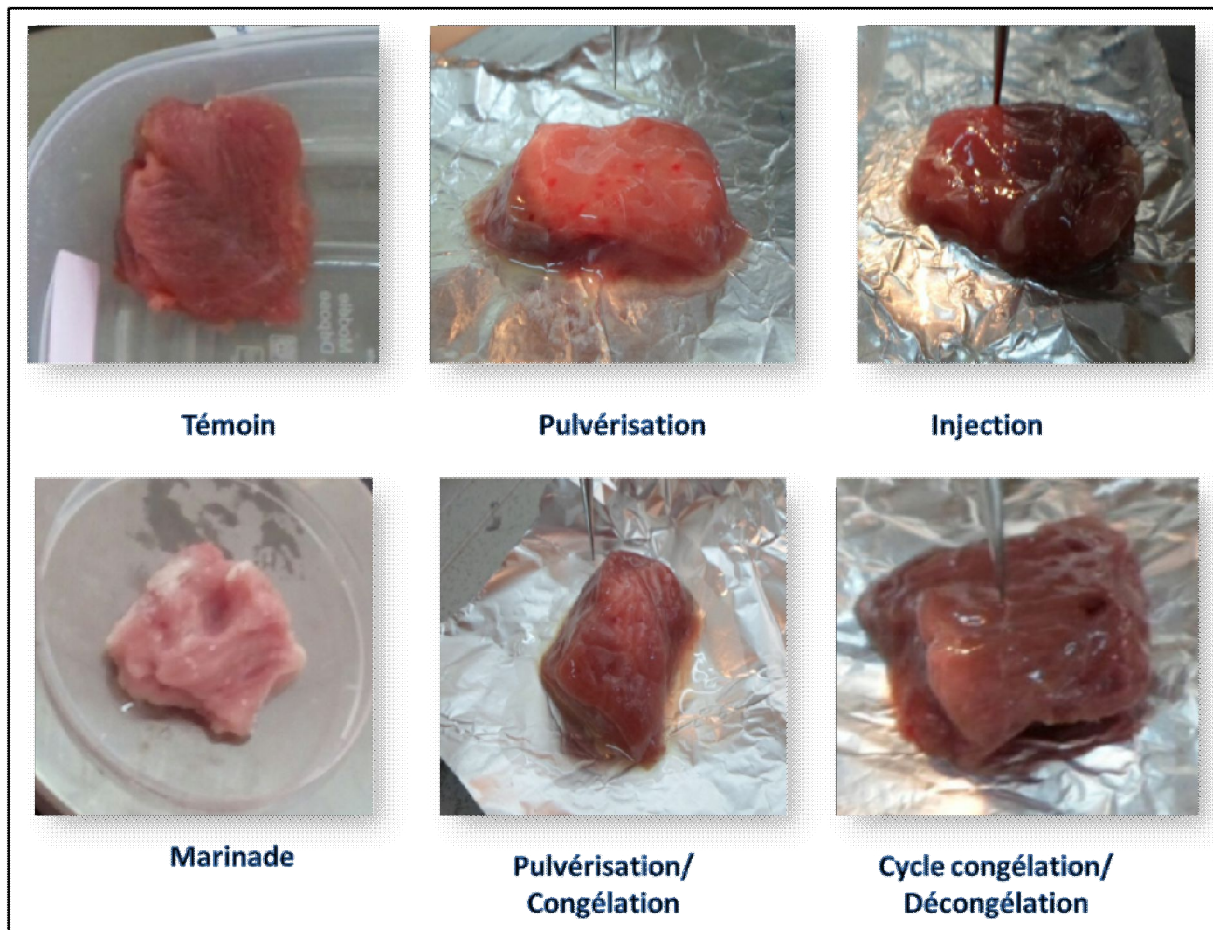
En comparant avec le témoin, l'aspect des échantillons marinés est largement modifié ; la couleur rouge de la viande a presque disparu, à cause de la solubilisation des protéines sarcoplasmiques (la myoglobine), la forme du morceau a été modifiée, compte tenu d'une légère augmentation du poids causée par la quantité de solution retenue et une surface très fragile ce qui rend le tranchage très facile.

Dans le cas du traitement par cycle de congélation/décongélation, l'attendrissement est due à la formation de cristaux d'eau (conséquence d'une congélation lente) ; ce qui fragilise les parois cellulaires et donc, la solubilisation de la myoglobine. Par conséquent, les morceaux de viande perdent un peu, de leur couleur (rouge qui tend vers le rose) et leur structure est légèrement modifiée.

En couplant, le traitement de pulvérisation avec le cycle de congélation/décongélation, les changements survenus sont comparables à ceux des échantillons traités par simple traitement physique, congélation/décongélation, notant que la surface des morceaux traités par l'enzyme était plus lisse mais pas aussi importante que ceux traités, uniquement par pulvérisation. Cela s'explique par le fait que la température basse (-20°C) a ralenti l'action de l'enzyme.

De plus, Islam & Molinar-Toribio (2013) ont rapportés que la papaïne peut attendrir la surface de la viande et développer une «mollesse» caractéristique.





**Figure 53:** Images des différents morceaux pour chaque traitement d'attendrissement artificiel effectué traité par la pepsine.

## II. Pepsine

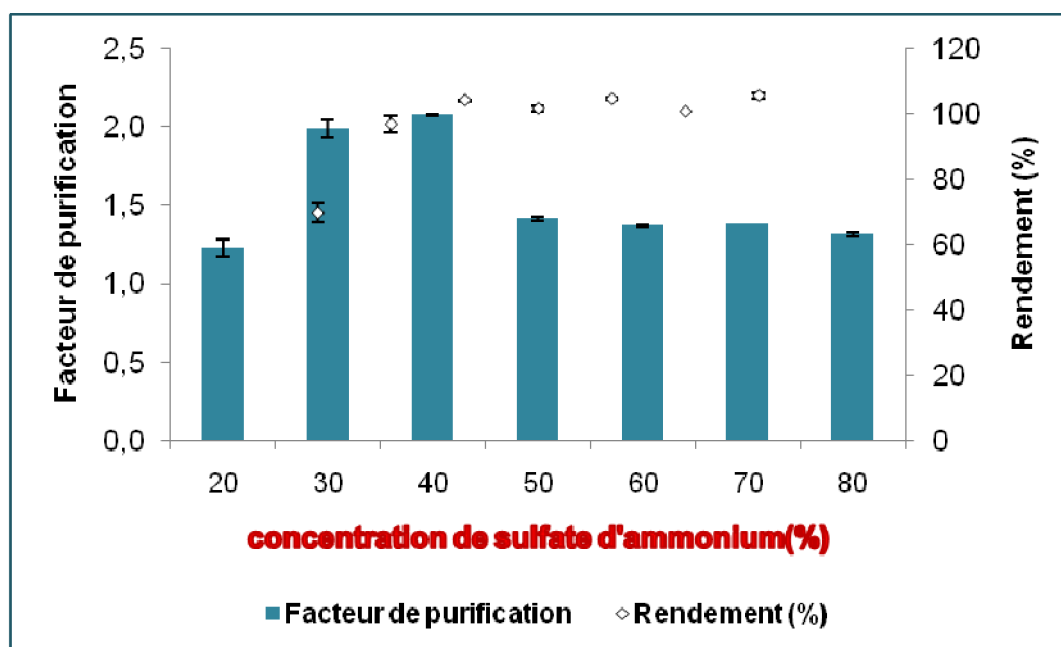
### 1. Résultats de l'optimisation du protocole de purification de la pepsine

Le système TPP est utilisé pour la première fois pour la purification de la pepsine, dans l'objectif de mettre en place un protocole de purification rapide et facilement exploitable au sein de notre laboratoire. De ce fait, une optimisation des différents paramètres de système de répartition en trois phases est élaborée. La concentration de protéine de départ de l'extrait brut et son activité enzymatique étaient de 1,99 mg/mL et 296.32U/mL, respectivement (Tableau 11). Après optimisation, la pepsine se répartit exclusivement, dans la phase intermédiaire (Figure 58C) où un rendement d'activité enzymatique et une pureté élevée ont été obtenus.

### 1.1. Résultats de l'effet de la saturation en Sulfate d'ammonium

La précipitation saline au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou *Salting-out* est très importante, dans le cas de la purification des protéines d'une manière générale et dans le cas des enzymes en particulier (Ward 2009). L'efficacité de saturation des protéines au sulfate d'ammonium dépendra d'abord de la concentration en sel et en second lieu, de la charge nette des protéines (Burgess & Deutscher 2009). Dans notre protocole et afin de déterminer la précipitation adéquate en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , une gamme de concentration (20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80%) a été testée en maintenant les paramètres expérimentaux comme suit : le rapport extrait brut : t-butanol de 1 : 1 ; température de 25°C et à pH 6.5. L'influence des différents taux de précipitation saline sur l'activité de la pepsine est exposée dans la figure 54.

Nous remarquons l'augmentation de l'activité protéolytique dans la phase intermédiaire au fur et à mesure de l'augmentation du pourcentage en sel jusqu'à la saturation de 40%. Cependant, une augmentation de la concentration en sulfate d'ammonium, (au-delà de 40%) et une diminution du pourcentage de récupération de la protéase ont été observées. Par conséquent, la concentration en sulfate d'ammonium de 40% a été choisie, pour la suite du protocole de purification.



**Figure 54:** Effet de la concentration de sel de sulfate d'ammonium sur le rendement et le facteur de purification de la pepsine de proventricules de poulet par le système TPP.



**Tableau 10 :** Comparaison entre les différents paramètres de mise en place de la purification par le système TPP, de différentes enzymes d'origines variées

Enzymes	Sources	[(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] [%]	Rapports (EB : t-butanol)	pH	Rendements %	Facteurs de purification
Pepsine <sup>[1]</sup>	Proventricules de poulet	40	1.0 :0.75	4	86	3.26
Protéases alcalins <sup>[2]</sup>	Viscères de poisson-chat géant d'élevage	50	1 :0.5	8	220	6.7
Protéases <sup>[3]</sup>	Viscères de poisson-chat géant d'élevage	50	1.0 :0.5		163	5.0
Protéases <sup>[4]</sup>	Hépatopancréas de crevettes blanches du Pacifique	30	1.0 :1.0		76.0	2.6
Cucumisine <sup>[5]</sup>	Melon	60	1.0 :1.25	8	156	4.61
Ficine <sup>[6]</sup>	Latex de figue	40	1.0 :0.75	7	167	6.04
Zingibaine <sup>[7]</sup>	Gingembre	50	1.0 :1.0	7	215	14.19
Papaine <sup>[8]</sup>	Latex de papaye	40	1.0 :0.75	–	257	3.65
α-galactosidase <sup>[9]</sup>	Pastèque	50	1.0 :1.0	5	176	5.7
Invertase <sup>[10]</sup>	Levure boulangère	50	1.0 :0.5	4	363	15
β-galactosidase <sup>[11]</sup>	Pois chiche	60	1.0 :0.5	6.8	133	10.1

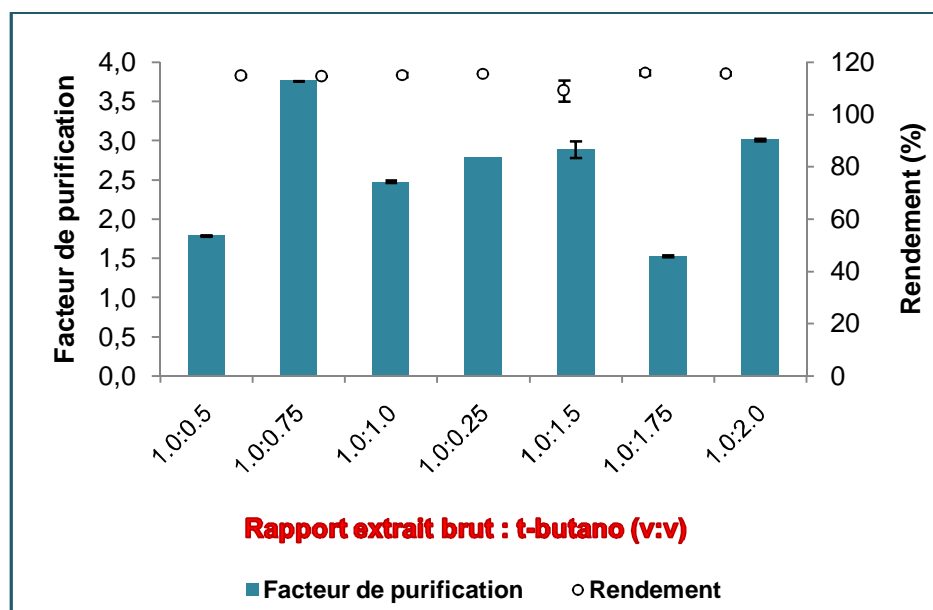
<sup>[1]</sup> Présente étude, <sup>[2]</sup> (Ketnawaet *et al.* 2014), <sup>[3]</sup> (Rawdkuen *et al.* 2012), <sup>[4]</sup> (Senphan & Benjakul 2014), <sup>[5]</sup> (Gagaoua *et al.* 2017), <sup>[6]</sup> (Gagaoua *et al.* 2014), <sup>[7]</sup> (Gagaoua *et al.* 2015), <sup>[8]</sup> (Gagaoua *et al.* 2020), <sup>[9]</sup> (Bayraktar & Önal 2013), <sup>[10]</sup> (Akardere *et al.* 2010), <sup>[11]</sup> (Duman & Kaya 2013)

Le tableau 10 présente une comparaison entre les différents paramètres, de mise en place de la purification par le système TPP, de différentes enzymes d'origines variées. Les résultats obtenus sont comparables, à ce que nous avons obtenus pour la ficine (Gagaoua *et al.* 2014) et la papaine (Gagaoua *et al.* 2020). Des concentrations supérieures, de l'ordre de 50% ont été rapportées, en purifiant des protéases extraites des viscères de poisson-chat géant d'élevage (Ketnawa *et al.* 2014 ; Rawdkuen *et al.* 2012), par contre, Senphan & Benjakul (2014), ont rapporté que la purification de protéases à partir hépatopancréas de crevettes blanches du Pacifique par le système TPP nécessitait un pourcentage de sel, de l'ordre de 30.

## 1.2. Résultats de l'effet du rapport l'extrait brut :t-BuOH

Le t-Butanol est l'un des paramètres jouant un rôle considérable dans le système de répartition, en trois phases. Ce solvant organique polaire a la caractéristique, en mélange avec le sulfate d'ammonium i) de créer un effet ionique marqué ; ii) de jouer un rôle

kosmotropique ; iii) d'augmenter la tension interfaciale en engendrant un effet osmotique stressant (déshydratation) et d'associer l'ion  $\text{SO}_4^{2-}$  avec les sites cationiques de la protéine d'intérêt (Dennison 2011; Roy *et al.* 2014).



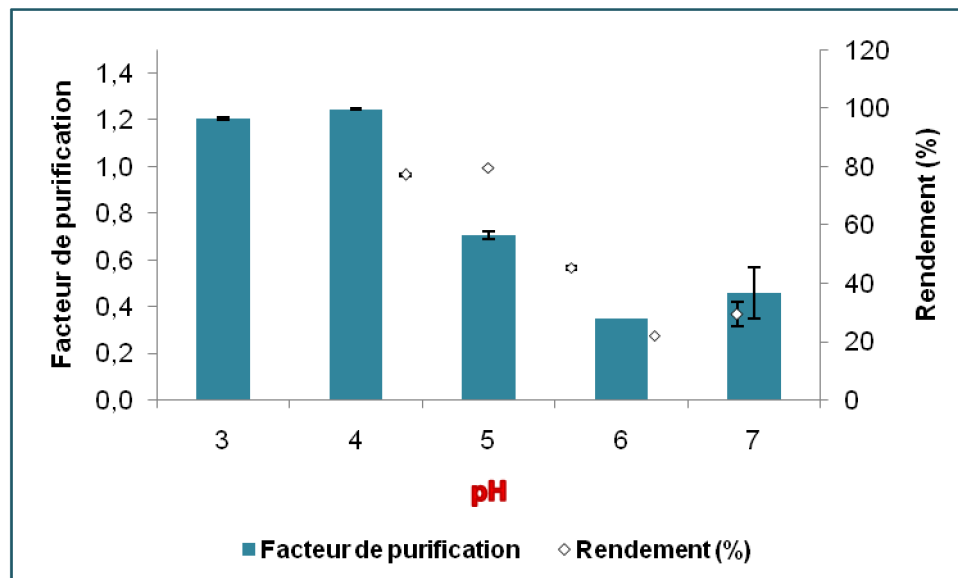
**Figure 55:** Effet du rapport extrait brut : t-butanol sur le rendement et le facteur de purification de la pepsine de proventricules de poulet par le système TPP.

Le meilleur facteur de purification (3.76) et le rendement (115%) ont été obtenus, avec des rapports de 1,0: 0,75 (v / v) (Figure 55). Ce même rapport a été rapporté par Senphan & Benjakul (2014) pour la purification d'une protéase extraite de l'hépatopancréas des crevettes blanches du Pacifique. Par ailleurs, d'autres études ont rapporté des taux en *t-butanol* inférieurs. Par exemple, Rawdkuen *et al.* (2012) et Ketnawa *et al.* (2014) ont utilisé un rapport de 1,0 : 0,5 pour la purification de certaines protéases, extraites des viscères d'animaux marins.

### 1.3. Résultats de l'effet du pH

Le pH du système est également un paramètre très important dans le système TPP. Les enzymes présentent un comportement différent, dans les systèmes TPP et en fonction du pH du système. L'efficacité du relargage des protéines va dépendre également de la charge nette des protéines qui est très dépendante du pH (Şen *et al.* 2011). Les protéines ont tendance à précipiter plus facilement, à leur point isoélectrique (pI) (Akardere *et al.* 2010). Les forces électrostatiques et les liaisons des anions des sels (c'est-à-dire  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3^-$ ) aux molécules cationiques de la protéine favorisent la contraction macromoléculaire et la conformation, qui sont les principales causes de la forte dépendance

du anion du sel-pH lors du relargage (Özer *et al.* 2010). Les protéines ont une prédisposition, à précipiter plus facilement à leur pI. Sous leur pI, les protéines sont chargées positivement et précipitées quantitativement par TPP. D'autre part, les protéines chargées négativement sont plus solubles et pas facilement précipitées (Dennison *et al.* 1997).

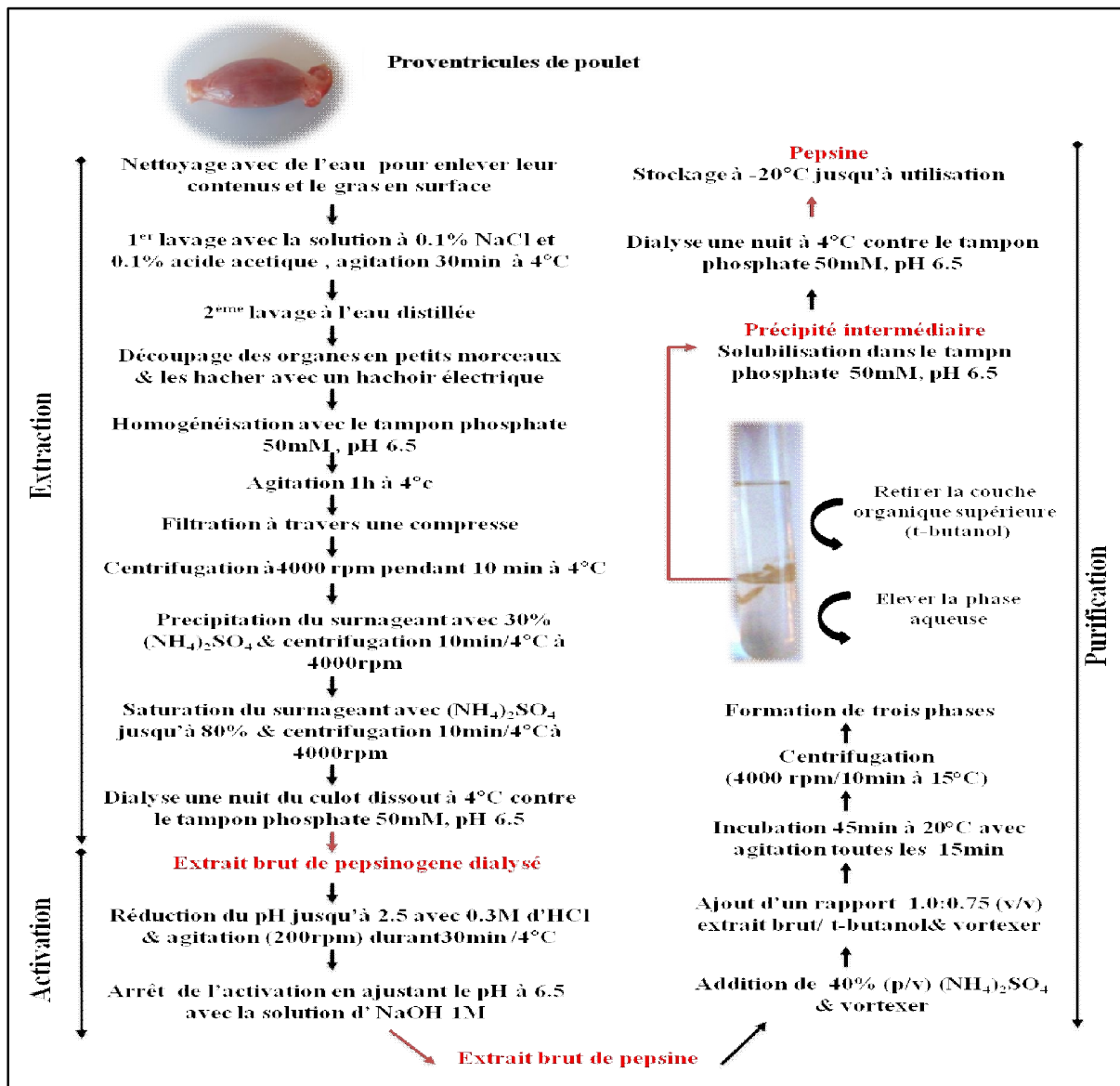


**Figure 56:** Effet du pH sur le rendement et le facteur de purification de la pepsine de proventricules de poulet par le système TPP.

Notre pepsine s'est répartie sélectivement dans l'interphase de 40% (p / v) de sulfate d'ammonium, avec un rapport 1: 0,75 d'extrait brut / t-butanol (v/v). À pH 4,0 a donné un rendement d'activité maximale de 86% (Figure 56). Les aspartiques protéases précipitent sélectivement à pH acide, laissant la plupart des protéines contaminantes, dans la phase aqueuse. Les résultats obtenus indiquent que la pepsine précipitent plus facilement en phase intermédiaire à son pI (environ 4) et était soluble au-dessus la valeur de son pI.

#### 1.4. Évaluation globale du profil de purification de la pepsine par le système TPP

Le protocole de purification mis en place, lors de cette étude consiste en une concentration de l'extrait brut de pepsine dialysé par l'ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 40%, puis un fractionnement par l'addition du T-butanol, avec un rapport de (1.0 :0.75) (v:v) d'extrait brut/t-butanol et enfin une stabilisation par dialyse contre le tampon phosphate de sodium 50mM pH 6.5. La figure 57 illustre l'ensemble des étapes d'extraction, d'activation et de purification de la pepsine par le système de répartition en trois phases, avec les conditions opératoires correspondantes jusqu'à l'obtention de trois phases.



**Figure 57:** Représentation des différentes étapes employées pour extraire, activer et purifier la pepsine à partir de proventricules de poulet en utilisant un système de partitionnement en trois phases (TPP).

Le profil de purification global de la pepsine par le système TPP a été résumé dans le tableau 11. Nos résultats montrent que la pepsine a une tendance à se concentrer dans la phase intermédiaire du système TPP (Figure 58C). Un rendement de purification de l'ordre de 86 % et un facteur de purification de 3.26 ont été calculés pour la phase intermédiaire. L'activité spécifique de la fraction protéique récupérée est 485.52U/mg. Néanmoins, nous avons remarqué une activité non négligeable, avec un rendement de 29% dans la phase aqueuse. Ceci est fort probablement dû, à une perte de l'enzyme, lors de cette phase, et d'erreurs de prélèvement et de séparation des deux phases.

**Tableau 11** : Profil de purification global de la pepsine de proventricules de poulet par le système TPP

Étapes de Purification	Activité enzymatique (U/ml)	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	296.32	1.99	148.79	1.00	100
Phase aqueuse	85.78	0.20	430.02	2.89	29
Phase intermédiaire	253.40	0.52	485.52	3.26	86

Le tableau 12 résume les différentes méthodes et stratégies utilisées pour la purification du pepsinogène et de la pepsine, de différentes espèces aviaires, en comparaison avec notre étude. C'est nettement significatif, que le protocole que nous avons développé a donné les meilleurs résultats en termes de rendement et de taux de purification. En effet, Liu *et al.* (2016) et Bohak (1969) ont purifié la pepsine de proventricules de poulet, en se servant de plusieurs méthodes chromatographiques, avec un rendement respectif de 35.3 et 61%. De même, Jamdar & Harikumar (2016) ont purifié la pepsine des intestins (Fraction post-lysosomale) de poulet, avec un rendement de 4% et un facteur de purification très élevé de l'ordre de 600. D'un autre côté, Esumi *et al.* (1980), qui ont purifié la pepsine des proventricules de caille du Japon (*Coturnixcoturnix japonica*), ont trouvé un rendement de 39.3%. Des travaux portant sur la purification de la pepsine des proventricules de l'autruche (*Struthio camelus*) ont obtenu des rendements entre 1.5 et 63.5% (Streicher *et al.* 1985 ; Pletschke *et al.* 1995).

A travers cette synthèse, nous pouvons conclure encore une fois que le système TPP, connu comme une technique de concentration et de déshydratation améliorée, de manière considérable, l'activité catalytique de la pepsine tout en augmentant son efficacité protéolytique. Ce système de traitement qui a été largement discuté conduit à l'activation simultanée de l'enzyme et une plus grande souplesse dans la structure moléculaire de l'enzyme comme suggéré dans de nombreuses études.

**Tableau 12:** Comparaison de plusieurs protocoles d'extraction et de purification de la pepsine à partir de diverses espèces aviaires

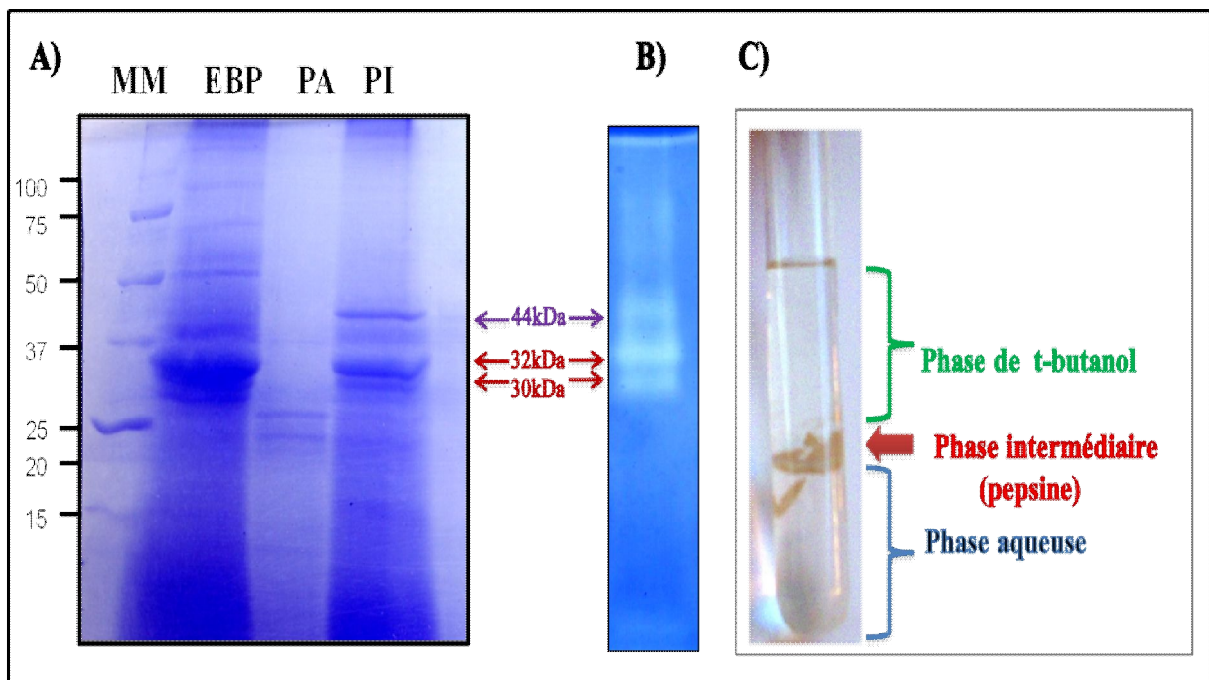
Animal	Organes	Etapas de purification	Poids moléculaire (KDa)	Rendement (%)	Facteur de purification
Poulet <sup>a</sup>	Intestin (fraction post lysosomale)	(DEAE) sepharose Acidification Chromatographie d'affinité utilisant Pepstatin A Agarose. Chromatographie Sephadex G-75.	P 36	4.0	600
Poulet <sup>b</sup>	Estomac	Precipitation à (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Ultrafiltration Chromatographie DEAE-Sepharose FF Chromatographie Sephacryl S-200H	PG 43.6	35.3	30.7
Poulet <sup>c</sup>	Estomac	Système de répartition en trois phases (TPP)	PI 44 PII 40 PIII 32 PIV 30	86	3.26
Poulet <sup>d</sup>	Estomac	Precipitation à l'acetone, Chromatographie diethylaminoethyl cellulose Gel filtration en Sephadex G-100.	PG43 P 35	61	
Poulet <sup>e</sup> ( <i>Gallus gallus</i> ) <sup>e</sup>	Proventricules	DE-1 1 and DE-52 exchangeuse d'ions cellulose Sephadex G-100	PGA41.6 PGD42 PGC43.75 PA 43.46 PD 43.13 PC 38.35		
Caille du Japon <sup>f</sup> ( <i>Coturnix japonica</i> )	Proventricules	Hydroxyapatite et DEAE-Sepharose CL-6B	PG 40 P 36	39.3	
Autruche <sup>g</sup> ( <i>Struthiocamelus</i> )	Proventricules	Fractionnement à (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Chromatographie Toyopearl Super Q-650S Chromatographie hydroxylapatite Chromatographie SP-SephadexC-50	PG I40.4 PI41.9 PG II 36 PII 36.3	1.5 5.4	
Autruche <sup>h</sup> ( <i>Struthiocamelus</i> )	Proventricules	Chromatographie DEAE-cellulose Chromatographie Sephadex G-100 Chromatographie hydroxylapatite	P 29.033	63.5	
Dinde <sup>i</sup>	Proventricules	ChromatographieSephadex G-50 resin in gel filtration column	P 36	0.72	0.47
Canard <sup>j</sup> ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	Estomac glandulaire	Chromatographie DEAE-cellulose DE-32, Sephadex G-100, Mono Qrra HR column, et AH-Sepharose 4B	PG40 P35	24.87	52.2

<sup>a</sup>(Jamdar & Harikumar 2016), <sup>b</sup>(Liu et al. 2016), <sup>c</sup>La présenteétude, <sup>d</sup>(Bohak 1969), <sup>e</sup>(Donta & Van Vunakis 1970), <sup>f</sup>(Esumi et al. 1980), <sup>g</sup>(Pletschke et al. 1995a; Pletschke et al. 1995b), <sup>h</sup>(Streicher et al. 1985), <sup>i</sup>(Temiz et al. 2007), <sup>j</sup>(Pichová & Kostka 1990). **PG**: pepsinogene, **P**:pepsine

## 2. Caractérisation de la pepsine purifiée

### 2.1. Vérification de la pureté des étapes de la purification par SDS-PAGE

L'analyse des différentes fractions du système TPP par l'électrophorèse en conditions dénaturantes Glycine SDS-PAGE a confirmé que le système TPP permet de séparer la pepsine dans la phase intermédiaire (Figure 58A). Le gel révèle quatre bandes protéiques, à des poids moléculaire, de l'ordre de 44, 32 et 30KDa. Ces protéines séparées ont également été soumises à l'analyse zymographique, en utilisant la caséine comme substrat. Le gel de zymogramme a montré des bandes bien résolues de protéines, ce qui démontre l'activité protéolytique de ces protéases (Figure 58B). Il est à signaler que des isoformes de la pepsine ont été déjà rapportés dans la littérature (Tableau 12).



(A) Glycine SDS-PAGE (Gel de polyacrylamide à 12% de séparation): ligne MM, étalons de masse moléculaire; EBP : extrait brut de pepsine dialysée ; PA, phase aqueuse de TPP; PI, pepsines récupérées (phase intermédiaire de TPP) (B) Zymogramme, en utilisant une solution de caséine à 2% dans le tampon phosphate 50 mM, pH 6,5 à 30°C (C). Résultat du système TPP représenté par une image mettant en évidence l'aspect final de l'extrait brut de pepsine se divisant en trois phases distinctes.

**Figure 58 :** Fractionnement en trois phases (TPP) et analyse du poids moléculaire et de la pureté de la pepsine récupérée à partir de proventricules de poulet.



Il a été rapporté par Donta & Van Vunakis (1970) que le proventricule de poulet (*Gallus gallus*) contient trois pepsines, PA, PD et PC et qui avaient un poids moléculaire respectif de 43.46, 43.13 et 38.35KDa. Deux décennies plus tard, Pletschke *et al.* (1995a; b) ont séparé les protéases de proventricules d'autruches (*Struthio camelus*) en deux fractions : PI (41.9KDa) et PII (36.3KDa). Tandis qu'une seule fraction de pepsine d'un poids moléculaire de 36KDa a été rapporté par plusieurs auteurs ; notamment Jamdar & Harikumar(2016), en travaillant sur les intestins de poulet, Esumiet *al.*(1980) à partir des proventricules de caille du Japon (*Coturnixcoturnix japonica*) et Temiz *et al.*(2007) sur les proventricules de dinde. Un poids moléculaires similaire de 35KDa a été rapporté par Bohak(1969), en travaillant sur l'estomac de poulet et Pichová & Kostka(1990), sur l'estomac glandulaire du canard (*Anas platyrhynchos*).

Plusieurs auteurs ont rapporté des résultats similaires à ceux trouvés, sur différentes espèces animales, tels que les ruminants notamment les espèces : ovine (Fox & Whitaker 1977 ; Mostofa *et al.* 1990), bovine (Chow & Kassell 1968; Lang & Kassell 1971 ; Nevaldine & Kassell 1971), caprine (Suzuki *et al.* 1999) et cameline (Abuharfeel & Abuereish 1984) (Tableau 12). Aussi, Kageyama & Takahashi (1984) ont trouvé trois types de pepsinogène (PGI à 41KDa, PGII à 38KDa et PGIII à 40KDa), dans la muqueuse gastrique du lapin. Des résultats comparables ont été rapportés sur le singe (Kageyama & Takahashi 1980 ; Kageyama & Takahashi 1976b) et la souris (Muto & Tani 1979 ; Esumi *et al.* 1978). Le tableau 13 résume les principales caractéristiques de pepsines extraites et purifiées d'origines diverses rapportées par des études antérieures.



**Tableau 13:** Principales caractéristiques de pepsines extraites et purifiées d'origines diverses.

Origines	Animaux	Organes	Étapes de purification	Types	PM (KDa)	pH optimal	T° optimale	Rendement (%)	Facteurs de purification
Ruminants	Mouton <sup>[1]</sup>	Homogénatsaqueu x la caillette	pH fractionation, Chromatographie on Sepharose 4B-poly-L-lysine columns gel filtration on Sephadex G-100	P	34	1,8			120
	Bœuf <sup>[2]</sup>	Caillette	Aqueous two-phase system					48.5	9.0
	Bœuf <sup>[3]</sup>	Caillette	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation, Absorption on diethylaminoethyl (DEAE) cellulose, Gel filtration on Sephadex G-100, ChromatographieDEAE-cellulose	PG I PG II PG IV PI PII PIV	38.943 33.367	2 1.35 1.35		72	
	Bœuf <sup>[4]</sup>	Caillette (muqueuse du 4 <sup>ème</sup> estomac)	Chromatographie poly-L-lysine Sepharose 4 B, CM-cellulose and Sephadex G-100	PGI PGII PGIV	38.178 38.943 38.008			63	10
	Vache <sup>[5]</sup>			PGII PGIA PGIB PGIC PGID	39.0				
	Mouton <sup>[5]</sup>	Muqueuse de la caillette	Ion-exchange absorption Sephacryl S-300 gel filtration Chromatographie <i>fast protein liquid</i> (FPLC) system	PGA PGB PBC	43.0				
	Chèvres <sup>[5]</sup>			PGA PGB PGC	42.0				
	Chèvres <sup>[6]</sup> ( <i>Capra hircus</i> )	Muqueuse de la caillette	DEAE–Sephacel column Sephadex G-100 column Mono Q FPLC column	PGA-1 PGA-2 PGA-3 PGC-1 PGC-2	41 40 40 39 39	2 2 2 3 3			

Origines	Animaux	Organes	Étapes de purification	Type	PM (KDa)	pH optimal	T° optimale	Rendement (%)	Facteur de purification
Camelin	<i>Camelus dromedarius</i> <sup>[7]</sup>	Muqueuse gastrique	Chromatographie DEAE-Cellulose Sephadex G-100	P I	35.5				
				P II	34.7				
Porcin	Porc adulte <sup>[8]</sup>	Muqueuse fundique	Chromatographie DEAE-Cellulose (DE32) Sephacryl S-100 Mono Q, PD-10 columns with Sephadex G-25M	PG B	41	3			
				PB	39				
	Porc <sup>[9]</sup>	Estomacs (Muqueuse gastrique)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Fractional precipitation two precipitations with a copper hydroxide reagent under particular conditions	PG	42	2.7			
				P	38				
Porc <sup>[10]</sup>	Région fundique de l'estomac	Chromatographie échangeuse d'ion Chromatographie d'exclusion	PGB	39					
			PGC	41.4					
			PGD	35					
			PB	38.6					
			PC	36					
PD	41								
Aviaire	Poulet <sup>[11]</sup>	Intestins (Fraction post lysosomale)	(DEAE) sepharose Acidification Chromatographie d'affinité utilisant Pepstatin A Agarose. Sephadex G-75 Chromatography.	p	36	2.8-3.6	65	4.0	600
				Poulet <sup>[12]</sup>	Estomac	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation Ultrafiltration Chromatographie DEAE-Sepharose FF Chromatographie Sephacryl S-200H	PG	43.6	3.0
	Poulet <sup>[13]</sup>	Estomac	Tree phases partitioning (TPP)				PI	44	3.0 & 7.0
				P II	40				
Poulet <sup>[14]</sup> ( <i>Gallus gallus</i> )	Estomacs glandulaires	Méthodes par étapes de relargage	P III	32	2.5-3				
			P IV	30					

Origines	Animaux	Organes	Étapes de purification	Type	PM (KDa)	pH optimal	T° optimale	Rendement (%)	Facteur de purification	
Aviaire	Poulet <sup>[15]</sup>	Estomac	acetone precipitation, Chromatographie diethylaminoethyl cellulose Gel filtration on Sephadex G-100.	PG P	43 35	2.8	25	61		
	Poulet <sup>[16]</sup> ( <i>Gallus gallus</i> )	Proventricules	DE-1 1 and DE-52 échangeuse d'ion cellulose Sephadex G-100	PGA PGD PGC PA PD PC	41.6 42 43.75 43.46 43.13 38.35					
	Caille du Japon <sup>[17]</sup> ( <i>Coturnix coturnix japonica</i> )	Proventricules	Hydroxyapatite and DEAE-Sephacel CL-6B	PG P	40 36	3		39.3		
	Autruche <sup>[18]</sup> ( <i>Struthio camelus</i> )	Proventricules	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation, Chromatographie Toyopearl Super Q-650S Chromatographie hydroxylapatite Chromatographie SP-Sephadex C-50	PG I PG II PI PII	40.4 41.9 36 36.3	2 3.5-5.2	40-60°C 60°C	1.5 5.4		
	Autruche <sup>[19]</sup> ( <i>Struthio camelus</i> )	Proventricules	Chromatographie DEAE-cellulose Chromatographie Sephadex G-100 Chromatographie hydroxylapatite	P	29.033	3.6	37°C	63.5		
	Dinde <sup>[20]</sup>	Proventricules	Chromatographie Sephadex G-50 resin in gel filtration column	P	36			0.72	0.47	
	Canard ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) <sup>[21]</sup>	Estomac glandulaire	Chromatographie DEAE-cellulose DE-32, Sephadex G-100, Mono Qrra HR column, and AH-Sephacel 4B	PG P	40 35	4		24.87	52.2	
	Lapin	Lapins adultes <sup>[22]</sup>	Muqueuse Gastrique	Chromatographies on DEAE-cellulose, DEAE-Sephacel and Sephadex G-150	PGI	41			2.3	
					PGII-1	38			3.1	
					PGII-2	38			8.7	
PGII-3					38			19		
PGII-4					38			11		
PGIII	40			16						

Origines	Animaux	Organes	Étapes de purification	Type	PM (KDa)	pH optimal	T° optimale	Rendement (%)	Facteur de purification
Singe	Macaque crabier <sup>[23]</sup> ( <i>Macaca fascicularis</i> )	Muqueuse Gastrique	Gel filtration on Sephadex G-150 Chromatographie DE-32 Cellulose	PG I (a,b)	43	1.5-3		4.4	
				PGIII1(a,b)	40				
				PGIII2(a,b)	40			-	8.7
				PG III3	40				
				PGC	38				11
				P I(a,b)	38				
				PIII1	35				17
				PIII2	35				4.1
				P III3	35				
	PC	34							
	Macaque japonais <sup>[24]</sup> ( <i>Macaca fuscata fuscata</i> )	Estomac	Chromatographie DEAE-Cellulose Sephadex G-100 Gel filtration	PGI	48	2.0	37°C	0.46	
				PGII	43			0.36	
				PGIII-1	40			4.0	
				PGIII-2	40			12.1	
				PGIII-3	40			17.4	
PI				38	2.0				
PII				36	2.0				
PIII-1	32	2.4							
PIII-2	32	2.0							
PIII-3	34	2.2							
Macaque japonais <sup>[25]</sup> ( <i>Macaca fuscata fuscata</i> )	Estomac	Chromatographie DE-32 Cellulose Sephadex G-100 Gel filtration Sephadex G-200 Gel filtration	PGC PC	35 27	3				
Canin (chien)	Chiens bâtards <sup>[26]</sup>	Muqueuse fundique	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation	PG	39.9		7		
			Two batch adsorption on DEAE-Cellulose Gel filtration on Sephadex G-100 Chromatographie DEAE-Cellulose Gel filtration on Sephadex G-100						
	Chien <sup>[27]</sup>	Estomac (Muqueuse gastrique)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation	PG	39.9				
			Polylysine-Sepharose 4B Chromatography Gel Filtration on Sephadex G-100. Chromatographie DEAE-Cellulose	P	35				

Origines	Animaux	Organes	Étapes de purification	Type	PM (KDa)	pH optimal	T° optimale	Rendement (%)	Facteur de purification
Rat	Rats adultes de souche Wistar <sup>[28]</sup>	Muqueuse gastrique	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation Chromatographie DEAE-Cellulose deux DEAE-Sepharose CL-68B	PGI	38	2	-	18.9	
				PGII	38			10.1	
				P I	32				
				P II	32				
	Souris BDF mâles <sup>[29]</sup>	Estomacs	Centrifugation and precipitation Pepstatin-Sepharose 4B Sephadex G-100 deux DEAE-Sepharose CL6B	PG1	41	2-3		11.1	
				PG2	41			9.0	
				PIa	38				
				PIb	36				
				PIIa	38				
				PIIb	36				
	Rats mâles consanguins Wistar-Imamichi <sup>[30]</sup>	Muqueuse fundique de l'estomac du rat	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation Chromatographie DEAE-Sepharose Chromatographie Ultrogel AcA44 Chromatographie DEAE-Sepharose Polyacrylamide gel electrophoresis	PGI	40	2.1-3.1		27.6	10
				PGII	42			0.0972	7.6
				PGIII	40.5	0.0519		6.3	
				PGIV	39	0.230		7.0	
				PI	35.5				
PII				40					
PIII				35.5					
PIV				37					
Chats	Chat <sup>[31]</sup>	Muqueuse pylorique et fundique	Chromatographie DEAE-Cellulose Agar-Gel Electrophoresis of Column Fractions	9 pepsins				3	
Grenouille	Ouaouaron <sup>[32]</sup> ( <i>Ranacatesbeiana</i> )	Muqueuse œsophagienne	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation Chromatographie DEAE-Cellulose Sephacryl S-200 gel filtration Chromatographie Q Sepharose column	PG I	40,1	3		11	
				PG II	39,2			22	
				PI	32.5				
				PII	33.0				
Ouaouaron <sup>[33]</sup> ( <i>Ranacatesbeiana</i> )	Glande œsophagienne	Chromatographie DEAE-Cellulose Gel filtration on sephadex G-75	PG I	31.5	1.4-2.0				
			PG II	33.5					
			PGIII	33.7					
Serpent	Serpent Habu <sup>[34]</sup> ( <i>Trimeresurus flavoviridis</i> )	Muqueuse gastrique	Chromatographie DEAE-Cellulose Chromatographie DEAE- Sepharose Chromatographie Sephacryl S-200gel	PG	38	1,5-2,0	50C°	29	6.2

Origines	Animaux	Organes	Étapes de purification	Type	PM (KDa)	pH optimal	T° optimale	Rendement (%)	Facteur de purification			
Tortue	Tortue à carapace molle <sup>[35]</sup> ( <i>Trionyx sinensis</i> )	Muqueuse gastrique	DEAE-Cellulose (DE-52), Sephadex G-100, Chromatographie Q Sepharose column	PG	43			21				
Ours	Ours noir d'Asie <sup>[36]</sup> ( <i>Selenarctos thibetanusjaponicus</i> )	Muqueuse gastrique	Chromatographie DEAE-Cellulose (DE-32) c Chromatographie Sephadex G-100	PGI-1	40			0.33				
				PGI-2	40		-	0.17				
				PGII-1	38			23.9				
				PGII-2	38			6.1				
				PGIII	42	1.5-3.0		0.34				
				P I-1	35							
				PI-2	35							
				PII-1	34							
				PII-2	34							
Poisson	Truite arc-en-ciel <sup>[37]</sup> ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Estomac	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation Chromatographie exchange used' anion , et two subsequent gel filtrations	PG I-a	45			0.2±2.9	8±3.1			
				PGI-b	44							
				PG II	42			6±1.2	58±1.3			
				PG III	42			4±3.1	100±4.2			
				P I	37	3	40					
				P II	35	2.5	30					
				P III	37	2.5	30					
				Coelacanth africain <sup>[38]</sup> ( <i>Latimeria chalumnae</i> )	Muqueuse gastrique	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation DEAE-cellulose (DE-52) Sephacryl S-200, mono Q and Q-Sepharose	PGI	37.0	2.0-2.1		17	
							PGII	37.0	2.3		12	
							PGIII	39.3			2.2	
pectoral rattail <sup>[39]</sup> ( <i>Coryphaenoides spectoralis</i> )	Estomac	acidification, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation Chromatographie Sephacryl S-200 Chromatographie DEAE cellulose Chromatographie Sephadex G-50	P A	35	3	45	5.7	7.1				
			P B	31	3.5	45	2.2	13.0				
Poisson-mandarin <sup>[40]</sup> ( <i>Siniperca chuatsi</i> )	Estomac	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation, Chromatographie (DEAE-Sephadex) Chromatographie Sephacryl S-200	PG I	36	3.5	45-50	2.8	25.6				
			PG II	35			13.3	11.5				
			PGIII-a	38			6.5	15.5				
			PGIII-b	35			14.0	16.2				

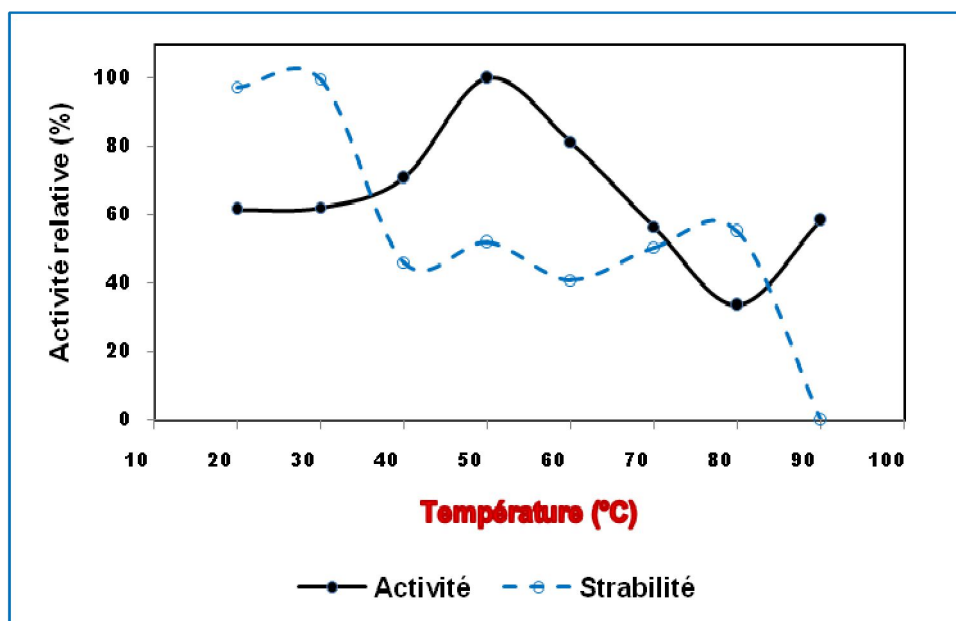
Origines	Animaux	Organes	Étapes de purification	Type	PM (KDa)	pH optimal	T° optimale	Rendement (%)	Facteur de purification
Poisson	thon blanc <sup>[41]</sup> ( <i>Thunnus alunga</i> )	Estomac	Chromatographie Sephadex G-200HR	PG	39.9	2	50	0.5	658
			Chromatographie DEAE-cellulose	P	32.7				
	Émissolles <sup>[42]</sup> ( <i>Mus telusmustelus</i> )	Estomac	Chromatographie fractionation Sephadex G-100 gel filtration	PG	40	2	40	38.36	9.4
			Chromatographie DEAE-cellulose	P	35				

Source: [1](Fox & Whitaker 1977), [2](Boeris *et al.* 2009), [3](Imelio *et al.* 2008), [4](Chow & Kassell 1968; Lang & Kassell 1971), [5](Nevaldine & Kassell 1971), [6](Mostofa *et al.* 1990), [7](Suzuki *et al.* 1999), [8](Abuharfeel & Abuereish 1984), [9](Nielsen & Foltmann 1995), [10](Herriott 1938), [11](Ryle 1970), [12](Jamdar & Harikumar 2016), [13](Liu *et al.* 2016), [14]Présenteétude, [15](Créviu-Gabriel *et al.* 1999), [16](Bohak 1969), [17](Donta & Van Vunakis 1970), [18](Esumi *et al.* 1980), [19](Pletschke *et al.* 1995a; Pletschke *et al.* 1995b), [20](Streicher *et al.* 1985), [21](Temiz *et al.* 2007), [22](Pichová & Kostka 1990), [23](Kageyama & Takahashi 1984), [24](Kageyama & Takahashi 1980), [25](Kageyama & Takahashi 1976b), [26] (Furihata *et al.* 1980) [27] (Marciniszyn & Kassell 1971) [28](Kageyama & Takahashi 1976a), [29](Muto & Tani 1979), [30](Esumi *et al.* 1978), [31](Kassell *et al.* 1976), [32](Shaw & Wright 1976), [33](Yakabe *et al.* 1991), [34](Shugerman *et al.* 1982), [35](Yonezawa *et al.* 2000), [36](Hirasawa *et al.* 1996), [37](Kageyama *et al.* 1983), [38](Wald *et al.* 2016), [39](Tanji *et al.* 2007), [40](Klomklao *et al.* 2007), [41](Zhou *et al.* 2008), [42](Nalinanon *et al.* 2010), [43](Bougatf *et al.* 2008)

**PG:** pepsinogene, **P:** pepsin, **KDa:** kilos Daltons **.PM:** Molecular weight

## 2.2. Résultats de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la pepsine purifiée

L'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la pepsine a été étudié, dans l'intervalle de la température de 20 à 90°C. D'après les résultats illustrés dans la figure 59, nous remarquons que la pepsine purifiée était très active, sur une large gamme de températures, entre 20 à 60°C, avec une activité maximale à 50°C. En effet, l'activité protéolytique augmente jusqu'à une température de 50°C, au-delà de cette valeur, l'activité diminue progressivement.



**Figure 59** : Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la pepsine de proventricules de poulet par le système TPP

Selon les résultats de travaux antérieurs présentés dans le tableau 13, nous remarquons que la température optimale de la pepsine extraite de différentes espèces animales varie entre 25 et 65°C. Les résultats que nous avons obtenus sont semblables aux résultats de Nalinanon *et al.* (2010) sur le thon blanc (*Thunnusalalunga*), et Yonezawa *et al.* (2000) sur le serpent. Pletschke *et al.* (1995aet b) et Liu *et al.* (2016) ont obtenu une température optimale de 60°C, respectivement pour la pepsine de proventricules de poulet et d'autruche (*Struthio camelus*). Aussi, Jamdar & Harikumar (2016) ont trouvé que la pepsine purifiée des intestins (fraction post-lysosomale) de poulet avait une température optimale de 65°C. Par contre, Streicher *et al.* (1985) et Bougatef *et al.* (2008), en travaillant respectivement sur la pepsine de proventricules d'autruche (*Struthio camelus*) et d'estomac des émissolles (*Mustelus mustelus*),



ont trouvé des valeurs légèrement faibles, de l'ordre de 37 et 40°C, respectivement (Tableau 12).

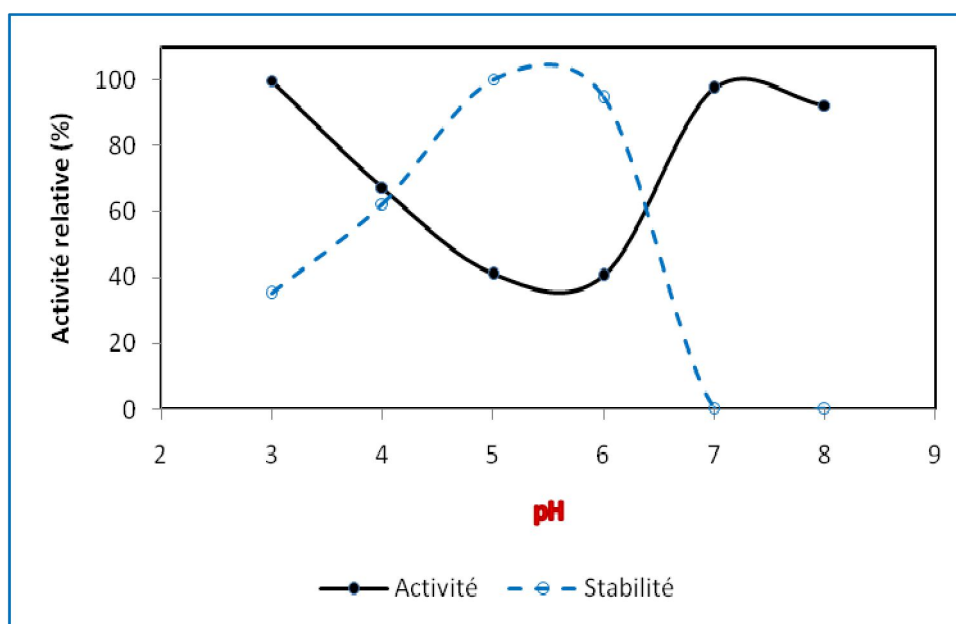
Les résultats de la stabilité thermique ont indiqué que cette protéase est stable, entre la gamme de la température de 20 à 80° C, avec une stabilité optimale à température 20 à 30°C, où elle a conservé son activité initiale. Notre pepsine a préservé plus de 50% de son activité, dans la plage de température de 40 à 80°C. Cependant, elle perd son activité lorsqu'elle est incubée pendant 1 h, à une température supérieure à 80°C. L'étude de Jamdar & Harikumar (2016) a montré que la stabilité de la pepsine des intestins de poulet était relativement stable jusqu'à 60°C, avec une perte de seulement 2–4% en activité. Cependant, à 67°C, l'enzyme était inactivée de 20% et 50%, en 30 min.

Selon Nouani *et al.* (2009), Les enzymes d'origine animale sont en général très sensibles à la température. Ce qui n'est pas le cas de la pepsine que nous avons purifiée ; qui représente un bon facteur pour son application en technologie alimentaire.

### **2.3. Résultats de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité de la pepsine purifiée**

Selon les résultats illustrés dans la figure 60, nous remarquons que la pepsine de proventricule de poulet a un pH optimal de 3, l'activité diminue, au fur et à mesure que le pH augmente, jusqu'à une deuxième valeur optimale de l'ordre de 7. Ce deuxième pH optimal est un bon facteur pour l'application de cette enzyme sur les produits alimentaires.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Bohak (1970), qui montre que la pepsine de poulet est sensible au changement de pH et reste stable jusqu'à un pH de 8 et elle est totalement inactivée au-delà d'un pH 8,5, son pH optimum sur l'hémoglobine est de 2,8. Aussi l'étude de Liu *et al.* (2016) et Crévieu-Gabrie *et al.* (1999) confirment que le pH optimal d'activité de la pepsine de poulet est égal à 3. Contrairement à, Pichová & Kostka (1990), en travaillant sur la pepsine de proventricule glandulaire du canard (*Anas platyrhynchos*), ils ont trouvé un pH optimal légèrement supérieur de l'ordre de 4. Pletschke *et al.* (1995 a et b), en travaillant sur les pepsines de proventricules d'autruche (*Struthio camelus*), ont trouvé que la pepsine I avait un pH optimal de l'ordre de 2, alors que la pepsine II avait un pH optimal entre 3,5 et 5,2. D'autre part, des pH optimaux, pour différents substrats ont été rapportés entre 1,6 et 1,8 par les pepsines de mouton, de bœuf et d'origine porcine (Fox *et al.* 1977).



**Figure 60 :** Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la pepsine de proventricules de poulet purifiée par le système TPP

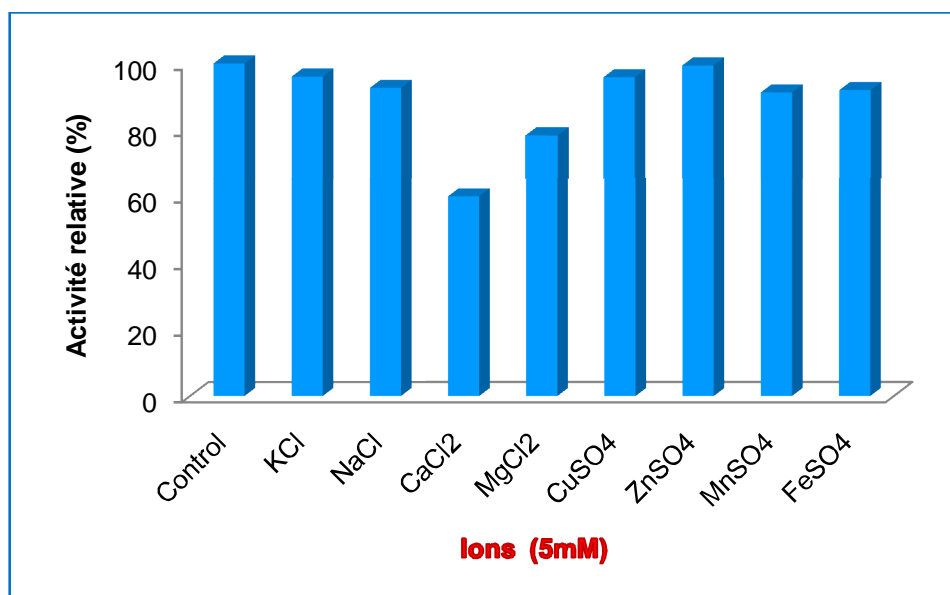
Le profil d'activité du pH a montré que la pepsine de poulet est très stable lorsqu'elle est incubée pendant 1 h dans une gamme de pH entre 5 et 6. À pH 3 et 4, notre aspartique protéase conserve, respectivement, 40 et 50% de son activité initiale. À un pH supérieur à 6,0, la stabilité diminue rapidement. Selon Bokak (1969), l'activité catalytique de la pepsine de poulet est la plus élevée entre un pH 1,5 et 4,5 avec un optimum à 2,8 en utilisant l'hémoglobine comme substrat. À pH 1,5, il y a 90% du maximum d'activité et à pH 4,5, 35% du maximum d'activité. Le pepsinogène de poulet est stable à 24°C au-dessous de pH 10,5 alors que la pepsine de poulet est stable au-dessous de pH 8,0. A pH 8,5 et au-delà, la pepsine de poulet est rapidement dénaturée.

Les résultats de l'étude de Pletschke *et al.* (1995a) montre que, les pepsines I et II d'autruche se sont avérées stables jusqu'à pH 7,6, et ont été rapidement inactivés au-dessus de pH 8,6. Et la pepsine A porcine s'est avérée inactivé au-dessus de pH 6,0. Le pepsinogène I d'autruche et le pepsinogène porcine se sont révélés stables, jusqu'à pH 9,5 et ont été rapidement inactivés au-dessus pH 10,6 dans le cas du pepsinogène porcine, et au-dessus de pH 11,1 pour le pepsinogène I d'autruche. Le pepsinogène II de l'autruche était plus stable sous des conditions alcalines et a été complètement inactivé, hormis au-dessus de pH 12,1. Les pepsines d'autruche ont montré une stabilité alcaline remarquable à pH 8,0, tandis que la pepsine porcine a rapidement perdu son activité, après 5 min à ce pH.

La pepsine des intestins de poulet présentait un profil de pH large (pH 1-4,0), avec un optimum compris entre 2,8 et 3,6. Au-delà du pH 4,0. L'activité de la pepsine a été rapidement diminuée avec une activité résiduelle de 10% à pH 4,6. Dans la plage de pH inférieure (1,5 à 2,5), elle présentait une activité relative de 40 à 90% (Jamdar & Harikumar 2016).

#### 2.4. Résultats de l'effet de divers effecteurs sur l'activité de la pepsine partitionnée

Divers ions métalliques (5 mM) ont été testés, pour leurs effets, sur l'activité protéolytique de la pepsine, la figure 61 illustre les résultats obtenus. Nous constatons que la pepsine récupérée était stable, en présence de nombreux ions métalliques, les pertes d'activité sont très négligeables ; elles sont de l'ordre de 4% pour le  $\text{CuSO}_4$  et le  $\text{KCl}$  et entre 7 et 9% pour  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MnSO}_4$  et  $\text{FeSO}_4$ , par contre aucune perte d'activité n'est constatée pour le  $\text{ZnSO}_4$ . Les seuls ions ayant un effet considérable sur l'activité de la pepsine sont le  $\text{CaCl}_2$  et le  $\text{MgCl}_2$ , avec une perte d'activité qui peut atteindre respectivement, 40 et 20%.



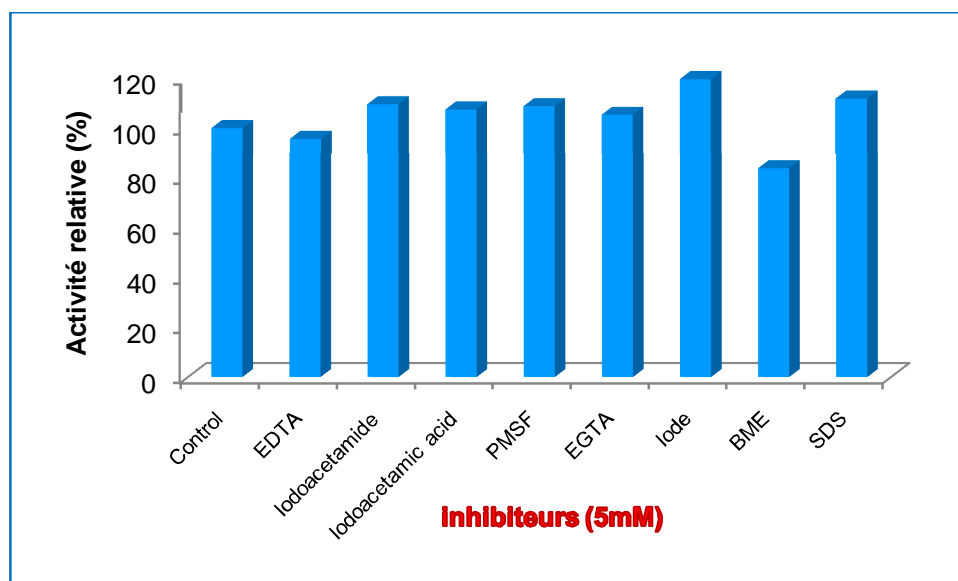
**Figure 61 :** Effet des ions sur l'activité et la stabilité de la pepsine de proventricules de poulet purifiée par le système TPP

Nalinanon et *al.* (2010) ont rapporté que le  $\text{NaCl}$  et  $\text{CaCl}_2$  n'ont aucun impact sur l'activité de la pepsine de l'estomac du thon blanc (*Thunnusalalunga*). Sanchez-Chiang et *al.* (1987) ont établi, que l'activité de la pepsine I du saumon adulte (*keta Oncorhynchus*) était augmentée, à approximativement 20%, en présence de 5 mM de  $\text{NaCl}$ . Alors que, l'activité de pepsine II n'était pas affectée. Ils ont suggéré que cela représenterait une réponse adaptative

de l'organisme au changement d'environnement de faible à haute salinité. Cependant, selon Gildberg *et al.* (1990), les activités des pepsines de la morue et du porc ont été fortement diminuées en présence de NaCl. Klomklao *et al.* (2007) ont également, trouvé que l'activité des deux pepsines A et B de *Coryphaenoides pectoralis* a augmenté, en présence de 5 mM CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> ou CoCl<sub>2</sub>. Selon Nalinanon *et al.* (2010), les sels ont probablement changé la conformation de la pepsine ou le substrat utilisé, ce qui entrave ou rehausse la liaison entre enzyme et substrat.

Jamdar & Harikumar (2016), ont rapporté que le Fe<sup>+3</sup> et Pb<sup>+2</sup> ont inactivé la pepsine à 100% et 78%, respectivement. Et que le Fe<sup>+3</sup>, à concentration inférieure (0.5 mM) a montré une inhibition à 67% de l'activité. Par contre, les autres ions métalliques (Hg<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> et Cu<sup>+2</sup>) n'avait pas d'effet, sur l'activité des enzymes, à concentration de 1mM.

L'influence de sept types d'inhibiteurs sur l'activité de la pepsine récupérée est illustrée dans la figure 62. L'enzyme a conservé son activité, avec une légère augmentation (5, 9, 10 et 12%), en présence d'EGTA, PMSF, iodoacetamide et SDS, respectivement et en présence d'iode. L'activité protéolytique de la pepsine est amplifiée, avec un gain d'activité allant jusqu'à 20%. Par contre, l'activité de l'enzyme, en présence d'EDTA est légèrement baissée, avec une perte de 4% de l'activité. Le β-mercaptaéthanol présente un effet inhibiteur sur l'activité de la pepsine étudiée car elle perd 16% de son activité. L'inhibition de l'activité de pepsine de poulet est due probablement à la rupture des ponts disulfure, déstabilisant la structure de cette enzyme.

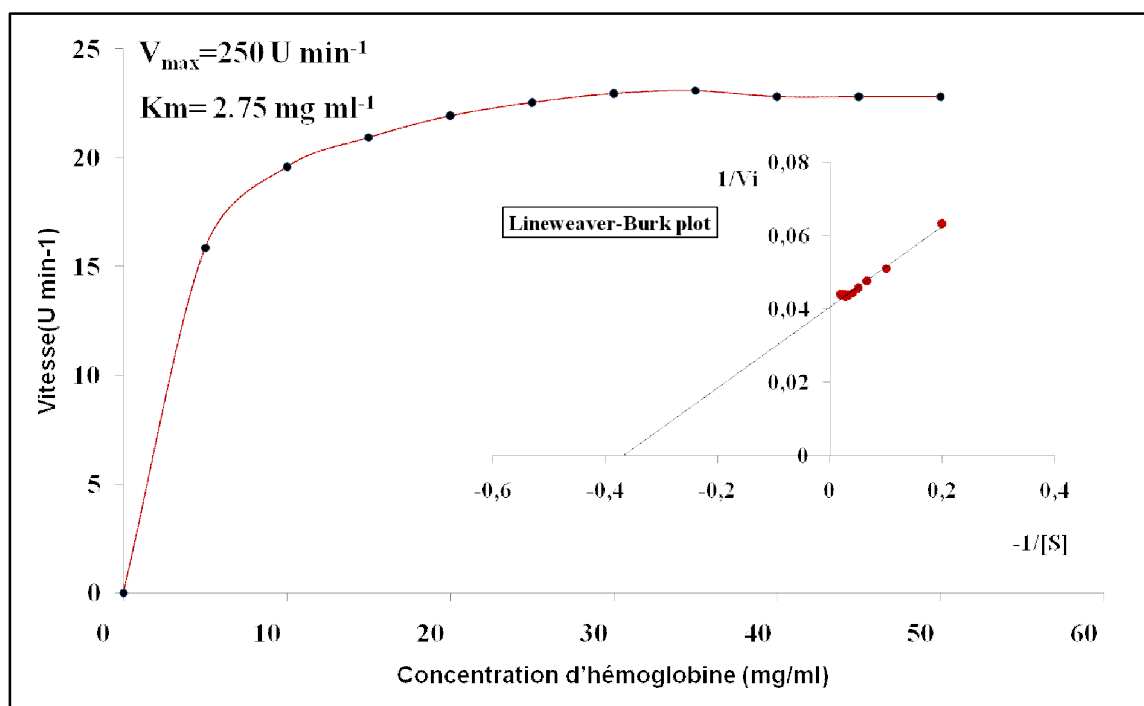


**Figure 62 :** Effet des inhibiteurs sur l'activité et la stabilité de la pepsine de proventricules de poulet purifiée par le système TPP

Contrairement à Nalinanon *et al.* (2010), qui ont noté que l'EDTA, un inhibiteur de protéases métalliques et l'inhibiteur spécifique des protéases à sérine, n'avait aucun effet sur l'activité de la pepsine de l'estomac du thon blanc (*Thunnusalunga*). Par contre, L'activité de la pepsine a été inhibée fortement par l' SDS. Tandis que, Jamdar & Harikumar (2016) ont rapporté que le PMSF inhibait 49% de l'activité de la pepsine.

## 2.5. Résultats des paramètres cinétiques de la pepsine purifiée

Les résultats illustrés dans la figure 63 montrent la cinétique Michaelis Menten et la représentation de Lineweaver-Burk, de l'activité de la pepsine de poulet étudiée. On remarque que la vitesse de la réaction augmente proportionnellement, à la concentration de substrat, jusqu'à atteindre le maximum ( $V_{max}=250Uml^{-1}$ ). Puis, à forte concentration de substrat, la vitesse n'augmente plus et se stabilise, c'est l'état de saturation de l'enzyme avec le substrat (hémoglobine). Et d'après la représentation de Lineweaver-Burk, on constate que la constante de Michaelis ( $K_m$ ), qui est la concentration du substrat pour laquelle, on observe une vitesse égale à la moitié de la vitesse maximum équivalente à 2,75 mg /ml. Cela s'explique, que la pepsine de poulet que nous avons, a une grande affinité pour l'hémoglobine, car plus le  $K_m$  est faible, plus l'activité enzymatique maximale est atteinte, pour un faible niveau de concentration de substrat donc l'affinité de l'enzyme pour le substrat est forte.

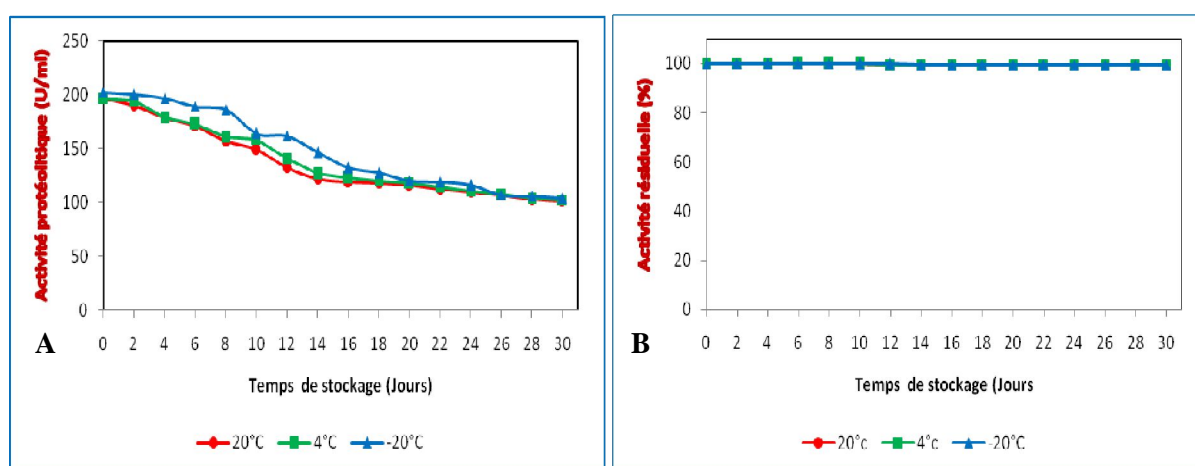


**Figure 63:** Cinétique (Courbes de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk) de la pepsine purifiée à partir de proventricules de poulet en utilisant le système TPP. Les données sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

Jamdar & Harikumar (2016), ont étudié les paramètres cinétiques de deux aspartiques protéases, la pepsine et la cathepsine D purifiées, à partir des intestins de poulet. Les auteurs ont rapporté que le  $K_m$  était de  $6,45 \mu\text{M}$  et  $22,7 \mu\text{M}$ , respectivement, pour la pepsine intestinale de poulet et la cathepsine D, tandis que les valeurs de  $V_{max}$  étaient de  $15,12 \mu\text{moles/min}$  et  $18,47 \mu\text{moles/min}$ , respectivement. L'activité spécifique de la cathepsine D purifiée était de  $19,6 \mu\text{moles/mg/min}$ , tandis que la pepsine présentait des valeurs, proches de 1,9 fois, plus élevées. Ceci indique que l'efficacité catalytique de la pepsine était supérieure à celle de la cathepsine D. Ainsi, cette dernière était souhaitable pour l'hydrolyse contrôlée du substrat.

## 2.6. Résultats de la stabilité au stockage à différentes températures

La pepsine de proventricules de poulet récupérée a été fractionnée, en différentes aliquotes en Tubes Eppendorf et stockés à trois températures ( $-20^\circ\text{C}$ ,  $4^\circ\text{C}$  et  $25^\circ\text{C}$ ), jusqu'à 30 jours, pour évaluer l'activité résiduelle basée sur l'activité protéolytique durant cette période (Figure 64). Une activité protéolytique élevée a été observée, quelle que soit la température de stockage, pendant les 30 jours. Elle oscille entre 200 à 130U/ml. Nous constatons que la pepsine purifiée préserve 100% de son activité initiale après un mois de stockage. La stabilité thermique de la pepsine de poulet est comparable à celle de la pepsine porcine (Sinkovits *et al.* 2007). Cependant, elle est nettement meilleure que la pepsine des organismes marins (Zhao *et al.* 2011). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la pepsine de proventricules de poulet récupérée peut être conservée, avec une durée de vie très longue.

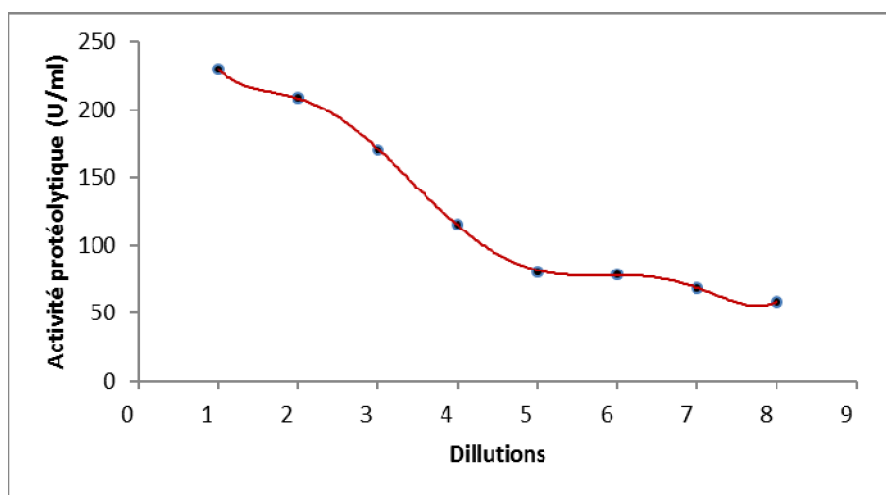


A) l'activité protéolytique et (B) activité résiduelle. Les aliquotes de la protéase, conservées à  $-20^\circ\text{C}$  (ligne bleu),  $4^\circ\text{C}$  (ligne verte) et  $25^\circ\text{C}$  (ligne rouge) ont été prélevées à différentes périodes et les activités protéolytiques avec hémoglobine, comme substrat ont été déterminées.

**Figure 64:** Effet de la température de stockage sur l'activité protéolytique de la pepsine de proventricules de poulet purifiée par le système TPP exprimé par, (

### 3. Application de la pepsine sur la viande de poules

Dans cette étude nous allons, pour la première fois, appliquer une aspartique protéase d'origine animale: la pepsine, sur la viande afin d'étudier son effet sur la viande de poule pondeuse et de comparer l'impact des différents traitements d'attendrissement artificiel enzymatique (marinade, pulvérisation et injection) sur la texture de la viande. Pour cela, nous avons utilisé la pepsine que nous avons purifiée par le système TPP à 100U/ml. Afin d'atteindre cette activité spécifique, nous avons effectué une gamme de dilution de 1/2 jusqu'à 1/40, cependant, une valeur n'a été obtenue qu'à partir de la dilution 1/8. Après test d'activité protéolytique par solution d'hémoglobine 2%, nous avons obtenu la courbe suivante (Figure 65).



**Figure 65 :** Courbe de l'effet de la dilution sur l'activité protéolytique de pepsine purifiée (1 : 1/8, 2 : 1/10, 3 : 1/16, 4 : 1/30, 5 : 1/31, 6 : 1/32, 7 : 1.35 et 8 : 1.40)

D'après l'allure de la courbe, nous pouvons déduire que plus, la dilution est en état d'avancement, plus l'activité protéolytique diminue. L'objectif de ce test est de savoir quelle dilution utilisée, pour atteindre une concentration de (100U/ml) de l'enzyme purifiée. Dans notre étude, la dilution 1/30 correspond à l'activité enzymatique de 100U/ml.

#### 3.1. Effet de traitement d'attendrissement sur les différents paramètres étudiés

Afin de caractériser les effets de la pepsine purifiée, sur la texture de la viande de poulet, une série d'analyses physico-chimiques a été effectuée, à savoir le pH, l'indice de fragmentation myofibrillaire, la capacité de rétention d'eau et le pourcentage d'eau reléguée, ainsi que les pertes à la cuisson. Le tableau 14 illustre les moyennes  $\pm$  de l'écart type obtenues.

**Tableau 14** : Analyse de variance (moyennes  $\pm$  écarts-types) sur les paramètres mécaniques et biochimiques des trois muscles étudiés

Paramètres	Témoin aucun traitement	Injection		Marinade		Pulvérisation	
		Témoin	Pepsine	Témoin	Pepsine	Témoin	Pepsine
pH	5,63 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	5,67 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	5,66 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	5,65 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	5,66 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	5,60 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	5,64 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
CRE	36,91 $\pm$ 5.34 <sup>a</sup>	33,52 $\pm$ 6.23 <sup>a</sup>	34,93 $\pm$ 5.04 <sup>a</sup>	16,16 $\pm$ 3.03 <sup>c</sup>	16,58 $\pm$ 2.02 <sup>c</sup>	30.73 $\pm$ 3.65 <sup>ab</sup>	25.41 $\pm$ 3.56 <sup>b</sup>
PER	29,87 $\pm$ 2.27 <sup>c</sup>	28,59 $\pm$ 2.52 <sup>c</sup>	26.73 $\pm$ 2.54 <sup>c</sup>	41,18 $\pm$ 3.07 <sup>a</sup>	39,61 $\pm$ 2.98 <sup>a</sup>	34,27 $\pm$ 3.52 <sup>a</sup>	36,97 $\pm$ 2.68 <sup>ab</sup>
PC	31.67 $\pm$ 2.53 <sup>b</sup>	29,72 $\pm$ 2.67 <sup>b</sup>	29,84 $\pm$ 3.78 <sup>b</sup>	43,54 $\pm$ 2.56 <sup>a</sup>	43,23 $\pm$ 2.67 <sup>a</sup>	33,88 $\pm$ 4.48 <sup>b</sup>	33,31 $\pm$ 3.73 <sup>b</sup>
IFM	22.51 $\pm$ 4.79 <sup>a</sup>	26.25 $\pm$ 6.69 <sup>a</sup>	24.55 $\pm$ 4.85 <sup>a</sup>	25.80 $\pm$ 7.31 <sup>a</sup>	23.14 $\pm$ 3.17 <sup>a</sup>	27.88 $\pm$ 9.35 <sup>a</sup>	35.03 $\pm$ 12.90 <sup>a</sup>

CRE: Capacité de rétention d'eau ; PER: pertes en eaux ; PC: Perte à la cuisson ; IFM: Indice de fragmentation myofibrillaire.

Les valeurs sur la même ligne, avec différentes lettres (a,b,c,d et e) sont différentes significativement ( $p < 0.0001$ )



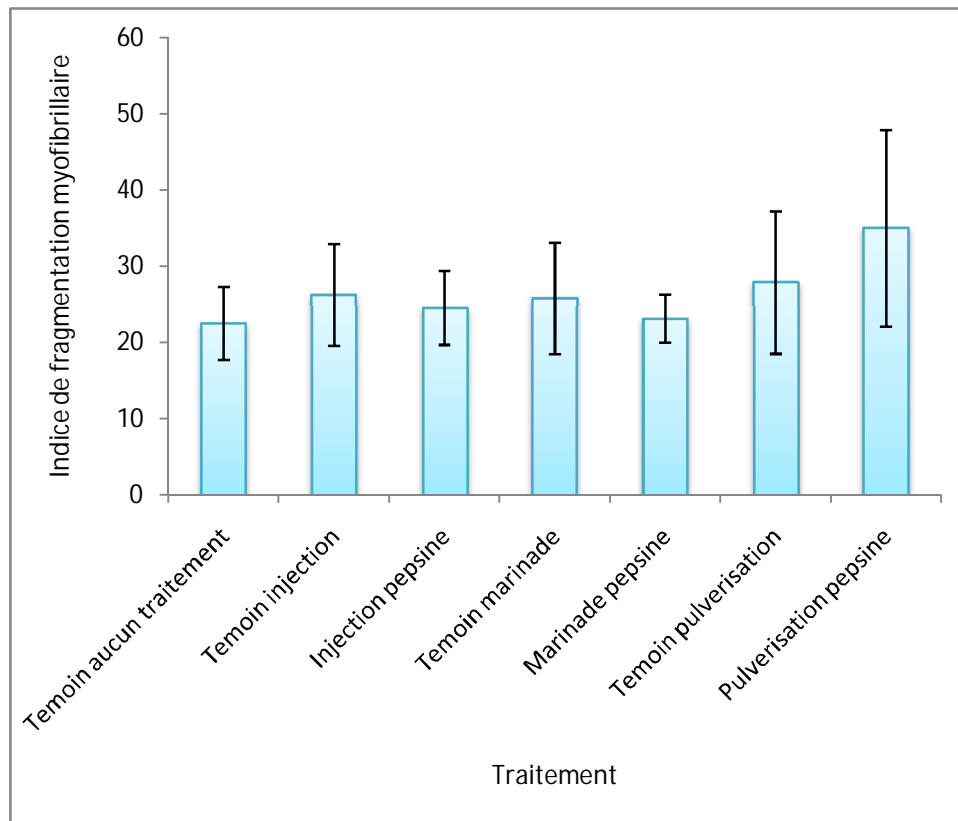
### 3.1.1. Effet sur le pH

Les traitements statistiques par l'analyse de variance ont un facteur, pour l'effet traitement d'attendrissement sur la texture. Ils ont montré qu'aucune différence n'a été décelée, pour le pH ( $P < 0.05$ ), comme indiqué, dans le tableau 14. Cela montre que l'enzyme n'a pas d'effet sur le pH de l'enzyme, ce qui semble être un bon facteur son application en industrie de viande. Ces résultats sont en accord, avec ce que nous avons rapportés sur la papaïne.

### 3.1.2. Effet sur l'indice de fragmentation myofibrillaire

L'attendrissement de la viande est lié aux propriétés structurales et biochimiques des fibres musculaires squelettiques, particulièrement à ceux des myofibrilles et des filaments intermédiaires. On observe au cours de la maturation, des modifications, au niveau de la strie Z, de la jonction du disque I et de la strie Z. Les stries Z deviennent de plus en plus diffuses et peu à peu apparaissent des zones de rupture à la jonction filaments fins/ stries Z. Ces modifications se traduisent par une augmentation de l'indice de fragmentation myofibrillaire (IFM). L'homogénéisation d'un échantillon mûré conduit à la libération de fragments plus courts, constitués d'un nombre de sarcomères plus réduits. De ceci, il ressort que l'augmentation de l'IFM, au cours de la maturation est proportionnelle à l'augmentation de la tendreté. Cela signifie que la fragmentation des myofibrilles est l'un des mécanismes responsables de l'attendrissement *post mortem* de la viande (Candek-Potokar *et al.* 1999; Devine 2004).

La figure 66 représente l'impact des traitements d'attendrissement enzymatique par la pepsine (100U/ml), sur l'indice de fragmentation myofibrillaire (IFM) de muscle *Pectoral* de huit poulets. Nos résultats (Tableau 14 ; Figure 66) établissent qu'aucune différence significative ( $P < 0.0001$ ) n'est enregistrée pour ce paramètre, entre les différents traitements. Nous observons, également, qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents témoins à savoir, témoin aucun traitement, témoin injection et témoin marinade avec le traitement par la pepsine. Malgré une comparaison entre les différents traitements, nous remarquons que la pulvérisation a donné le plus haut indice de fragmentation myofibrillaire.

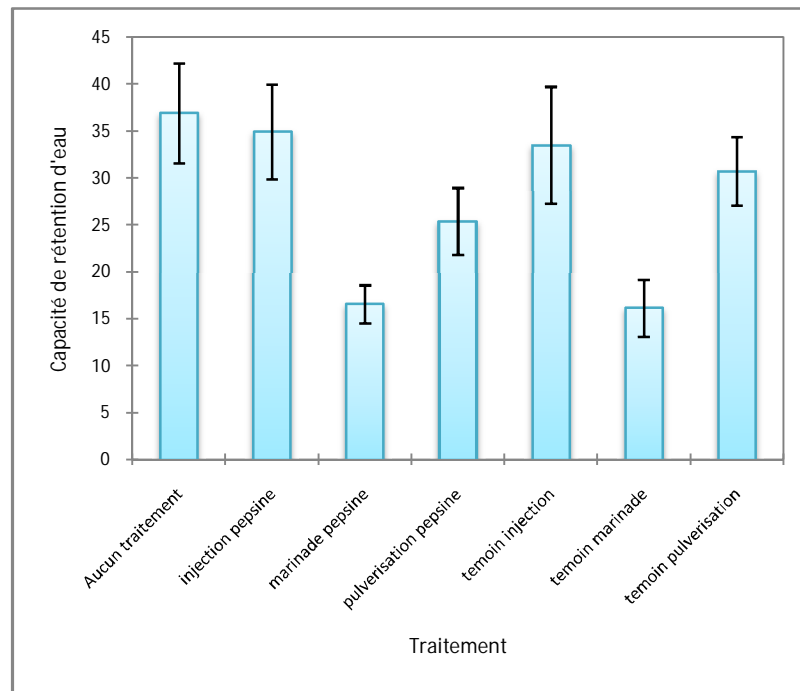


**Figure 66 :** Impact des traitements d'attendrissement enzymatique par la pepsine (100U/ml), sur l'indice de fragmentation myofibrillaire sur le muscle *pectoral* du poulet.

Veiseth et *al.* (2001) ont considéré que le phénomène de la fragmentation des myofibrilles est un indicateur utile de la maturation de la viande. La fragmentation des protéines myofibrillaires peut être estimée par différentes méthodes telles que : les composants structuraux du muscle pendant le stockage ; la protéolyse des protéines myofibrillaires, induisant l'affaiblissement des myofibrilles qui est à l'origine de la dégradation des protéines de structure et des liaisons intermoléculaires sous l'action d'enzymes endogènes ; l'attendrissement de la viande (Koochmaraie 1994; Taylor *et al.* 1995) et l'amélioration de son goût et son arôme (Smith *et al.* 1978; Nishimura *et al.* 1988).

### 3.1.3. Effet sur capacité de rétention d'eau et le pourcentage d'eau reléguée

L'autre paramètre investigué dans notre étude est le pouvoir de rétention d'eau. La capacité de rétention des protéines myofibrillaires est une caractéristique importante de la qualité de la viande car elle influence sa valeur nutritionnelle, son apparence, et sa palatabilité (Kadim *et al.* 2006). D'après les données de la figure 67, en comparant les valeurs de la capacité de rétention d'eau, nous pouvons constater une différence significative entre les différents traitements effectués.

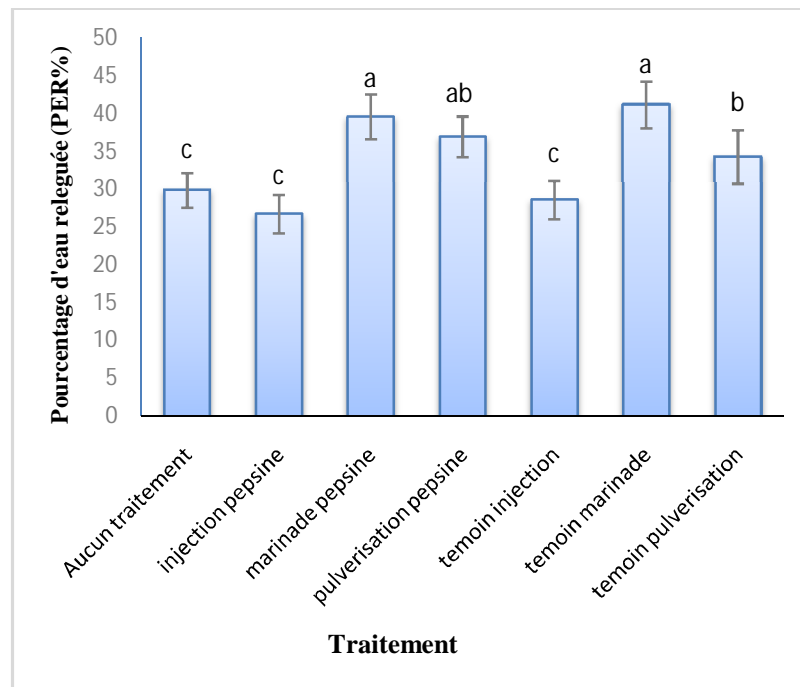


**Figure 67 :** Impact des traitements d'attendrissement enzymatique par la pepsine (100U/ml), sur la capacité de rétention d'eau (%) sur le muscle pectorale du poulet.

Nous remarquons qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents témoins, hormis le témoin marinade. Aussi, nous notons, que les traitements de pulvérisation, d'injection et de marinade ne présentent pas de différences significatives, par rapport à leurs témoins. Par contre, il y a une grande différence significative entre la capacité de rétention d'eau, du témoin aucun traitement et les traitements par marinade. Ce dernier représente la plus faible valeur obtenue (16.58%). Cela est dû au fait que, la marinade de la viande, quelle que soit la solution, fragilise la structure myofibrillaire de la viande. Cela est en accord avec les résultats rapportés par Gao et *al.* (2011), qui ont trouvé que la capacité de rétention d'eau ne diffère pas significativement entre le témoin et le traitement par marinade.

En raison de l'hydrolyse enzymatique partielle des protéines de la viande, une plus grande affinité pour les molécules d'eau est établie. L'hydrophilicité augmentée est déterminée par de nombreux groupes hydrophiles (hydroxy-OH, carboxylique-COO-amino-NH<sub>2</sub>, thiolique -SH, amide -CONH<sub>2</sub>), qui sont libérés, à la surface de la molécule protéique. Par conséquent, lors du traitement par la pepsine, le taux de rétention d'eau est élevé pour les huit muscles, pour cause un taux élevé de l'hydrolyse des protéines de la viande, respectivement par la gélatinisation des échantillons et la libération des peptides terminaux et des acides aminés.

Les teneurs en eau reléguée plus ou moins importantes peuvent être liées, à la composition de la viande de poulet. Les valeurs de pourcentage d'eau reléguée (Figure 68) qui est inverse, à la capacité de rétention d'eau, viennent confirmer nos conclusions.

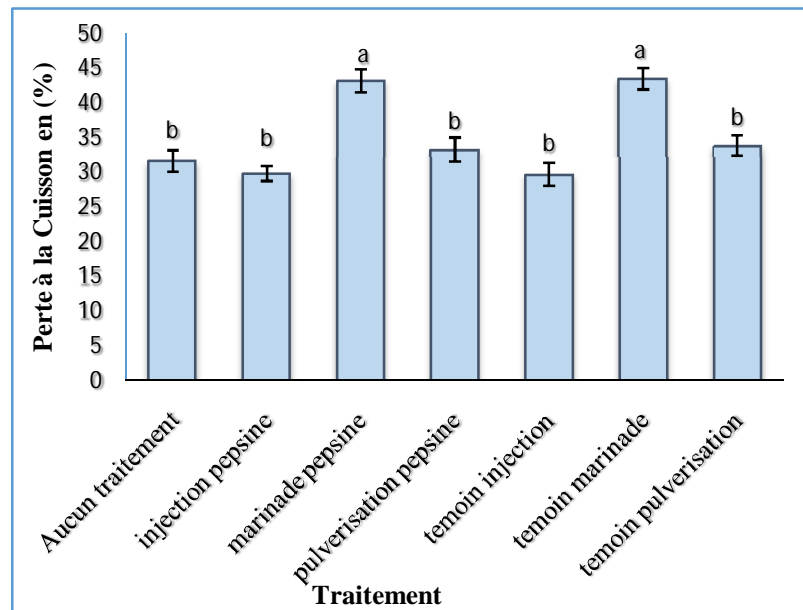


**Figure 68** : Impact des traitements d'attendrissement enzymatique par la pepsine (100U/ml) sur les pertes en eau reléguée (%) sur le muscle pectoral du poulet

#### 3.1.4. Effet sur les pertes à la cuisson

Les pertes en eau à la cuisson représentent des paramètres technologiques et économiques très importants (Lawrie & Ledward 2006), parce que la préservation d'eau d'une viande est un facteur important pour la valeur marchande du produit. Le contenu d'eau et sa distribution dans la viande cuite influencent d'une manière considérable les caractéristiques sensorielles comme : la dureté, la jutosité, la fermeté et/ou l'apparence, les qualités nutritionnelles (biodisponibilité de micronutriments comme les minéraux essentiels (fer et zinc) et ainsi que les vitamines (notamment du groupe B) du produit final (Yu *et al.* 2005).

Les résultats moyens de la caractérisation des pertes en eau à la cuisson dans le muscle *pectoral* de huit poulets sont illustrés dans la figure 69.



**Figure 69** : Impact des traitements d'attendrissement enzymatique par la pepsine (100U/ml) sur la perte à la cuisson du muscle pectoral du poulet

Nos résultats du pourcentage des pertes en eau à la cuisson montrent qu'il y'a une différence significative entre les échantillons traitées par la marinade et le reste des échantillons. Le traitement enzymatique par marinade présente le pourcentage le plus élevé 43,54 %, suivi par le témoin marinade avec une valeur de 43,22 %. Nous remarquons aussi qu'il n'y a pas de différence significative entre les autres traitements, à savoir, témoin aucun traitement, injection et pulvérisation. Ces résultats, sur une viande cuite, viennent confirmer les résultats, pour la capacité de rétention d'eau et les pertes en eau reléguée appliqué sur une viande crue.

Cela s'exprime par l'équilibre entre la conversion du collagène en gélatine et de la coagulation des fibres musculaires qui se diffère d'un muscle à un autre, c'est-à-dire, durant la cuisson. Les protéines contenues dans les fibres polymérisent et se resserrent. Les liaisons chimiques qui retiennent les molécules de collagène ensemble se défont sous l'effet de la chaleur et de l'humidité, ce qui permet de les solubiliser, autrement, de les transformer en gélatine, facile à mastiquer.

Donc, les pertes en jus sont causées par le rétrécissement de l'endomysium (le collagène qui entoure chacune des fibres musculaires). Lorsque la viande atteint une température interne d'environ 80°C, la perte de jus s'accroît, car à cette température, le périmysium (collagène qui gaine les faisceaux musculaires) se contracte à son tour et exerce une pression additionnelle sur les cellules, poussant ces dernières à libérer leurs eaux (Culioli 1994).

### 3.1.5. Solubilité des protéines

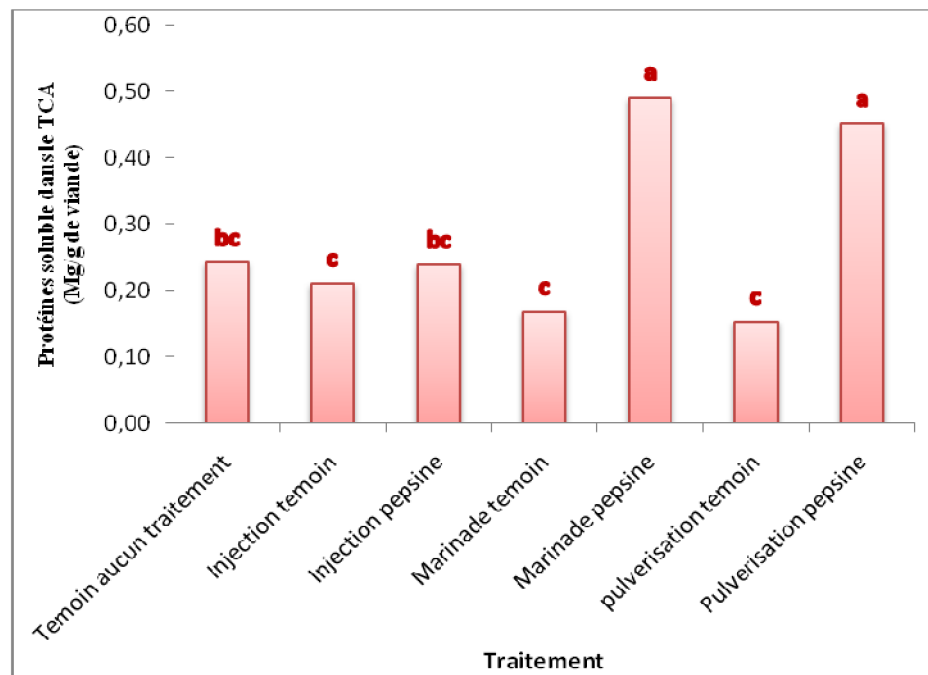
Les moyennes  $\pm$  écarts types de la composition en protéines des échantillons traités par la pepsine avec les techniques d'attendrissement enzymatique artificiel sont présentées, dans le tableau 15.

**Tableau 15 :** Effet du traitement d'attendrissement par la pepsine sur les protéines solubles dans le TCA, l'eau et le sel.

Paramètres	Protéines solubles dans (moyennes $\pm$ écarts types)		
	TCA	Eau	Sel
	(mg/g de viande)	(mg/g de viande)	(mg/g de viande)
Témoin aucun traitement	0,24 $\pm$ 0.21	16.70 $\pm$ 4.79	16.36 $\pm$ 1.11
Injection	Témoin	0,21 $\pm$ 0.20	14.25 $\pm$ 0.92
	Pepsine	0,24 $\pm$ 0.07	14.30 $\pm$ 0.33
Marinade	Témoin	0,17 $\pm$ 0.11	8.99 $\pm$ 1.37
	Pepsine	0,49 $\pm$ 0.18	7.23 $\pm$ 2.24
Pulvérisation	Témoin	0,15 $\pm$ 0.09	13.10 $\pm$ 0.98
	Pepsine	0,45 $\pm$ 0.11	12.34 $\pm$ 0.82

Les résultats montrent que la teneur en protéines solubles dans le TCA a augmenté, de manière significative ( $P < 0,05$ ), pour les deux échantillons traités par la solution de pepsine en marinade et pulvérisation par rapport au contrôle, avec une valeur supérieure pour la marinade avec pepsine (Figure 70). On remarque aussi qu'il n'y a pas de différence significative entre les témoins, à savoir ; aucun traitement, marinade, pulvérisation et injection et les échantillons traités par injection de pepsine. Ces résultats indiquent l'activité hydrolysante de la pepsine sur les protéines musculaires, qui est également reflétée dans l'analyse SDS-PAGE.

Selon Rawdkuen *et al.* (2012), l'augmentation de la teneur en peptides solubles, dans le TCA, dans les échantillons traités a pour cause, une augmentation de la perméabilité du la structures myofibrillaire, entraînant la désintégration puis la libération des peptides.



**Figure 70:** Teneur en protéines solubles du TCA dans les échantillons de viande traités et non traités, exprimée en mg par g de viande. Les différentes lettres (a,b,c) indiquent que les valeurs sont différentes significativement ( $p < 0,005$ ).

Plusieurs études ont rapporté des résultats comparables à nos résultats. En effet, Chaurasiya *et al.* (2015) rapportent que la teneur en protéines solubles dans le TCA a augmenté (jusqu'à 5 fois), de manière significative ( $P < 0,05$ ) pour les échantillons traités par la bromélaïne par rapport au témoin. Ketnawa & Rawdkuen (2011) ont également signalé une augmentation de 27% de peptides solubles, dans le TCA, lorsque 20% (p / p de viande) de la teneur en bromélaïne a été utilisée pour le traitement des muscles du poulet, du bœuf et du calmar. Les auteurs ont montré que la teneur élevée en peptides solubles dans le TCA dans les échantillons traités par la bromélaïne était due à une plus grande hydrolyse des protéines musculaires.

L'étude de Rawdkuen *et al.* (2012) a montré que la plus faible teneur en peptides solubles dans le TCA a été retrouvée dans l'échantillon témoin de poisson-chat géant (0,90), suivi du bœuf (2,09), du porc (2,90) et du poulet (4,13), respectivement. Lorsque l'unité d'activité enzymatique était augmentée, la teneur en peptides solubles, dans le TCA dans l'ensemble des échantillons traité par les plantes protéases (Calotropis, papaïne et bromélaïne) a également augmenté ( $p < 0,05$ ).

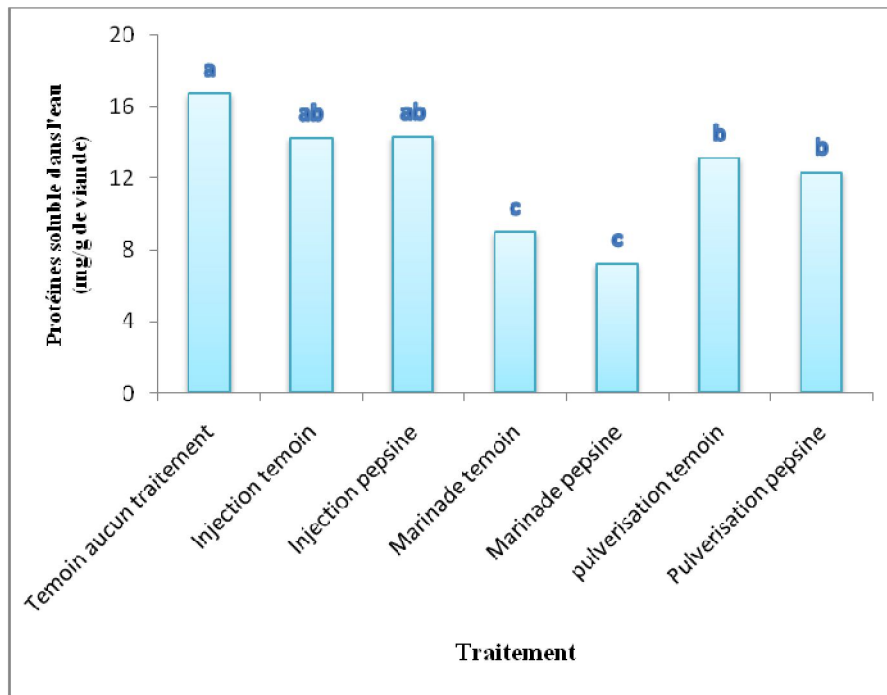
Les protéines solubles dans l'eau et le sel ont été analysées pour vérifier le degré de protéolyse des protéines de viande par la pepsine. Ces traitements ont révélé que les techniques d'attendrissement ont plus d'impact sur les protéines solubles dans l'eau que sur les protéines solubles dans le sel. (Figure 71 et 72). Cela est en accord avec, le rapport établi par Chaurasiya *et al.* (2015) qui ont appliqué la bromélaïne extraite par inversion micellaire sur la viande.

Nous remarquons des différences significatives dans les valeurs de protéines solubles dans l'eau entre les différentes techniques d'attendrissement. Des valeurs faibles ont été obtenues pour les échantillons traités par marinade, traité ou non par l'enzyme. Ces valeurs sont différentes significativement par rapport au témoin non traité et les autres techniques d'attendrissement artificiel. Cela est dû probablement aux pertes causées par l'immersion en solution. En effet, les protéines solubles dans l'eau diffusent, facilement dans la solution de marinade.

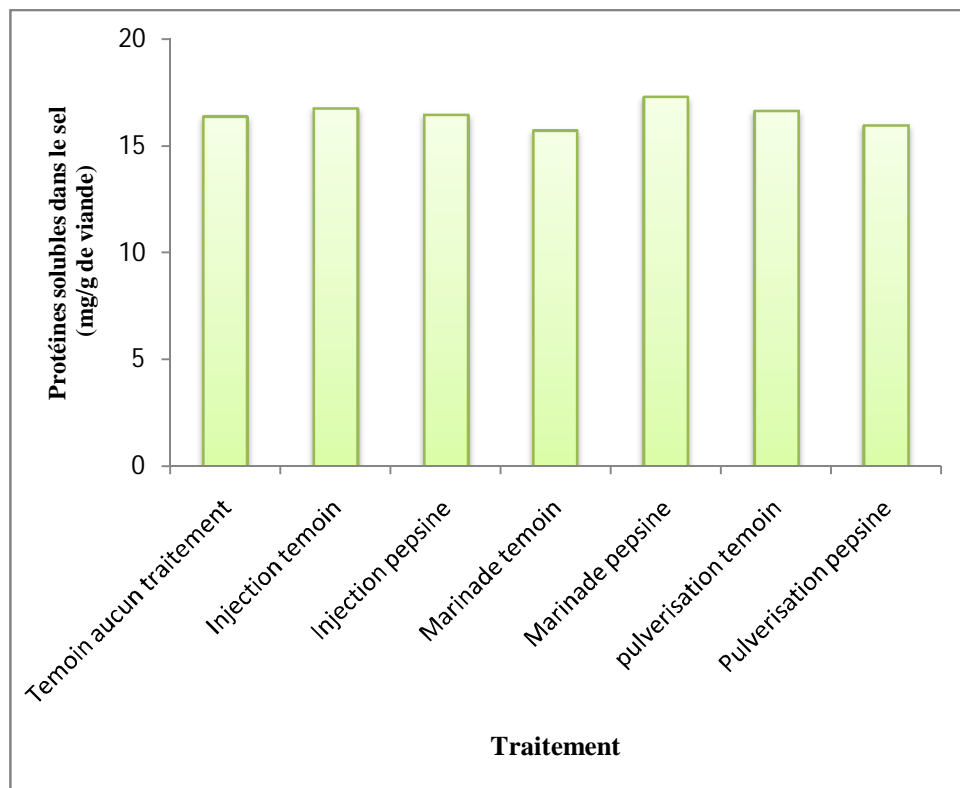
Les protéines solubles dans le sel ont été utilisées comme indicateur de l'hydrolyse des protéines myofibrillaires. Les résultats, présentés dans la figure 72, indiquent qu'aucune différence significative n'est observée, entre les différents échantillons traités ou non avec la pepsine. A partir des résultats obtenus, nous pouvons conclure que la solution de 100U/ml de pepsine de poulet n'avait pas d'effet sur les protéines solubles dans l'eau.

Contrairement à ce qui a été rapporté par Chaurasiya *et al.* (2015), pour la bromélaïne. Les auteurs ont rapporté que la bromélaïne purifiée avait un effet significatif ( $P < 0,05$ ), sur les protéines solubles dans l'eau et dans le sel qui était plus élevée que celui du témoin. Sullivan & Calkins (2010) ont signalé une variation du contenu des protéines solubles dans l'eau et dans le sel, lorsque la viande a été traitée avec différentes protéases.





**Figure 71:** Teneur en protéines solubles dans l'eau dans les échantillons de viande traités et non traités, exprimée en mg par g de viande. Les différentes lettres (a,b,c) indiquent que les valeurs sont différentes significativement ( $p < 0.005$ ).

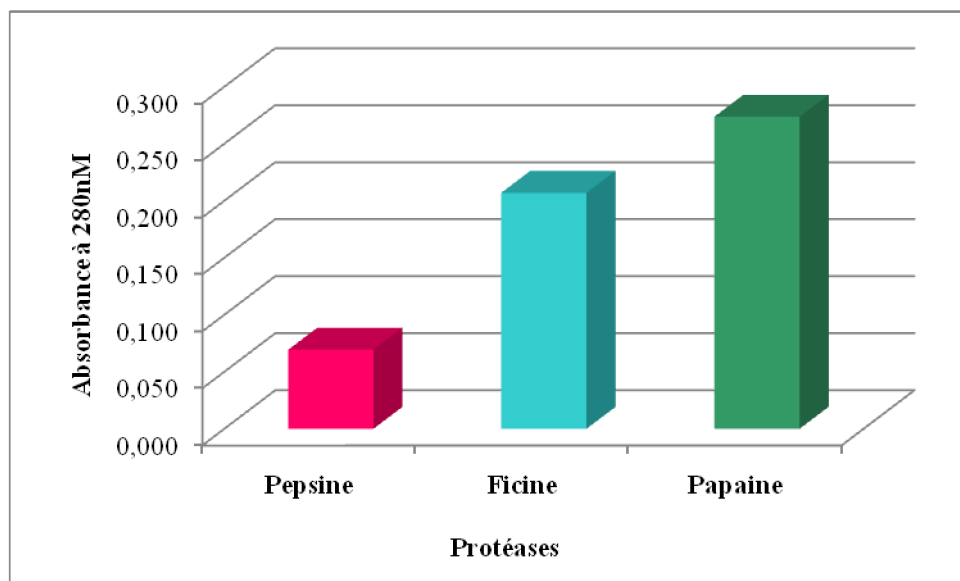


**Figure 72:** Teneur en protéines solubles dans le sel dans les échantillons de viande traités et non traités, exprimée en mg par g de viande.

### 3.1.6. Hydrolyse des protéines myofibrillaires

La figure 73 représente le résultat de l'hydrolyse des protéines myofibrillaires, par les trois protéases purifiées par le système de répartition en trois phases. Nous remarquons que les trois protéases étudiées ont un effet considérable sur l'hydrolyse des protéines myofibrillaires. Cependant, l'activité des cystéines protéases est plus élevée que celle de la pepsine qui est une aspartique protéase.

La papaïne est une endopeptidase à faible spécificité de substrat et capable de catalyser l'hydrolyse d'une large gamme de liaisons (peptide, amide, ester, thiol ester et les liaisons thiono esters) (Schwimmer 1981). Cela justifie son action élevée, sur les protéines myofibrillaires Alors que la pepsine à une forte affinité pour le substrat, fait que son action soit contrôlée. La dégradation des protéines de viande par la pepsine est similaire aux effets des aspartiques protéases isolés d'*Aspergillus oryzae* (Ashie *et al.* 2002) et d'une élastase alcaline isolée de l'espèce *Bacillus* (Takagi *et al.*1992).



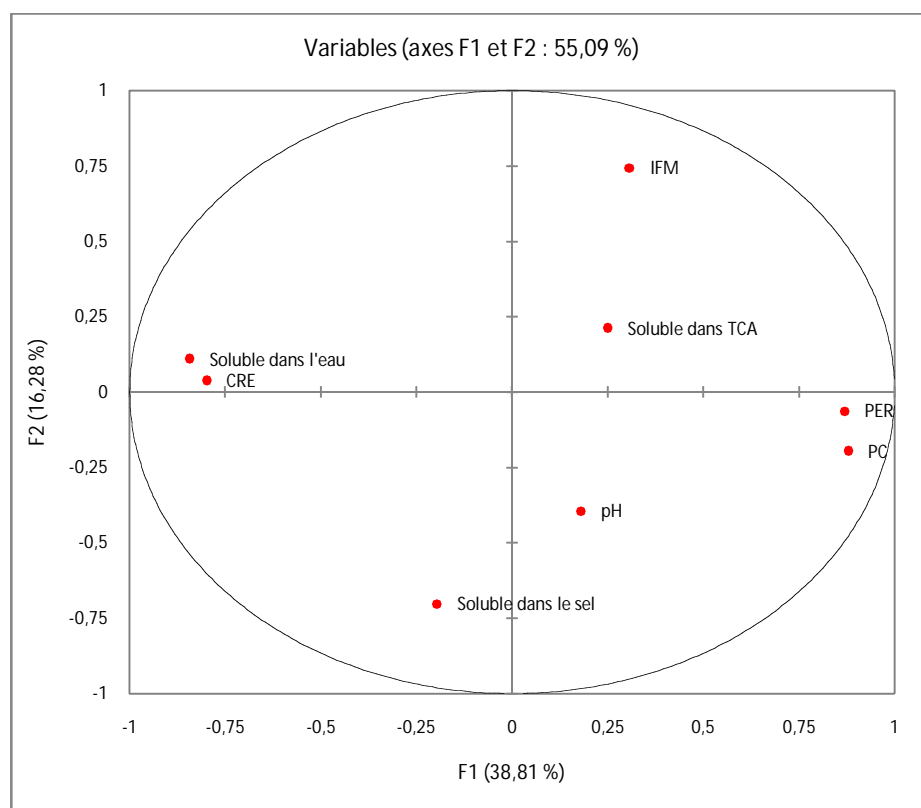
**Figure 73 :** Effets relatifs de la pepsine et la papaïne purifiées par le système TPP sur les protéines myofibrillaires

### 3.1.7. Visualisation des relations entre les paramètres étudiés

Les analyses en composantes principales sont présentées dans la figure 74. Les deux premiers axes expliquent 55,09% de la variabilité. La première composante expliquant 38,81% de variabilité se caractérise principalement par le pourcentage d'eau reléguée, les pertes en eau à la cuisson, l'indice de fragmentation myofibrillaire, le pH et les protéines solubles dans le TCA (le côté positif), la capacité de rétention d'eau et les protéines solubles

dans l'eau et dans le sel (le côté négatif). La deuxième composante expliquant 16,28% de la variabilité était principalement caractérisée par l'indice de fragmentation myofibrillaire, les protéines solubles dans le TCA sur le côté positif et le pH, et les protéines solubles dans le sel sur le côté négatif.

Les résultats obtenus montrent l'étroite relation positive entre la capacité de rétention d'eau et les protéines solubles dans l'eau, ainsi que l'étroite relation négative entre ces derniers et le pourcentage en eau reléguée et les pertes en eau à la cuisson. La relation positive est caractérisée entre l'indice de fragmentation myofibrillaire, les protéines solubles dans le TCA, la relation entre le pH et les protéines solubles dans le sel.

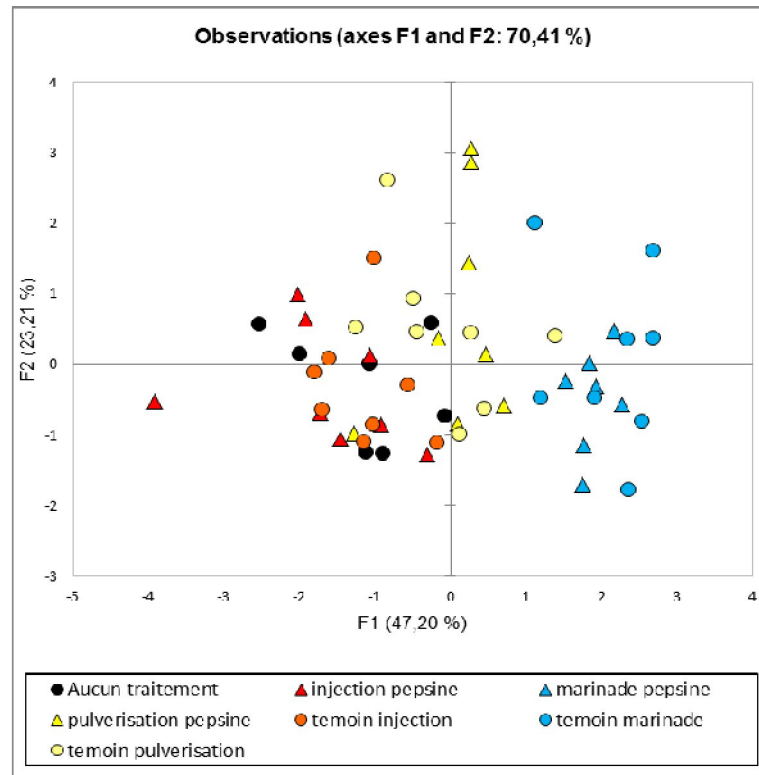


CRE: Capacité de rétention d'eau ; PER: pertes en eaux ; PC: Perte à la cuisson ; IFM: Indice de fragmentation myofibrillaire

**Figure 74:** Analyse en composantes principales (PC) : Projection des variables étudiées dans les deux premiers axes.

La distribution graphique des échantillons traités par les techniques d'attendrissement, sur la base de l'ensemble des variables mesurées est présentée dans la figure 75. Les échantillons traités par marinade (en bleu) sont groupés dans le côté droit et ceux traités par injection (en rouge), dans le côté gauche, et ceux traités par pulvérisation (en jaune) au milieu. Nous constatons que l'analyse en composantes principale sa bien discriminé, les trois traitements en fonction des propriétés musculaires étudiées. Par contre, aucune discrimination

n'a été signalée entre le traitement avec ou sans la pepsine. Aussi, les échantillons témoins qui n'ont subi aucun traitement ne se distinguent pas des échantillons traités par injection (Figure 75).



**Figure 75:** Projection des données de qualité de la viande des sept traitements étudiés dans le plan défini par les deux composantes principales

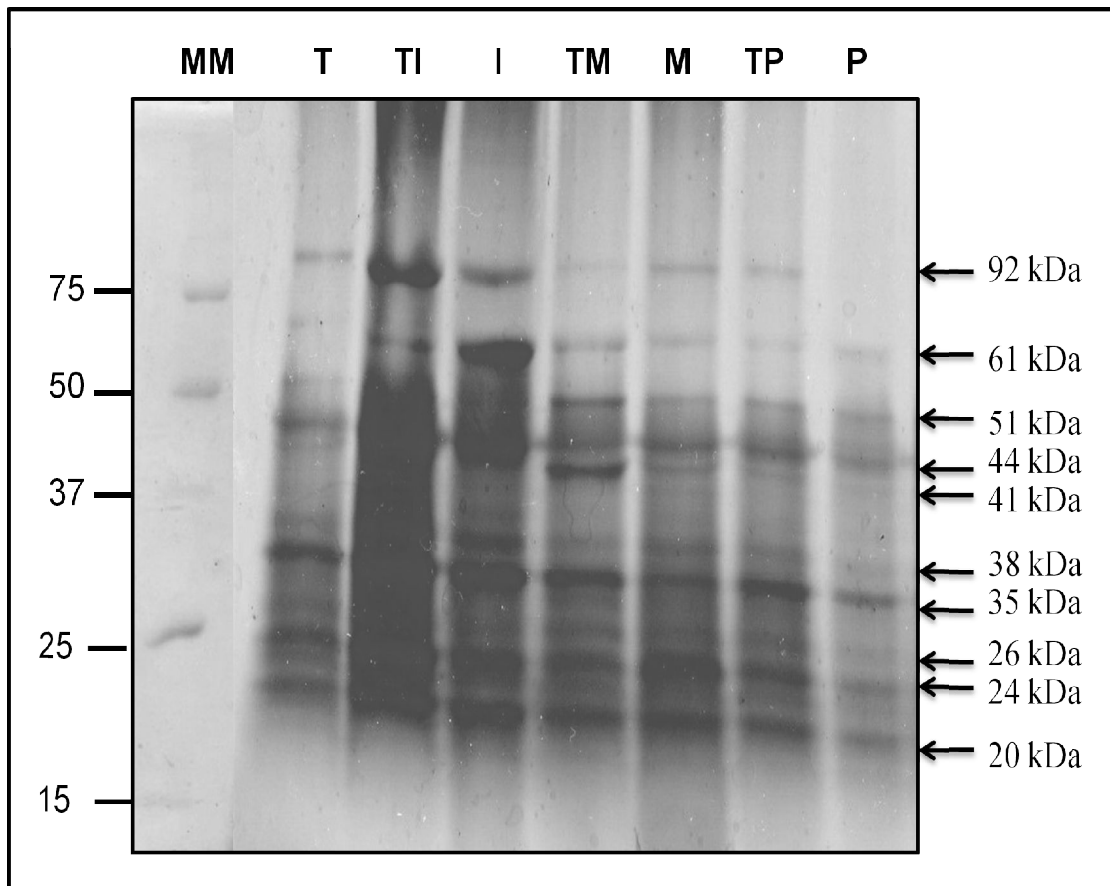
### 3.2. Profil électrophorétique de la dégradation des protéines myofibrillaires

La caractérisation électrophorétiques des protéines myofibrillaires permet d'avoir une appréciation globale des protéines présentes dans le muscle pectoral des poules pondeuses de réforme et ainsi de visualiser les modifications que subit les protéines musculaires, après traitement avec la pepsine de proventricules de poulet.

La séparation des protéines myofibrillaires, sur gel de polyacrylamide à 12% en présence de SDS, a permis de séparer les chaînes peptidiques selon leurs poids moléculaires. La figure 76 présente le profil électrophorétique des protéines myofibrillaires, après traitement enzymatique par différents méthodes.

Nous avons réalisé la quantification de 10 bandes protéiques présentes sur les gels d'électrophorèse selon leurs poids moléculaires (92, 61, 51, 44, 41, 38, 35, 26,24 et 20 kDa), mais d'intensités différentes selon la méthode du traitement effectuée. La bande de 92 kDa

représente probablement l'I-actinine (Bárány *et al.* 1995). L'I-actinine est libérée non dégradée de la ligne Z, durant la maturation à des températures de réfrigération. Cependant, durant la maturation à des températures élevées (>25°C), une dégradation substantielle de cette protéine prend place (Roncalés *et al.* 1995).



(MM :protéines de référence ; T : témoin, TI : témoin injection, I : injection pepsine, TM : témoin marinade, M : marinade pepsine, TP : témoin pulvérisation, P : pulvérisation pepsine).

**Figure 76 :** Gel de glycine SDS-PAGE des protéines myofibrillaires du muscle pectoral de poulet après traitement enzymatique par différentes méthodes

La protéine à 61 kDa représente probablement la desmine (Bond & Warner 2007; Kemp & Parr 2008). Protéine principale des filaments intermédiaires, elle encercle le disque Z et attache les myofibrilles entre elles (Bartoli & Richard 2005). Elle maintient aussi, la continuité des sarcomères (Got 1997). La protéine à 51 kDa probablement la protéine I, qui est une protéine du cytosquelette, se localise dans les filaments épais du sarcomère (Roussilhes 1994). La protéine à 44 kDa représente probablement l'actine (Bárány *et al.* 1995). Et la protéine à 41 kDa représente probablement la tropomoduline (Puolanne & Halonen 2010).

Les bandes de 38 et 35 kDa représentent probablement la troponine T et la tropomyosine respectivement (Ho *et al.* 1994; Bárány *et al.* 1995; Kemp & Parr 2008). Ces

dernières jouent un rôle central dans la régulation contractile (Ho *et al.* 1994). Les bandes de 26, 24 et 20 kDa, correspondent probablement aux chaînes légères de myosine I, la troponine I et la troponine C respectivement (Bárány *et al.* 1995). La troponine I régule la contraction musculaire et inhibe l'activité ATPasique de l'actomyosine. La troponine C régule, elle aussi, la contraction musculaire et fixe le calcium, ces deux protéines se localisent dans les filaments fins du myofibrille (Got 1997).

Nos résultats démontrent la réduction du nombre et de l'intensité de certaines bandes protéiques, lors de l'ajout de l'enzyme, elles ont été totalement dégradées, voire même disparues. En effet, les bandes de poids moléculaires 20 et 24 KDa présentent la même intensité, exceptée au niveau du traitement par pulvérisation, d'où un léger éclaircissement. La bande de 26KDa est très présente dans tous les témoins (témoin aucun traitement, témoin injection, témoin marinade et témoin pulvérisation) mais, elle a tendance à diminuer, après traitement enzymatique par marinade et pulvérisation. De même, pour la bande à 38KDa qui est intense dans le traitement par injection et claire dans les autres méthodes de traitement, notamment, dans le traitement par pulvérisation où elle est très claire. On remarque que la bande au poids moléculaire à 41KDa est d'une intensité importante, dans les témoins marinade et injection ainsi que l'injection par pepsine par rapport à l'autre traitement, par contre, la bande à 44KDa, on constate l'inverse. La bande à 41KDa est presque absente dans le traitement par pulvérisation. La bande de poids moléculaire 92KDa dans tous les traitements a disparu lors de la pulvérisation par la pepsine.

Jamdar & Harikumar (2015), ont étudié le profil SDS-PAGE de la dégradation de la myosine musculaire squelettique de poulet par la cathepsine D et la pepsine ; ils ont constaté que les chaînes lourdes et légères (15 à 20 kDa) de myosine ainsi que les bandes correspondant à 45 kDa, 37 kDa, 35 kDa et 20 kDa (pouvant correspondre respectivement à l'actine, la troponine T, la tropomyosine et la troponine C) ont été efficacement dégradées par la pepsine, en 10 minutes. Ils ont rapporté également que l'action de la pepsine sur les chaînes lourdes de myosine (CLM) a formé des produits de 68 à 70 kDa en 10 minutes, qui ont été complètement dégradées au bout de 45 minutes. L'action de la pepsine sur les CLM a également formé des produits relativement stables (jusqu'à 45 min), avec une masse de 40 à 42 kDa. Au bout de 45 minutes, la myosine était dégradée en peptides à 40 kDa et <10 à 15 kDa par la pepsine.

Une observation similaire a également été rapportée par Farouk *et al.* (2014), lors de la digestion *in vitro*, de protéines myofibrillaires de bœuf. Ils ont signalé une digestion rapide de la plupart des protéines sarcoplasmiques par la pepsine, cependant, certains des produits dégradés de la myosine et de l' $\alpha$ -actinine avec un poids moléculaire correspondant à 100 kDa, 75 kDa, 37 kDa et 18 kDa étaient résistants à une dégradation supplémentaire par la pepsine (Farouk *et al.* 2014). Tang (2013) a rapporté que la pepsine est le principal acteur de la dégradation rapide de différentes protéines en peptides <10 kDa.

La dégradation des protéines musculaires joue un rôle majeur dans la détermination de la tendreté et de la capacité de rétention d'eau de la viande pendant l'entreposage post-mortem (Melody *et al.* 2004). On peut déduire que le traitement par pulvérisation induit à la dégradation, de plusieurs protéines myofibrillaires. La dégradation rapide de ces protéines est un facteur clé dans l'amélioration de la tendreté de la viande. Bien que l'analyse biochimique des différents paramètres de la qualité de la viande, notamment, l'indice de fragmentation myofibrillaire. Et les pertes en eau, n'ont pas révélée l'effet de la pepsine sur la tendreté de la viande de poulet, du fait de la faible concentration de la solution de pepsine utilisée dans notre étude (l'extrait a été dilué à 1/30). L'analyse électrophorétique par Glycine-SDS PAGE, qui est une technique permettant la visualisation des changements apportés sur le profil protéique des différents traitements d'attendrissement par la pepsine, confirme que la pepsine a un effet sur les protéines musculaires. La dégradation de différentes protéines musculaires indique fortement le potentiel d'utilisation de la pepsine de poulet pour l'attendrissement de la viande.

### III. Ficine

#### 1. Résultat de la purification de la ficine par le système TPP

Les résultats de la purification et de la caractérisation de la ficine (EC 3.4.22.3) du latex de *Ficus carica* méditerranéen ont été publiés dans l'article Gagaoua M., Boucherba N., Bouanane-Darenfed A., Ziane F., Nait-Rabah S., Hafid K. & Boudechicha H.-R. (2014) Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Separation and Purification Technology* 132, 461-7. (Annexe 4). Ce travail a été effectué au sein de notre équipe MaQuaV, dans le cadre d'un mémoire d'ingénieur, et c'est, suite à ces résultats, que nous avons voulu appliquer cette cystéine protéase purifiée, par le système TPP, sur la matrice viande.

La ficine a été purifiée et récupérée, en une seule étape à l'aide de système TPP. Les paramètres de purification optimaux étaient une saturation en sulfate d'ammonium à 40% (p / v), avec un rapport de 1,0: 0,75 (v / v) d'extrait brut: t-butanol à pH 7,0, donnant ainsi, un taux de purification de 6,04 et un rendement de 167%. L'enzyme était exclusivement répartie, dans la phase intermédiaire. L'analyse par électrophorèse sur gel Tricine SDS – polyacrylamide de la ficine a montré qu'elle avait un poids moléculaire de 23,4 kDa. La caractérisation de l'enzyme a montré que le pH optimal de l'enzyme purifiée était de 6,5 et la température optimale de 60°C. L'enzyme s'est avérée être stable à 40–70 C, pendant 1 h.

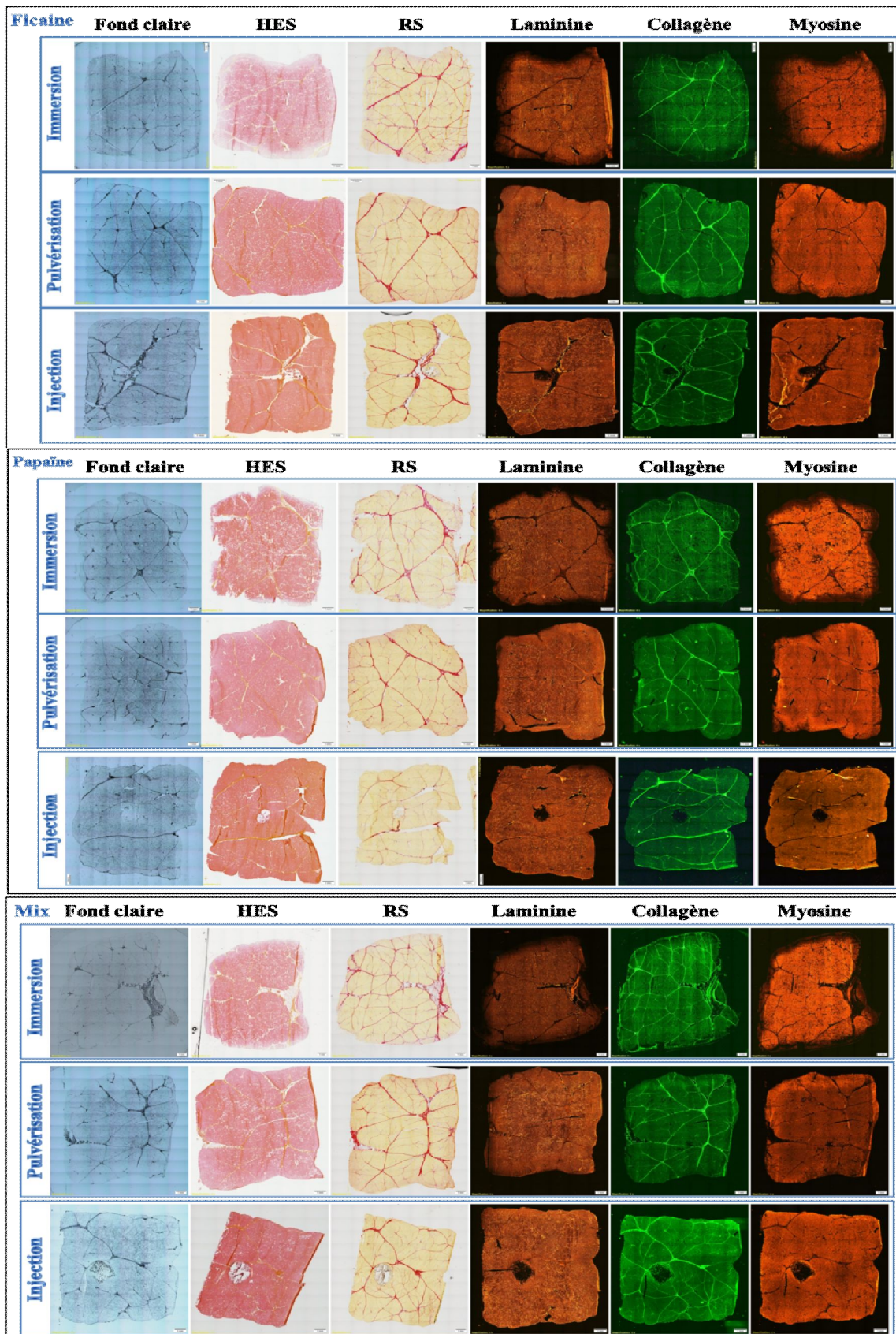
#### **IV. Études de l'effet des protéases purifiées sur la macro et la microstructure de la viande bovine**

##### **1. Mise en évidence de l'action des plantes protéases sur la macro-structure de la viande par histologique et immunohistologique**

Le traitement et l'analyse d'image numérique sont des domaines qui ont connu une forte évolution. L'analyse d'image, vise à obtenir des données quantitatives, à partir de l'image tels que le nombre de cellules, leur taille ou leur forme. A partir d'une image « réelle » issue du microscope, on obtient une image numérique grâce à une caméra. Cette image numérique est constituée de pixels contenant chacun des informations (intensité lumineuse, couleur) Ces informations seront codées, dans une grille échelonnée, en niveau de gris, de 0 à 255 par exemple. On utilise ensuite une étape de « seuillage » qui consiste à transformer l'image en une image binaire. C'est-à-dire que l'on définit l'objet à mesurer, en attribuant à tous les pixels de l'image numérique qui ont un niveau de gris compris entre deux valeurs choisies par l'opérateur. La valeur 1 ; à tous les autres pixels la valeur 0. Ainsi les pixels à 1 correspondent aux objets et les pixels à 0 correspondent au fond de l'image. Alors, il est possible de mesurer les différents paramètres, de forme de l'objet.

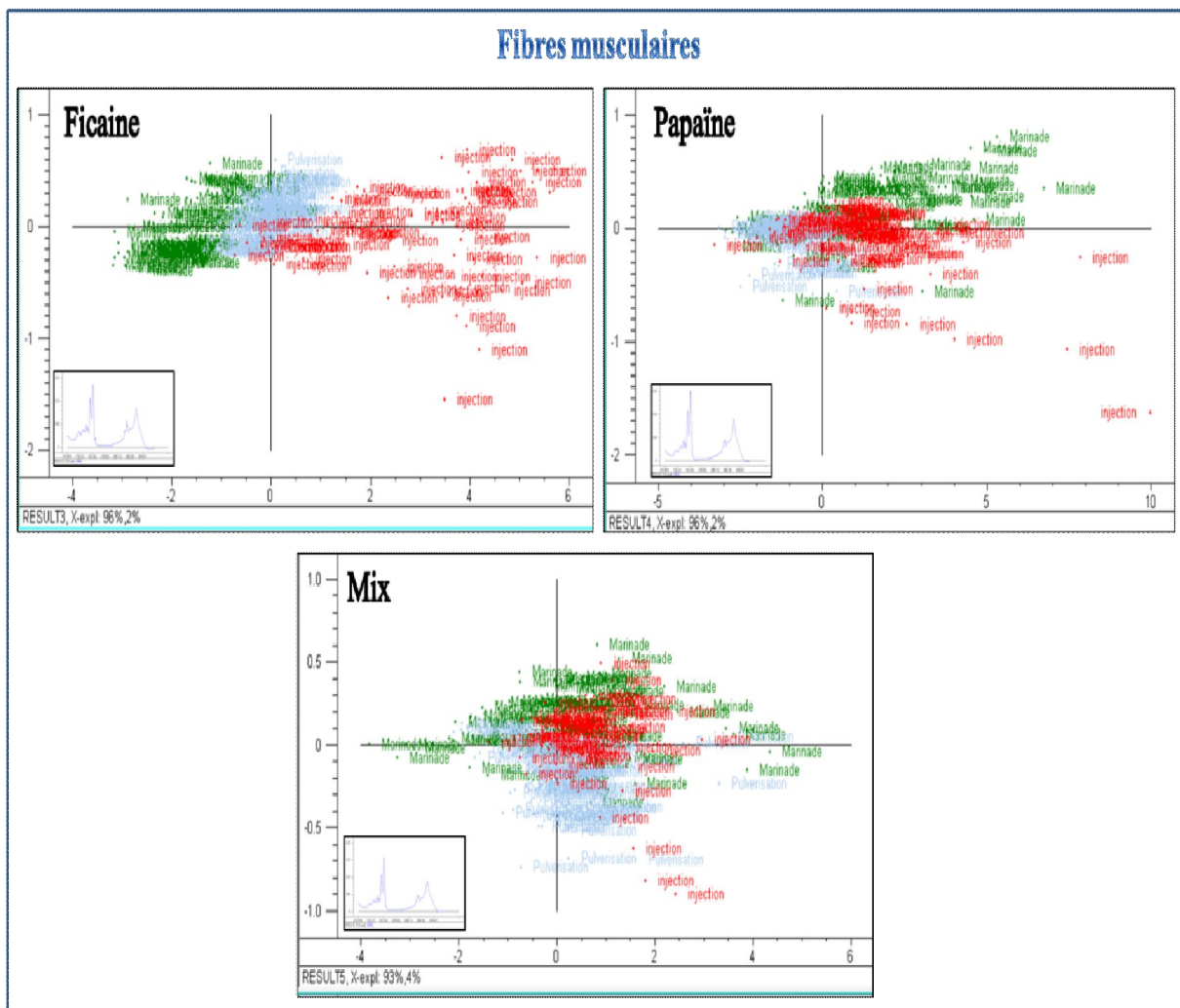
Les images des coupes (magnification x4) colorées à l'HES (Hématoxyline Eosine Safran), RS (rouge Sirius) et le marquage immunologique par des anticorps de la laminine, le collagène et la myosine des échantillons de viande traités par la ficine, la papaïne et le mélange de ces deux enzymes, sont présentés dans la figure 77. Les images montrent clairement l'effet de ces enzymes sur la morphologie du muscle.





**Figure 77** : Coupes (magnification x4) des échantillons de viande traités par la ficaine, papaine et le mélange équivalent de la ficaine et la papaine avec trois modes d'introduction (Immersion, pulvérisation et injection) colorées à l'HES (Hématoxyline Eosine Safran), RS (rouge Sirius) et marquage immunologique par des anticorps de la laminine, le collagène et la myosine.

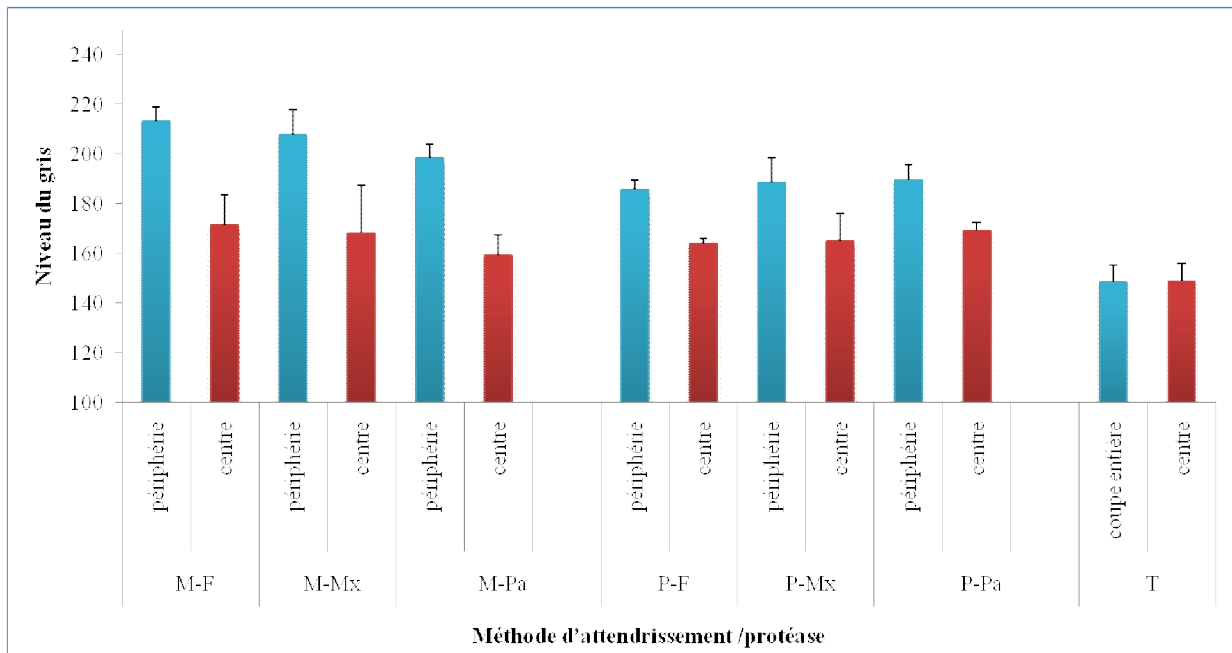
À partir de ces images, nous pouvons voir que l'effet des protéases est plus visible sur les coupes traitées par marinade. Ce résultat est confirmé par les ACP réalisés, sur les différents échantillons traités par les protéases végétales sont présentés dans la figure 78. À travers ces résultats, nous arrivons à distinguer entre les différents traitements d'attendrissements enzymatiques. Comme le cas de la ficine, les échantillons traités par marinade, se regroupent du côté négatif de l'axe et les échantillons traités par pulvérisation sont localisés au centre et du côté positif, on retrouve les échantillons traités par injection. Par contre, pour les échantillons traités par le mélange des deux cystéines protéases, les ACP n'arrivent pas à distinguer, les différences de traitements d'attendrissement enzymatique artificiel.



**Figure 78 :** Analyse en composantes principales montrant la projection des différents traitements d'attendrissement pour les trois solutions enzymatiques, (papaïne, ficine et le mix), en fonction de leur effet sur les fibres musculaires.

### 1.1.Pénétration des protéases

Le traitement des images par le logiciel Image J, a montré un changement de couleur (traduit par le niveau de gris), entre la périphérie des morceaux de viandes traités par les protéases et leur centres, alors que dans les échantillons témoins. Nous n'avons détecté aucune différence entre la périphérie et le centre du morceau de viande (Figure 79), ce qui atteste d'une activité enzymatiques provoquant la dégradation des protéines musculaires.

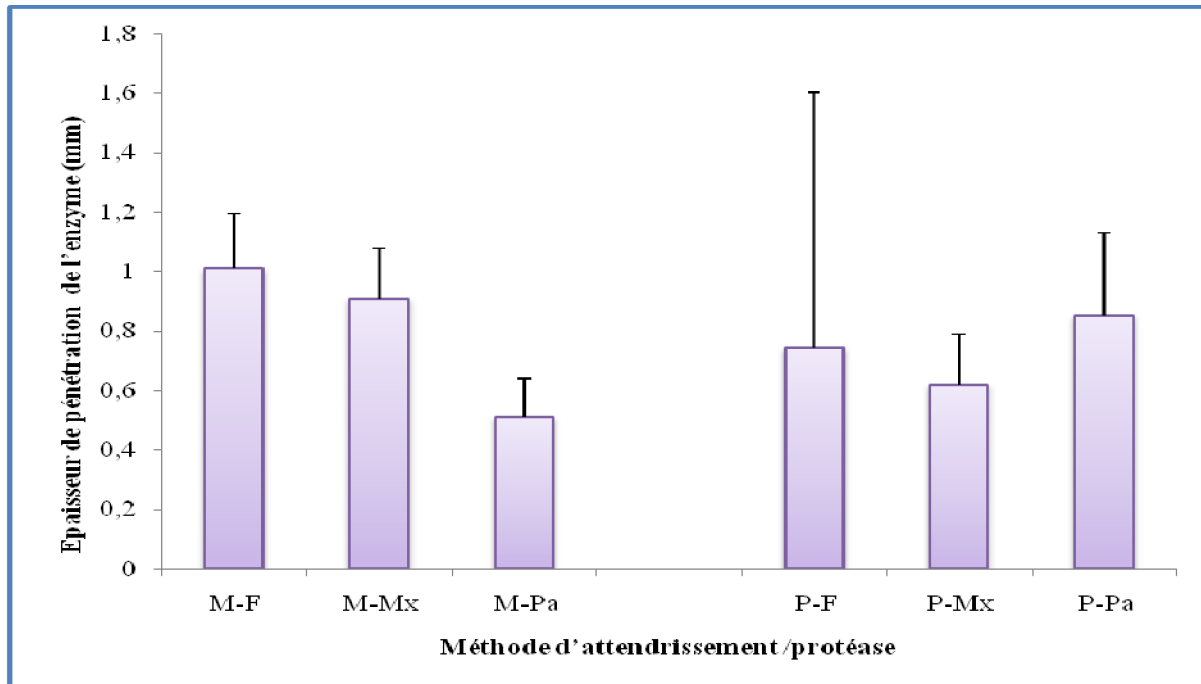


**Figure 79:** Effet de la méthode d'attendrissement (M : marinade, P : pulvérisation, T : Témoin aucun traitement) et la protéase appliquée (F : Ficine, Mx : Mix (ficine/papaine) et pa : Papaine) sur les constituants musculaires (traduit par le niveau du gris)

Ce changement de couleur, par rapport aux témoins, pourrait s'expliquer par la pénétration des protéases et l'action de ces dernières sur les protéines musculaires. La première couche, en contact direct avec la solution enzymatique, présentait l'activité protéolytique la plus élevée, mais les couches plus profondes ont indiqué une activité significativement diminuée ( $P < 0,05$ ), indiquant une mauvaise pénétration de l'enzyme dans les couches profondes.

Barekat & Soltanizadeh (2017) ont rapporté des résultats comparables, les auteurs ont constaté que l'immersion de la viande dans la solution de papaine n'augmente la tendreté que de la couche superficielle, sans effet sur les couches plus profondes. Une immersion prolongée visant à améliorer la pénétration de l'enzyme peut conduire à la désintégration de la viande

dans les couches superficielles. Aussi, une solution a été trouvée, en couplant l'ultrason au traitement enzymatique. Leurs résultats indiquent que l'application simultanée de papaine et d'ultrasons a non seulement amélioré la pénétration des enzymes dans les parties les plus profondes de la viande, mais a également augmenté son activité protéolytique pour donner une texture plus uniforme et plus tendre après attendrissement artificiel.



**Figure 80:** Épaisseur de pénétration de l'enzyme en fonction de la méthode d'attendrissement (M : marinade, P : pulvérisation) et de la protéase utilisée (F : Ficine, Mx : Mix (ficine/papaïne) et Pa : Papaïne)

Les résultats de la figure 80 montre que la ficine pénètre nettement mieux que la papaine, avec le mix, qui est le mélange équivalent de la ficine et la papaine, comme intermédiaire. L'introduction des protéases par marinade permettait une meilleure pénétration de l'enzyme dans le muscle, que par pulvérisation. Les résultats obtenus pour le traitement par injection n'ont pas été présentés, vu très peu de différences significatives. Plusieurs études ont montré que la présence de NaCl permettait une meilleure diffusion de l'enzyme et dissociait partiellement les structures protéiques, rendant ainsi les substrats plus accessibles à la protéase.

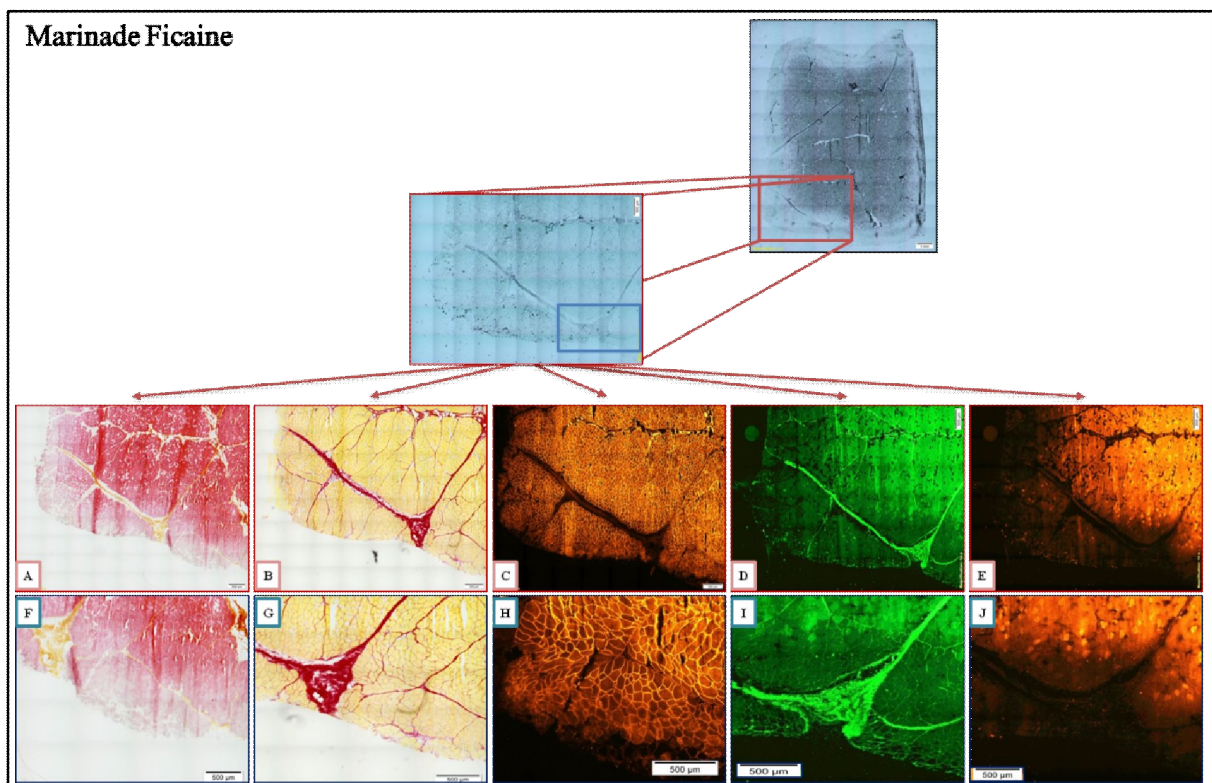
Tout changement dans la disposition structurelle de la viande ou l'intégrité des fibres musculaires sont visibles sur les figures 81, 82 et 83 (grossissement  $\times 10$ ). En effet, des dommages aux myofibrilles situés à la périphérie des échantillons traités par l'enzyme sont observables par rapport aux témoins. Ces changements sont clairement visibles dans les



couches périphériques par rapport à la partie la plus profonde de l'échantillon (figures 6a, b). De plus, le traitement par immersion dans la solution de ficine (100U/ml) semble avoir plus d'effets sur les fibres musculaires, que la papaïne et le mélange des deux protéases (Figure 80).

## 1.2. Effet de la ficine

L'étude immunohistologique des coupes des morceaux traités par la ficine (Figure 81) ont montré que le collagène (Figure 81D et I) sont demeurées intactes, malgré la diffusion de l'enzyme. Par contre, le marquage spécifique de la myosine (figure 81 E et J) a montré la disparition de la fluorescence sur les zones de pénétration de la ficine. Ce qui confirme les résultats de l'étude histologique, indiquant que la ficine dégrade la myosine qui est une protéine myofibrillaire. Nous constatons également une perte de fluorescence dans les zones périphériques au contact, avec la solution de ficine après marquage spécifique de la laminine (Figure 81C et H), qui est une protéine du tissu conjonctif qui entoure la myofibrille.

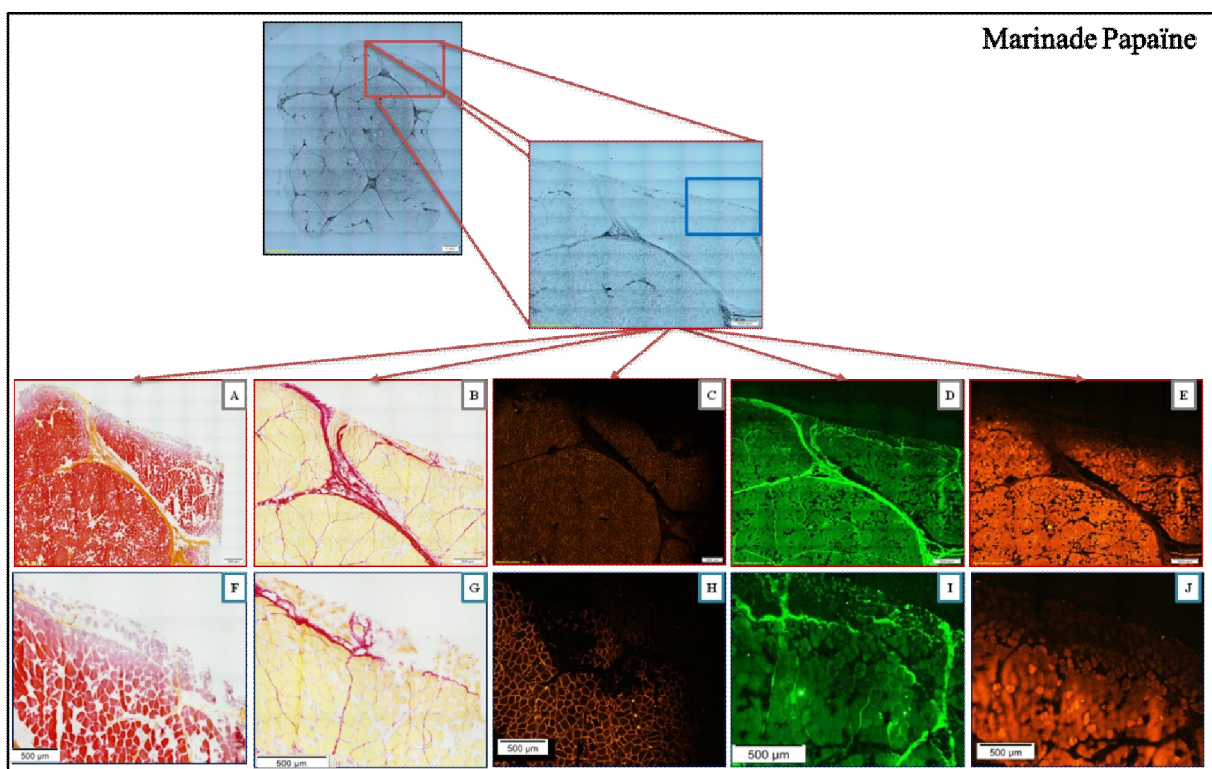


**Figure 81:** Effet de la ficine sur les tissus musculaires par histochimie et immunohistofluorescence. (A, F) coloration HES montrant les cellules musculaires (rose) et le tissu conjonctif (orange). (B,G) coloration rouge sirius (C,H) Marquage spécifique de la laminine (orange). (D,I) Marquage spécifique du collagène en vert. (E, J) Marquage spécifique de la myoglobine en orange. Les images (Carrés rouge et bleu) représentent une zone (magnification x10) de la coupe de l'échantillon de viande immergé dans la solution enzymatique.

Ces résultats sont comparables aux résultats de Payne (2009), selon ses auteurs, la ficine, bien que capable de la dégradation minimale du collagène et de l'élastine, dégradera préférentiellement la protéine myofibrillaire. Elle peut dégrader l'élastine à température aussi basse (20°C) tandis qu'elle a peu d'activité contre le collagène et les protéines myofibrillaires, au-dessous de 40°C.

### 1.3. Effet de la papaïne

L'étude immunohistologique des coupes des morceaux traités par la papaïne (Figure 82) a montré des résultats comparables à la ficine. En effet, malgré la diffusion de la papaïne mais cette dernière n'a pas eu d'effet sur le collagène (Figure 82D et I).



**Figure 82:** Effet de la papaïne sur les tissus musculaires par histochimie et immunohistofluorescence. . (A, F) coloration HES montrant les cellules musculaires (rose) et le tissu conjonctif (orange). (B,G) coloration rouge sirius (C,H) Marquage spécifique de la laminine (orange). (D,I) Marquage spécifique du collagène en vert. (E, J) Marquage spécifique de la myoglobine en orange. Les images (Carrés rouge et bleu) représentent une zone (magnification x10) de la coupe de l'échantillon de viande immergé dans la solution enzymatique.

L'analyse histologique par coloration HES (Figure 82 A et F) et le marquage spécifique de la myosine confirment que la papaïne a dégradé la myosine. Dans la figure 82F, nous remarquons la disparition de la couleur rouge, sur les zones périphériques de la coupe se traduisant, par la dégradation des protéines myofibrillaires, mais nous constatons, également la perte d'intégrité des fibres et l'augmentation de l'espace entre les fibres. Cela prouve que le tissu conjonctif entourant les myofibrilles a été dégradé. Cette conclusion a été confirmée, par

le marquage spécifique de la laminine (Figure 82 C et H), qui a montré que la papaine l'a dégradée, sur toute la zone de sa pénétration.

Nos résultats sont comparables, à ceux de Rawdkuen & Benjakul (2012), ces derniers ont indiqué une perte d'interaction des fibres musculaires et une réduction du diamètre des fibres musculaires, dans les viandes traitées, par la papaine par rapport au témoin. Et une répartition étendue des couches de tissu conjonctif endomysial, entourant les fibres musculaires, sans espaces entre les fibres est clairement évidente dans les échantillons traités par les protéases du latex de papaye et de *C. procera*. Cela indique une activité enzymatique protéolytique sur le tissu conjonctif et / ou les protéines myofibrillaires. Des résultats similaires ont été observés, dans une étude précédente de Naveena & Mendiratta (2004), sur l'attendrissement de la viande de buffle, à l'extrait de gingembre. Une perturbation du tissu conjonctif intramusculaire, indique que la structure est une autre cause d'attendrissement de la viande.

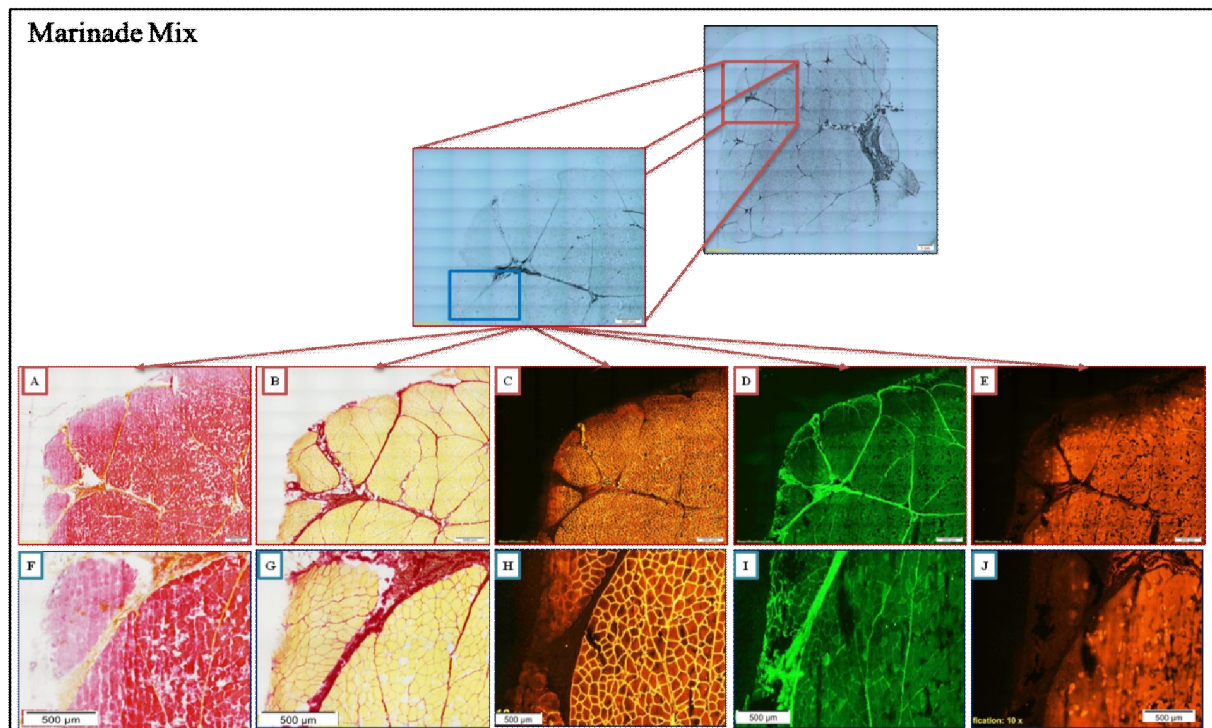
Aussi, Ashie *et al.* (2002) ont affirmé que la papaine est une enzyme hautement agressive et indiscriminée, qui provoque une dégradation significative des protéines myofibrillaires et du collagène, entraînant des fragments de protéines de plusieurs tailles. Ils ont observé une augmentation significative de la tendreté après une et deux semaines de stockage. Aussi, l'étude de Gottschall & Kies (1942) a dévoilé, que la papaine montre une perturbation massive du disque Z, comme cela est observé dans la viande âgée et le collagène. Elle est beaucoup plus efficace lorsqu'elle est injectée dans le produit en raison de sa mauvaise capacité, à pénétrer dans les surfaces. Tappel *et al.* (1956) ont fait ressortir, qu'une majorité de l'activité d'attendrissement se produit, pendant le processus de cuisson. Les études sont en désaccord sur la capacité de la papaine à solubiliser le collagène, avec certains présentant peu ou pas de dégradation et certains présentant une augmentation majeure de la solubilité du collagène. La prudence doit être prise, lors de l'utilisation de la papaine, afin d'éviter le sur-attendrissement, créant un produit moelleux ou farineux.

#### **1.4. Effet du mix**

En mélangeant les deux cystéines protéases à savoir la papaine et la ficine, nous observons la dégradation de la myosine sur toute la zone de diffusion de la solution enzymatique visualisé après coloration à l'HES (Figure 83 A et F) et confirmé après marquage spécifique de la myosine (Figure 83 E et J). Où, on observe la disparition de la couleur sur la zone de diffusion de la solution enzymatique, apparemment évident, vu l'action prouvée des deux cystéylprotéase (papaine et ficine) sur les fibres musculaires. Ceci



s'applique, pour la laminine, où nous remarquons la disparition de la couleur florissante des zones en contact avec la solution enzymatique après marquage spécifique de la laminine (Figure 83 C et H).



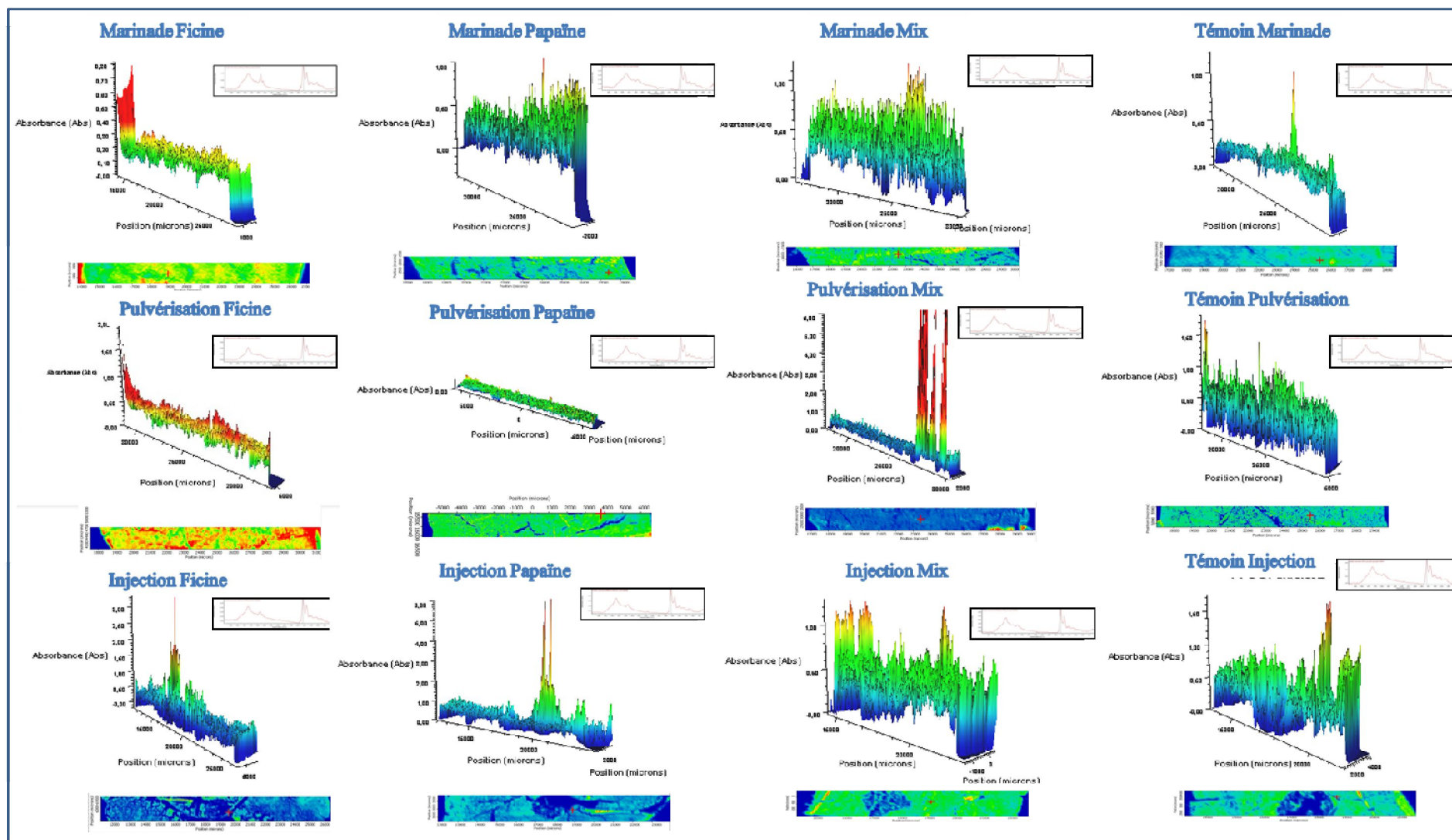
**Figure 83:** Effet du mélange (1: 1, ficine: papaïne) sur les tissus musculaires par histochimie et immunohistofluorescence. . (A, F) coloration HES montrant les cellules musculaires (rose) et le tissu conjonctif (orange). (B,G) coloration rouge sirius (C,H) Marquage spécifique de la laminine (orange). (D,I) Marquage spécifique du collagène en vert. (E, J) Marquage spécifique de la myoglobine en orange. Les images (Carrés rouge et bleu) représentent une zone (magnification x10) de la coupe de l'échantillon de viande immergé dans la solution enzymatique.

La coloration au rouge sirius (Figure 83 B et G) et le marquage spécifique du collagène (Figure 83 D et I) ont montré que le mélange de ces deux plantes protéases (papaïne et ficine) n'avait pas d'effet sur le collagène.

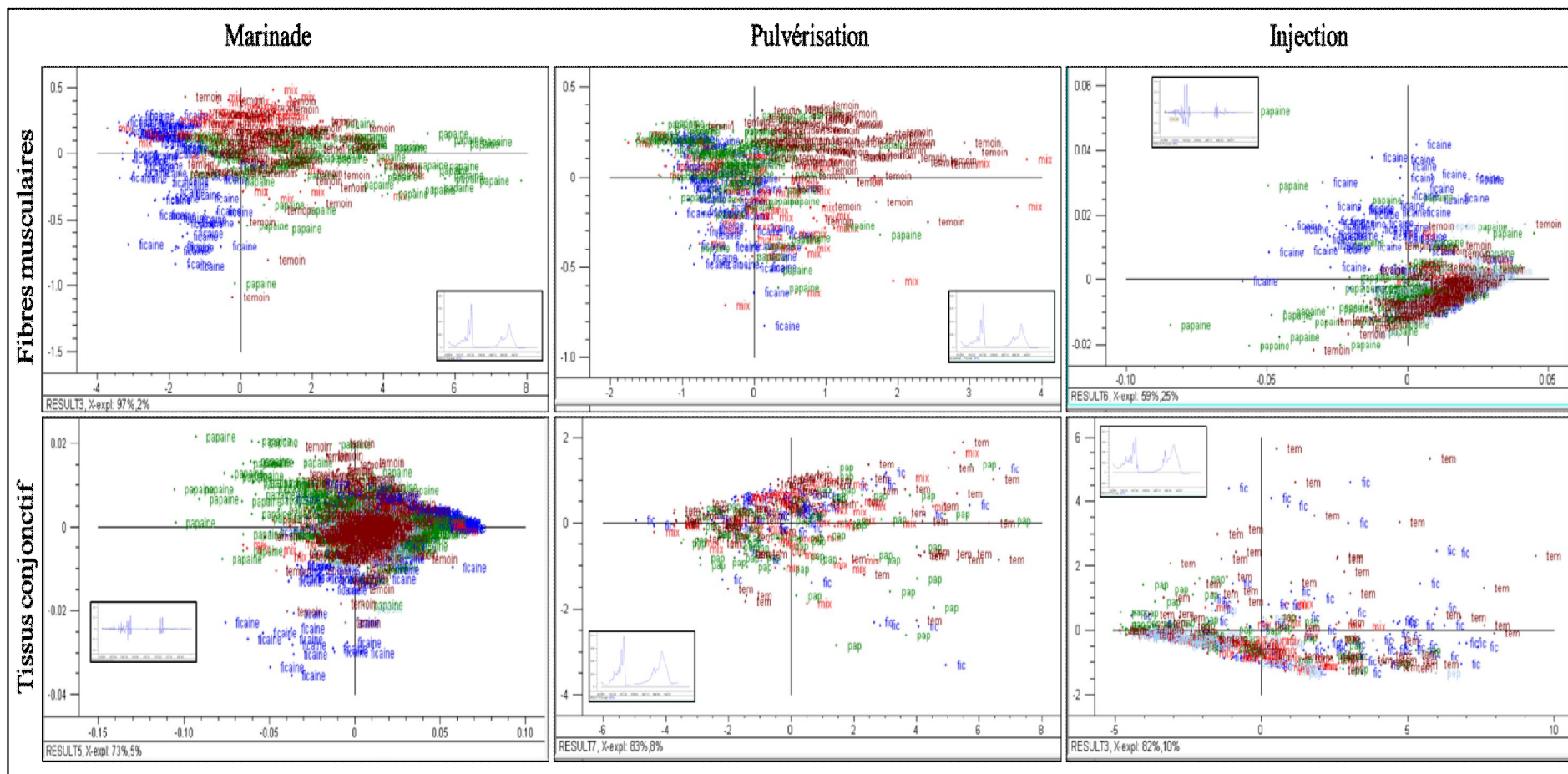
## 2. Mise en évidence de l'action des protéases végétales sur la micro-structure de la viande par microspectroscopie infrarouge FT-IR

La figure 84 représente les cartographies obtenues, après analyse à l'échelle moléculaire, à l'aide du microscope IR équipé d'un détecteur de mercure-cadmium-tellure (Nicolet iN10, Thermo Fisher) et du logiciel Omnic Picta (v7.3, Thermo Scientific, USA). L'absorbance à la longueur d'onde de 1655 correspond à la répartition spatiale, de la teneur en hélice alpha des protéines pour les échantillons traités. Ces résultats sont conformes avec ceux obtenus, lors de nos analyses histologiques où l'on observe toujours, un changement lors de l'application des protéases.





**Figure 84:** Image des cartographies et des spectres acquis à l'aide du logiciel OMNIC Picta des coupes (6 µm) des échantillons traités ou pas par les protéases (Ficine ; Papaïne ; Mix et Témoin), avec les différents traitements d'attendrissement artificiel (Marinade ; Pulvérisation et Injection)



**Figure 85 :** Analyse en composantes principales montrant la projection des différentes solutions enzymatiques (ficaine, papaine et le mix) pour les trois traitements d’attendrissement enzymatique artificiel (marinade, pulvérisation et injection) en fonction de leur effet sur les fibres musculaires et le tissu conjonctif

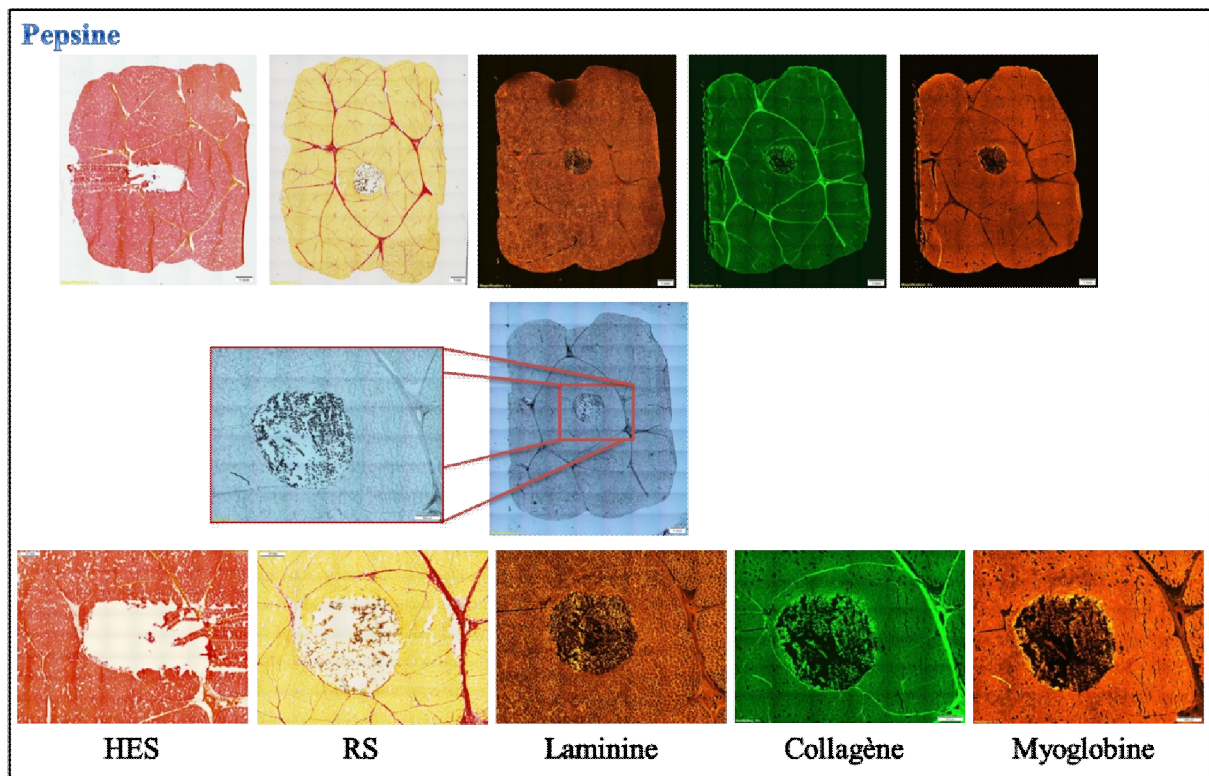
Les analyses en composantes principales réalisées, sur l'ensemble des spectres obtenus des zones de fibres musculaires ainsi que le tissu conjonctif sont présentées dans la figure 85. A partir de ces résultats, nous constatons que la ficine a plus d'effet sur les fibres musculaires, que la papaine. Dans l'ACP de l'effet du traitement par marinade sur les fibres musculaires, nous arrivons à distinguer les échantillons traités par ficine (Colorés en bleu), qui se regroupent sur le côté négatif (gauche) de l'axe horizontal, et des échantillons traités par la papaine (Colorés en vert) qui se regroupent sur le côté positif (droite) de l'axe. Contrairement aux échantillons traités par le mélange des deux enzymes (Colorés en rouge) se placent au milieu et ne se distinguent pas des échantillons non traités (Colorés en grenat). Ayant pour interprétation, l'action compétitive, de ces deux enzymes, et il est vraisemblable que l'une des protéases dégrade l'autre et inhibe son activité. Ces enzymes exercent un effet protéolytique sur les myosines et d'autres protéines myofibrillaires, responsables de la tendreté de la viande (Melendo *et al.* 1996).

Les ACP de l'effet des traitements d'attendrissement enzymatique artificiel sur les tissus conjonctifs montrent que ces deux cystéines protéases n'ont pas d'effet sur le tissu conjonctif car nous n'arrivons pas à distinguer l'action, entre des différentes protéases appliquées et les témoins. Ces résultats confirment ceux obtenus, par l'étude histochimique.

Les structures de ces deux protéases à cystéines, à savoir la ficine et la papaine, sont très similaires et le mécanisme catalytique est le même (Katsaros *et al.* 2009). Cependant, ils peuvent différer par les acides aminés, tapissant la poche de liaison au substrat, qui sont responsables de la liaison des chaînes latérales d'acides aminés, du substrat. Ils pourraient donc différer dans la spécificité du substrat, clivant différentes liaisons peptidiques des protéines du substrat. La papaine clive à la base, les acides aminés ou ceux ayant de grandes chaînes latérales hydrophobes (Payne 2009) C'est une endopeptidase, à faible spécificité de substrat et en mesure, de catalyser l'hydrolyse d'une large gamme de liaisons (peptide, amide, ester, thiol ester et les liaisons thiono esters) (Schwimmer 1981). Ces enzymes dégradent souvent la texture de la viande, en raison de leur spécificité de substrat large, menant à un goût défavorable ou à un attendrissement, en raison de la répartition inégale (Cronlund & Woychik 1987). Alors que la ficine active clive préférentiellement les protéines, au niveau des résidus de la tyrosine et de la phénylalanine. En raison de ce clivage préférentiel, la ficine a tendance à produire des hydrolysats à faible amertume, ainsi qu'à un attendrissement plus contrôlé qu'avec la bromélaïne ou la papaine (Payne 2009)

### 3. Mise en évidence de l'action la pepsine sur la macro & microstructure de la viande par histologique et immunohistologique et FT-IR

Les images des coupes (magnification  $\times 4$  et  $\times 10$ ) colorées à l'HES (Hématoxyline Eosine Safran), RS (rouge Sirius) et le marquage immunologique par des anticorps de la laminine, le collagène et la myosine, des échantillons de viande traités, par injection de la pepsine de proventricules de poulet sont présentées dans la figures 86.

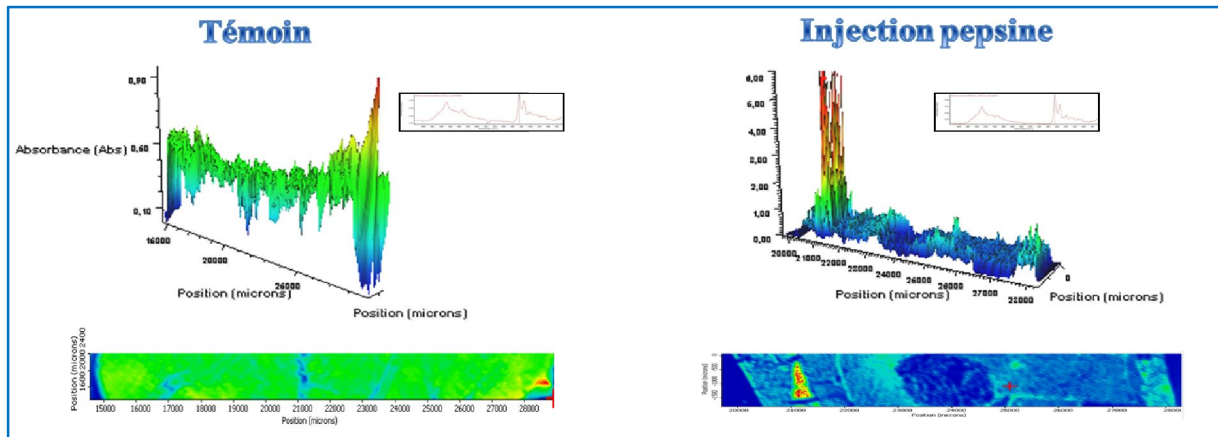


**Figure 86 :** Coupes (magnification  $\times 4$  et  $\times 10$ ) des échantillons de viande traités par la pepsine de proventricules de poulet par injection colorées à l'HES (Hématoxyline Eosine Safran), RS (rouge Sirius) et marquage immunologique par des anticorps de la laminine, le collagène et la myosine.

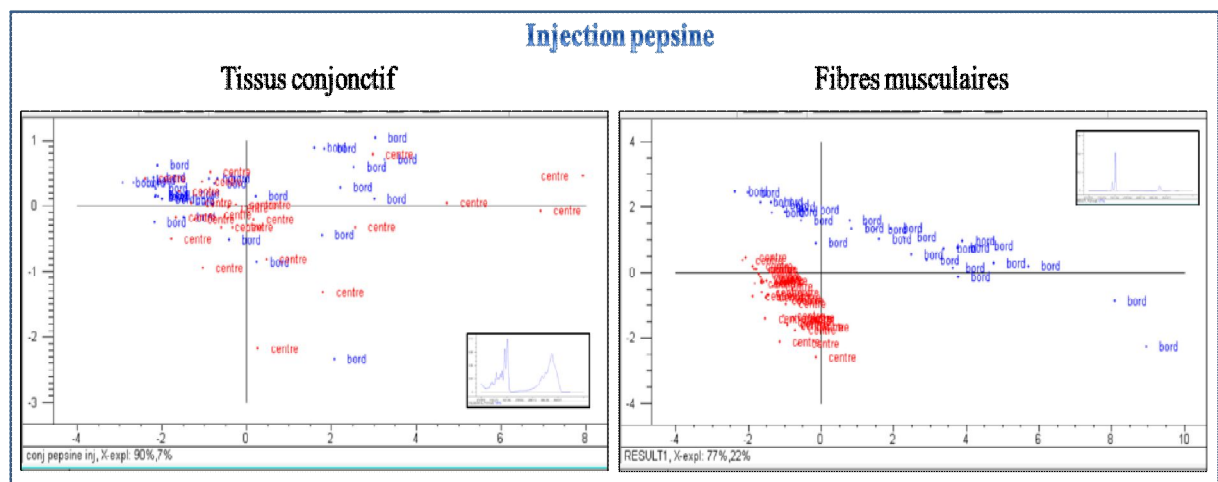
Au travers de ces images, une différence dans la morphologie du muscle, sur la zone d'application de l'enzyme, à l'échelle macromoléculaire est indistincte, cela est due à la faible concentration de la solution enzymatique utilisée.

La figure 87 représente les cartographies obtenues, après analyse à l'échelle moléculaire, à l'aide du microscope IR. La figure 88 représente les analyses en composantes principales réalisées, sur l'ensemble des spectres obtenus des zones du bord et du centre, des coupes pour les fibres musculaires ainsi que le tissu conjonctif.





**Figure 87** : Cartographies des coupes obtenues après traitement d'attendrissement par injection de la pepsine.



**Figure 88** : Analyse en composantes principales montrant la projection des zones de contact (centre et bord de la coupe) pour le traitement d'attendrissement enzymatique artificiel par injection de la pepsine de proventricules de poulet en fonction de leur effet sur les fibres musculaires et le tissu conjonctif

D'après cette étude, et à l'échelle micromoléculaire, il est possible de distinguer entre les zones du centre de la coupe (colorés en rouge) en contact, avec la solution de pepsine, et les zones de bord de la coupe (colorés en bleu), distants dans le cas des fibres musculaires. Cela prouve l'action de la pepsine sur les protéines myofibrillaires. De l'autre côté, l'ACP ne distingue pas les zones du centre et les zones du bord, pour les tissus conjonctifs. C'est la faible concentration de la solution enzymatique qui a affaibli l'action de notre solution enzymatique. Pour cela, nous n'avons pu détecter de différence, qu'à l'échelle micromoléculaire. L'étude de Timpl *et al.* (1979) a déduit que le traitement de la laminine, avec la pepsine a produit plusieurs fragments susceptibles d'être partiellement séparés, sur l'agarose Aet que le traitement par la pepsine de la laminine n'a pas détruit son antigénicité et la majeure partie de l'activité a été conservée dans le grand fragment laminine P1.

# Conclusion

La présente étude a pour but, l'étude de protéases, à savoir la pepsine, la ficine et la papaine, pour leur utilisation, et dans l'amélioration de la texture de la viande dure. Nous avons utilisé, comme matrice d'application, la viande de poules pondeuses, de vaches de réforme et de dromadaires.

Pour la purification des protéases étudiées, nous avons opté pour le système de répartition en trois phases (TPP). Cette méthode d'extraction et de purification a nécessité une mise au point et une optimisation des paramètres. Par la suite, les protéases purifiées sont caractérisées en vue d'une meilleure connaissance de leurs modes d'action et d'une maîtrise de leurs applications sur la viande.

Nos résultats montrent que la **pepsine** a une tendance à se concentrer dans la phase intermédiaire, du système TPP. Un rendement de purification de l'ordre de 86 % et un facteur de purification de 3.26 ont été calculés, pour la phase intermédiaire. L'activité spécifique de la fraction protéique récupérée est, de l'ordre de 485.52U/mg, avec les paramètres du système optimisé : l'ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 40%, un rapport de (1.0 :0.75) (v:v) d'extrait brut/t-butanol et pH 4.

La détermination des conditions optimales d'activité de l'enzyme purifiée(pepsine), ainsi que l'activité protéolytique avec hémoglobine, comme substrat, est maximale à une température de 50°C. Elle présente une stabilité thermique, dans la gamme de 20°C à 80°C. La pepsine partiellement purifiée présentait deux pH optimaux 3 et 7, avec une stabilité à une large gamme de pH acide (pH<6). Ces paramètres cinétiques sont  $V_{\max}=243,9\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}\text{et km}$ , équivalente à 2,683 mg/ml. En présence de  $\beta$ -mercaptaéthanol comme un inhibiteur, l'enzyme perd jusqu'à 16% de son activité. Les seuls ions métalliques, ayant un effet considérable, sur l'activité de la pepsine sont le  $\text{CaCl}_2$  et le  $\text{MgCl}_2$ , avec une perte d'activité qui peut atteindre, respectivement, 40 et 20%.

Concernant la **papaine**, elle a été récupérée, dans la phase aqueuse, avec un facteur de purification de 11,45 et un rendement de 134%, par les paramètres optimisés du système TPP en une étape: 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , rapports 1,0: 0,75, de l'extrait brut au t-BuOH, pH6,0 et 25°C. La caractérisation de la papaine purifiée a montré une stabilité intéressante et meilleure, sur une large gamme de températures (de 40 à80°C) et de pH (de 6,5 à 7,5). Divers ions métalliques (KCl, NaCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ et  $\text{Fe SO}_4$ ) ont inhibé son activité enzymatique, pour plus de 20%, résistante aux inhibiteurs tels que le PMSF, l'EGTA



et l'iode. Toutefois, l'iodoacétamide et l'iodoacétamique acide ont inhibé, plus de 75% de son activité protéolytique.

Pour **la ficine**, les paramètres de purification optimaux correspondait à une saturation en sulfate d'ammonium à 40% (p / v), avec un rapport de 1,0: 0,75 (v / v), de l'extrait brut: t-butanol à pH 7,0, donnant un facteur de purification de 6,04 et un rendement de 167%. L'enzyme se trouve être exclusivement répartie, dans la phase de précipité interfacial. La caractérisation de l'enzyme a montré que le pH optimal de l'enzyme purifiée était de 6,5 et la température optimale de 60 ° C. L'enzyme s'est avérée être stable à 40–70 C pendant 1 h.

Notre deuxième objectif consiste à appliquer des enzymes purifiées et d'étudier leur effet attendrisseur sur la viande. Nous avons constaté que l'applique de **la papaïne**, sur les muscles *Longissimus thoracis* et *Semi tendinosus mature* prélevés, après 48h *post mortem*, révèle une augmentation significative de la tendreté, par mesure au pénétromètre. Il a été observé, dans les viandes traitées, avec de la papaïne, par rapport au témoin. Cette expérience confirme que la papaïne est une enzyme protéolytique qui provoque une amélioration de la texture de la viande.

Le traitement de pulvérisation couplé, au cycle de congélation a donné le meilleur résultat pour le muscle *Longissimus*. Pour le muscle *Semi tendinosus* c'est le traitement avec cycle de congélation/décongélation, qui a donné le meilleur résultat. Nous avons aussi constaté une divergence significative entre les différents traitements effectués, pour les deux muscles. Le traitement enzymatique par injection présente les pourcentages les plus élevés, 47% et 36%, pour les deux muscles *Longissimus thoracis* et *Semi tendinosus*, respectivement. A travers nos résultats, nous pouvons dire que la papaïne est une protéase connue pour son effet attendrisseur, sur la viande. Elle présente un grand intérêt pour la viande de dromadaire, provenant d'animaux âgés.

Par rapport à l'application de la **pepsine** sur le muscle *Pectoral mature* prélevé, après 24h *post mortem*, et provenant de poules pondeuses, nos résultats ne présentent aucune différence significative, au seuil de 5%, pour les différents traitements (la marinade, l'injection et la pulvérisation). Toutefois, nous avons observé une différence significative, pour la perte en eau. La teneur en protéines solubles, dans le TCA, a augmenté de manière marquante ( $P < 0,05$ ), pour les deux échantillons traités par la solution de pepsine, en marinade et en pulvérisation, par rapport au contrôle. Cependant, la solution de pepsine ne présente pas d'effets, sur les protéines solubles dans l'eau et le sel.

À propos de l'application de la ficine, nos résultats démontrent qu'elle dégrade les protéines myofibrillaires, mais elle n'a pas d'effet sur le collagène.

Nous remarquons que les trois protéases étudiées hydrolysent les protéines myofibrillaires. Cependant, l'activité des cystéines protéases (papaine et ficine) est plus élevée que celle de la pepsine (aspartyl protéase). L'analyse électrophorétique par Glycine-SDS PAGE, permet de visualiser, clairement les produits hydrolysés des protéines musculaires, par la pepsine. Nous pouvons conclure que la pepsine présente un grand potentiel, pour l'attendrissement des viandes de poules pondeuses, peu appréciée par le consommateur algérien et généralement orientée vers la charcuterie.

Les résultats se rapportant à l'étude de l'impact des traitements sur les structures macro et micro-moléculaires, pour différents modes d'application, montrent que la papaine et la ficine ont un effet considérable sur la texture de la viande. En effet, ces deux protéases ont dégradé la structure musculaire, au contact de l'enzyme. Les résultats immunohistologiques ont révélé que ces deux protéases ont dégradé la myosine et la laminine, mais n'avaient pas d'effet sur le collagène. Le traitement des images a établi que la ficine pénètre, nettement mieux que la papaine. Les analyses en composantes principales réalisées, sur l'ensemble des spectres obtenus, des zones de fibres musculaires, et du tissu conjonctif ont indiqué, que la ficine a plus d'effets, sur les fibres musculaires, que la papaine.

Quant à la pepsine, appliquée par injection, l'étude à l'échelle micromoléculaire, a permis de distinguer, entre les zones du centre de la coupe en contact, avec la solution de pepsine, et les zones de bord de la coupe, distantes, dans le cas des fibres musculaires. Ceci conforte, l'action de la pepsine sur les protéines myofibrillaires. Contrairement, aux tissus conjonctifs, l'ACP n'est pas en mesure de discerner entre les zones du centre et les zones du bord, pour les coupes traitées par la pepsine. La faible concentration de la solution enzymatique a affaibli l'action, de notre solution enzymatique.

La maîtrise de la tendreté de la viande est un secteur de recherche émergent dans les pays développés. Comme perspective, et à la suite de ces résultats très promoteurs, il serait donc intéressant de pousser davantage les investigations, afin de confirmer nos résultats. Il serait, également judicieux de trouver la meilleure concentration d'enzyme à utiliser, et de déterminer les paramètres optimaux, de temps et de température d'application. Faire des analyses sensorielles pour évaluer la qualité de viandes traitées. Nous pouvons également suggérer un emballage intelligent renfermant ces enzymes, pouvant exercer leurs actions, lors de la période de conservation des viandes.

# Références Bibliographiques

## A

- Abakar M.N.M. (2012) Essai de fabrication d'un fromage frais traditionnel sénégalais, à partir du lait de vache, coagulé par la papaine naturelle. In: *Ecole Inter-Etats des Sciences et Medecine. Veterinaires de Dakar (EISMV)*. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. .
- Abuharfeel N. & Abuereish G. (1984) Isolation and characterization of camel pepsins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **77**, 175-82.
- Adoui F. (2007) Extraction d enzyme Coagulant le lait à partir de proventricules de poulet. In: *Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires INATAA*. université des frères mentouri, Constantine.
- Aehle W. (2007) *Enzymes in industry: production and applications*. John Wiley & Sons, Weinheim, Germany.
- Ait Kaki El-Hadef El-Okki A., Gagaoua M., Bourekoua H., Hafid K., Bennamoun L., Djekrif-Dakhmouche S., El-Hadef El-Okki M. & Meraihi Z. (2017) Improving bread quality with the application of a newly purified thermostable  $\alpha$ -amylase from *Rhizopus oryzae* FSIS4. *Foods* **6**, 1.
- Akardere E., Özer B., Çelem E.B. & Önal S. (2010) Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast. *Separation and Purification Technology* **72**, 335-9.
- Akin O., Temelli F. & Köseoğlu S. (2012) Membrane applications in functional foods and nutraceuticals. *Critical reviews in food science and nutrition* **52**, 347-71.
- Akpan I. & Omojola A. (2015) Quality attributes of crude papain injected beef. *Journal of Meat Science and Technology* **3**, 42-6.
- AL-Mzaien K.-A. (2007) Extraction, purification and characterization of camel's pepsin (*Camelus dromedarius*). . *J. Biotec. Iraqi*. **62**, 64-76.
- Alais C., Linden G. & Miclo L. (2008) *Biochimie alimentaire*. Dunod, Paris, France.
- Alamargot J. (1982) *Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaires*. E'ditions du Point Vétérinaire.
- Allais S. (2011) Détection et validation de marqueurs génétiques impliqués dans la qualité de la viande bovine. In: *L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)*
- Alvarez-Guerra E. & Irabien A. (2014) Separation of proteins by ionic liquid-based three-phase partitioning. In: *Ionic Liquids in Separation Technology* (pp. 207-34. Elsevier.

- Amin T., Bhat S.V. & Sharma N. (2014) Technological advancements in meat tenderization- A review. *Journal of Meat Science and Technology* **2**, 01-9.
- Amri E. & Mamboya F. (2012) Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* **8**, 99-104.
- Anson M.L. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of general physiology* **22**, 79-89.
- Antranikian G., Ruepp A., Gordon P.M., Ballschmiter M., Zibat A., Stark M., Sensen C.W., Frishman D., Liebl W. & Klenk H.-P. (2009) Rapid access to genes of biotechnologically useful enzymes by partial genome sequencing: the thermoalkaliphile *Anaerobranca gottschalkii*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **16**, 81-90.
- Arshad M.S., Kwon J.-H., Imran M., Sohaib M., Aslam A., Nawaz I., Amjad Z., Khan U. & Javed M. (2016) Plant and bacterial proteases: A key towards improving meat tenderization, a mini review. *Cogent Food & Agriculture* **2**, 1261780.
- Ashie I., Sorensen T. & Nielsen P. (2002) Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness. *Journal of food science* **67**, 2138-42.
- Astruc T., Gatellier P., Labas R., Lhoutellier V.S. & Marinova P. (2010) Microstructural changes in m. rectus abdominis bovine muscle after heating. *Meat Science* **85**, 743-51.
- Astruc T., Peyrin F., Vénien A., Labas R., Abrantes M., Dumas P. & Jamme F. (2012) In situ thermal denaturation of myofibre sub-type proteins studied by immunohistofluorescence and synchrotron radiation FT-IR microspectroscopy. *Food chemistry* **134**, 1044-51.
- Australia P. (2007) Papaw and Papaya. Homepage for Papaya Australia. <http://www.australianpapaya.com.au/index.php>.
- Azarkan M., Dibiani R., Baulard C. & Baeyens-Volant D. (2006) Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and activity. *International journal of biological macromolecules* **38**, 216-24.
- Azarkan M., El Moussaoui A., van Wuytswinkel D., Dehon G. & Looze Y. (2003) Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *Journal of Chromatography B* **790**, 229-38.

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

## B

Bachi K. (2012) Etude de l'infestation de différentes variétés de figuier (*Ficus carica* L.) par la mouche méditerranéenne des fruits, *Ceratitis capitata* (Diptera, Trypetidae). Effets des huiles essentielles sur la longévité des adultes. Université Mouloud Mammeri.

Baines B.S. & Brocklehurst K. (1979) A necessary modification to the preparation of papain from any high-quality latex of *Carica papaya* and evidence for the structural integrity of the enzyme produced by traditional methods. *Biochemical Journal* **177**, 541-8.

Bajovic B., Bolumar T. & Heinz V. (2012) Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat Science* **92**, 280-9.

Baker E.N. & Drenth J. (1987) Active Sites of Enzymes. In: *Biological macromolecules and assemblies* (ed. by McPherson JaA), p. 314. Wiley-Interscience, New York,.

Balls A.K., Thompson B. & Jones W.W. (1940) Crude papain. *Industrial & Engineering Chemistry* **32**, 1144-7.

Banga-Mboko H., Godeau J., Drion P., El Amiri B., Drion V., Perenyi Z., Sousa N. & Beckers J. (2002) Evaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguine comme biomarqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc. 1. Historique, physiopathologie de la muqueuse gastrique et différentes formes de pepsinogènes. *Ann. Méd. Vét* **146**, 339-46.

Bárány K., Bárány M. & Giometti C.S. (1995) Polyacrylamide gel electrophoretic methods in the separation of structural muscle proteins. *Journal of Chromatography A* **698**, 301-32.

Barbanti D. & Pasquini M. (2005) Influence of cooking conditions on cooking loss and tenderness of raw and marinated chicken breast meat. *LWT-food Science and Technology* **38**, 895-901.

Barbut S. (2009) Chapter 18 : Texture Analysis. In: *Handbook of processed meats and poultry analysis* (eds. by Nollet LM & Toldrá F), pp. 375-84. CRC Press, Taylor and Francis group, new york.

- Barekat S. & Soltanizadeh N. (2017) Effects of ultrasound on microstructure and enzyme penetration in beef longissimus lumborum muscle. *Food and Bioprocess technology* **11**, 680-93.
- Barouh N., Abdelkafi S., Fouquet B., Pina M., Scheirlinckx F., Carrière F. & Villeneuve P. (2010) Neutral lipid characterization of non-water-soluble fractions of carica papaya latex. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **87**, 987-95.
- Barrett A.J. (1994) *Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases*. Academic Press.
- Barrett A.J. & Rawlings N.D. (1995) Families and clans of serine peptidases. *Archives of biochemistry and biophysics* **318**, 247-50.
- Bartoli M. & Richard I. (2005) Calpains in muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**, 2115-33.
- Bauchard D. & Picard B. (2010) *Muscle et viande de ruminant*. Éditions Quae.
- Bauchart D., Chantelot F. & Gandemer G. (2008) Qualités nutritionnelles de la viande et des abats chez le bovin: données récentes sur les principaux constituants d'intérêt nutritionnel. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **43**.
- Bayraktar H. & Önal S. (2013) Concentration and purification of  $\alpha$ -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. *Separation and Purification Technology* **118**, 835-41.
- Becila S., Hafid K., Gagaoua M., Boudjellal A., Agli A. & Ouali A. (2014) Prediction de la tendreté de la viande d'agneau par penetrometrie. In: *15ème journée sciences de muscle et technologies des viandes JSMTV* pp. 105-6, 4 et 5 novembre 2014. Clermont-Ferrand.
- Beers E.P., Woffenden B.J. & Zhao C. (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant molecular biology* **44**, 399-415.
- Bekhit A.A., Hopkins D.L., Geesink G., Bekhit A.A. & Franks P. (2014a) Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical reviews in food science and nutrition* **54**, 1012-31.
- Bekhit A.E.-D.A., Carne A., Ha M. & Franks P. (2014b) Physical interventions to manipulate texture and tenderness of fresh meat: a review. *International Journal of Food Properties* **17**, 433-53.



- Benchiheb M. (2015) Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanisme d'action et applications technologiques. In: *Département de Biochimie- Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*, . Université Constantine 1, Constantine.
- Benjakul S., Visessanguan W., Riebroy S., Ishizaki S. & Tanaka M. (2002) Gel-forming properties of surimi produced from bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *P macracanthus*, stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 1442-51.
- Benkahoul M. (2016) Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux chardons endémiques, *Galactites tomentosa* et *Onopordum acanthium*. In: *Département de Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*. Université des frères mentouri Constantine.
- Bensid A. (2018) *Hygiène et Inspection des Viandes Rouges*. دار الجلفة إنفو للنشر و التوزيع.
- Beriain M., Bas P., Purroy A. & Treacher T. (2000) Effect of animal and nutritional factors and nutrition on lamb meat quality. *Sheep and goat nutrition: Intake, digestion, quality of products and rangelands*, 75-86.
- Berri C., Wacrenier N., Millet N. & Le Bihan-Duval E. (2001) Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines. *Poultry science* **80**, 833-8.
- Berridge N. (1952) Some observations on the determination of the activity of rennet. *Analyst* **77**, 57b-62.
- Berthet J. (2006) *Dictionnaire de biologie*.
- Beuk J.F., Savich A.L., Goeser P.A. & Hogan J.M. (1959) Method of tendering meat. Google Patents.
- Beynon R.J. & Oliver S. (2004) Avoidance of proteolysis in extracts. In: *Methods in Molecular Biology: Protein purification protocols* (ed. by Cutler P), pp. 75-84. Humana Press Inc. Springer, Totowa, NJ.
- Bhaskar N., Sachindra N., Modi V., Sakhare P. & Mahendrakar N. (2006) Preparation of proteolytic activity rich ginger powder and evaluation of its tenderizing effect on spent-hen muscles. *Journal of Muscle Foods* **17**, 174-84.

- Bhat Z.F., Morton J.D., Mason S.L. & Bekhit A.E.D.A. (2018) Applied and emerging methods for meat tenderization: A comparative perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **17**, 841-59.
- Biesalski H.-K., Dragsted L.O., Elmadfa I., Grossklaus R., Müller M., Schrenk D., Walter P. & Weber P. (2009) Bioactive compounds: Safety and efficacy. *Nutrition* **25**, 1206-11.
- Birkhold S., Janky D. & Sams A. (1992) Tenderization of early-harvested broiler breast fillets by high-voltage post-mortem electrical stimulation and muscle tensioning. *Poultry science* **71**, 2106-12.
- Blanchet X. (2010) Des gènes impliqués dans la variabilité de la tendreté des viandes bovines: étude structure-fonction de l'anti-protéase codée par le gène bovin SERPINA3-3. Limoges.
- Blumberg S., Schechter I. & Berger A. (1970) The purification of papain by affinity chromatography. *European Journal of Biochemistry* **15**, 97-102.
- Bobe J. & William Goetz F. (2001) An ovarian progastricsin is present in the trout coelomic fluid after ovulation. *Biology of reproduction* **64**, 1048-55.
- Boccard R., Dumont B. & Schmitt O. (1995) Note sur les relations entre la dureté de la viande et les principales caractéristiques du tissu conjonctif. *Viandes et produits carnés (Aubière)* **16**, 175-80.
- Boeris V., Spelzini D., Farruggia B. & Picó G. (2009) Aqueous two-phase extraction and polyelectrolyte precipitation combination: A simple and economically technologies for pepsin isolation from bovine abomasum homogenate. *Process Biochemistry* **44**, 1260-4.
- Bohak Z. (1969) Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *Journal of Biological Chemistry* **244**, 4638-48.
- Boleman S., Boleman S., Miller R., Taylor J., Cross H., Wheeler T., Koohmaraie M., Shackelford S., Miller M. & West R. (1997) Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *Journal Of Animal Science-Menasha Then Albany Then Champaign Illinois-* **75**, 1521-4.
- Bond J. & Warner R. (2007) Ion distribution and protein proteolysis affect water holding capacity of Longissimus thoracis et lumborum in meat of lamb subjected to antemortem exercise. *Meat Science* **75**, 406-14.

- Bonnet M., Louveau I., Cassar-Malek I., Lefaucheur L. & Rescan P.-Y. (2015) Comprendre le développement des muscles et des tissus adipeux: un préalable pour maîtriser les qualités des carcasses et des produits des animaux d'élevage. *INRA Prod. Anim* **28**, 137-50.
- Bouanane-Darenfed A., Boucherba N., Bouacem K., Gagaoua M., Joseph M., Kebbouche-Gana S., Nateche F., Hacene H., Ollivier B. & Cayol J.-L. (2016) Characterization of a purified thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. strain TH7C1 T. *Carbohydrate Research* **419**, 60-8.
- Bougatef A., Balti R., Zaied S.B., Souissi N. & Nasri M. (2008) Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences. *Food chemistry* **107**, 777-84.
- Bowker B.C., Schaefer R.B., Grapperhaus M.J. & Solomon M.B. (2011) Tenderization of beef loins using a high efficiency sparker. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **12**, 135-41.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-54.
- Braia M., Ferrero M., Rocha M.V., Loureiro D., Tubio G. & Romanini D. (2013) Bioseparation of papain from *Carica papaya* latex by precipitation of papain-poly (vinyl sulfonate) complexes. *Protein expression and purification* **91**, 91-5.
- Brooks C. (2007) Marinating of beef for enhancement. *Beef Facts. National Cattlemen's Association*.
- Brown R.J., Ernstrom C. & Johnson M.E. (1988) Milk-clotting enzymes and cheese chemistry. In: *Fundamentals of dairy chemistry* (pp. 609-54. Springer.
- Bruneton J. (2009) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Lavoisier.
- Bucar F., Wube A. & Schmid M. (2013) Natural product isolation-how to get from biological material to pure compounds. *Natural product reports* **30**, 525-45.
- Burgess R.R. & Deutscher M.P. (2009) *Guide to protein purification*. Academic Press.

## C

- Çalci E., Demir T., Çelem E.B. & Önal S. (2009) Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*)  $\alpha$ -galactosidase by three-phase partitioning and its characterization. *Separation and Purification Technology* **70**, 123-7.
- Candek-Potokar M., Lefaucheur L., Zlender B. & Bonneau M. (1999) Effect of slaughter weight and/or age on histological characteristics of pig longissimus dorsi muscle as related to meat quality. *Meat Science* **52**, 195-203.
- Canini A., Alesiani D., D'Arcangelo G. & Tagliatesta P. (2007) Gas chromatography–mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf. *Journal of food composition and analysis* **20**, 584-90.
- Cartier P. & Moevi I. (2007) Le point sur La qualité des carcasses et des viandes de gros bovins. *Compte rendu final*, 05.
- Cassens R.G. (2008) *Meat preservation: preventing losses and assuring safety*. John Wiley & Sons.
- Chaiwut P., Pintathong P. & Rawdkuen S. (2010) Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. *Process Biochemistry* **45**, 1172-5.
- Chaker S. (1997) Figue/Figuier.(voir A164, Alimentation, Encyclopédie berbère, IV, p. 472-533). *Encyclopédie berbère*, 2825-33.
- Chanda I., Basu S.K., Dutta S.K. & Das S.R.C. (2011) A protease isolated from the latex of *Plumeria rubra* Linn (Apocynaceae) 1: purification and characterization. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **10**, 705-11.
- Chaurasiya R.S., Sakhare P., Bhaskar N. & Hebbar H.U. (2015) Efficacy of reverse micellar extracted fruit bromelain in meat tenderization. *Journal of food science and technology* **52**, 3870-80.
- Chawla A., Kaur R. & Sharma A.K. (2012) *Ficus carica* Linn.: A review on its pharmacognostic, phytochemical and pharmacological aspects. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* **1**, 215-32.
- Chazarra S., Sidrach L., López-Molina D. & Rodríguez-López J.N. (2007) Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International dairy journal* **17**, 1393-400.

- Cheftel J.-C. & Cheftel H. (1992) *Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments*, Paris.
- Chew K.W., Ling T.C. & Show P.L. (2018) Recent developments and applications of three-phase partitioning for the recovery of proteins. *Separation & Purification Reviews* **48**, 52-64.
- Chew K.W., Ling T.C. & Show P.L. (2019) Recent developments and applications of three-phase partitioning for the recovery of proteins. *Separation & Purification Reviews* **48**, 52-64.
- Choi Y., Nam K., Choe J., Ryu Y., Wick M., Lee K. & Kim B. (2013) Growth, carcass, fiber type, and meat quality characteristics in Large White pigs with different live weights. *Livestock Science* **155**, 123-9.
- Chow R.B. & Kassell B. (1968) Bovine Pepsinogen and Pepsin I. ISOLATION, PURIFICATION, AND SOME PROPERTIES OF THE PEPSINOGEN. *Journal of Biological Chemistry* **243**, 1718-24.
- Christensen M., Ertbjerg P., Failla S., Sañudo C., Richardson R.I., Nute G.R., Olleta J.L., Panea B., Albertí P. & Juárez M. (2011) Relationship between collagen characteristics, lipid content and raw and cooked texture of meat from young bulls of fifteen European breeds. *Meat Science* **87**, 61-5.
- Christensen M., Tørngren M.A., Gunvig A., Rozlosnik N., Lametsch R., Karlsson A.H. & Ertbjerg P. (2009) Injection of marinade with actinidin increases tenderness of porcine M. biceps femoris and affects myofibrils and connective tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**, 1607-14.
- Chukwuemeka O. & Anthonia A.B. (2010) Antifungal effects of pawpaw seed extracts and papain on post harvest *Carica papaya* L. fruit rot. *African Journal of Agricultural Research* **5**, 1531-5.
- Claustrioux J.-J. (2001) Considérations sur l'analyse statistique de données sensorielles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **5**, 155-8.
- Claverie-Martín F. & Vega-Hernández M.C. (2007) Aspartic proteases used in cheese making. In: *Industrial enzymes* (pp. 207-19. Springer.

- Clinquart A., Leroy B., Dottreppe O., Hornick J., Dufrasne I. & Istasse L. (2000) Les facteurs de production qui influencent la qualité de la viande des bovins Blanc Bleu belge. *L'élevage du Blanc Bleu Belge, CESAM, 19pp.*
- Coibion L. (2008) Acquisition des qualités organoleptiques de la viande bovine: adaptation à la demande du consommateur.
- Combes S., Auvergne A. & Lebas F. (2000) Effect of cooking temperature on Warner-Bratzler tenderness measurement in rabbit meat. In: *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress, Valencia*, pp. 4-7.
- Couchoux H. (2007) Interactions fonctionnelles et moléculaires de la cavéoline-3 et du canal calcique de type L dans les cellules musculaires squelettiques.
- Craplet C. (1966) La viande de bovins. In: *Traité d'élevage moderne-De l'étable de l'éleveur à l'assiette du consommateur-Livre I.* , (ed. by Vigot Frères Editeurs), p. 486p, France.
- Créviu-Gabriel I., Gomez J., Caffin J.-P. & Carré B. (1999) Comparison of pig and chicken pepsins for protein hydrolysis. *Reproduction Nutrition Development* **39**, 443-54.
- Cristofanelli S., Antonini M., Torres D., Polidori P. & Renieri C. (2004) Meat and carcass quality from Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*). *Meat Science* **66**, 589-93.
- Cronlund A.L. & Woychik J.H. (1987) Solubilization of collagen in restructured beef with collagenases and  $\alpha$ -amylase. *Journal of food science* **52**, 857-60.
- Culioli J. (1994) Le chauffage de la viande: incidences sur la dénaturation des protéines et la texture. *Viandes et produits carnés (Aubière)* **15**, 159-64.
- Culioli J., Touraille C., Bordes P. & Girard J. (1990) Caractéristiques des carcasses et de la viande du poulet label fermier. *Archiv fur Geflugelkunde* **54**, 237-45.
- Culler R., Smith G. & Cross H. (1978) Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. *Journal of food science* **43**, 1177-80.
- Cuvelier G.-F. (1993) Production des enzymes In: *Biotechnologie* (ed. by Scriban R), p. P: 948. Technique et documentation Lavoisier.

## D

- Daudin J.-D. (1988) La congélation. In: *Technologie de la viande et des produits carnés*. (ed. by Girard JPeVC), p.280. APRIA INRA. Technique de documentation. Lavoisier, Paris.
- Davis K.E. (1975) Analysis of comminuted meat products. Google Patents.
- de Melo Oliveira V., de Souza Bezerra R. & Assis C.R.D. (2014) Fish pepsin: basic characteristics, extraction, determination and biotechnological applications. *Natural Resources* **4**, 6-14.
- Dennison C. (2011) Three phase partitioning. In: *Methods in protein biochemistry* (ed. by Tschesche H). Walter de Gruyter, Berlin, Germany.
- Dennison C. & Lovrien R. (1997) Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein expression and purification* **11**, 149-61.
- Depledt F. (2009) Évaluation sensorielle: manuel méthodologique (3ème édition). Lavoisier.
- Devaraj K., Gowda L.R. & Prakash V. (2008a) An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry* **69**, 647-55.
- Devaraj K., Kumar P.R. & Prakash V. (2011) Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process Biochemistry* **46**, 458-64.
- Devaraj K.B., Kumar P.R. & Prakash V. (2008b) Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**, 11417-23.
- Devine C. (2004) Conversion of muscle to meat. In 'Encyclopedia of meat science'.(Ed. WK Jensen) Vol. Ageing pp. 330–338. Elsevier: Amsterdam, the Netherlands.
- Deyonge-Freeman K., Pringle T., Reynolds A. & Williams S. (2000) Evaluation of calcium chloride and spice marination on the sensory and textural characteristics of precooked semitendinosus roasts. *Journal of food quality* **23**, 1-13.
- Dhananjay S. & Mulimani V. (2008) Purification of  $\alpha$ -galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology letters* **30**, 1565-9.



- Dickens J. & Lyon C. (1995) The effects of electric stimulation and extended chilling times on the biochemical reactions and texture of cooked broiler breast meat. *Poultry science* **74**, 2035-40.
- Di Pierro G., O'Keeffe M.B., Poyarkov A., Lomolino G. & FitzGerald R.J. (2014) Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L.-derived proteinase. *Food chemistry* **156**, 305-11.
- Domsalla A. & Melzig M.F. (2008) Occurrence and properties of proteases in plant latices. *Planta medica* **74**, 699-711.
- Doneva M., Miteva D., Dyankova S., Nacheva I., Metodieva P. & Dimov K. (2015) Efficiency of plant proteases bromelain and papain on turkey meat tenderness. *Biotechnology in Animal Husbandry* **31**, 407-13.
- Donta S.T. & Van Vunakis H. (1970) Chicken pepsinogens and pepsins. Their isolation and properties. *Biochemistry* **9**, 2791-7.
- Dransfield E. (1994) Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat Science* **36**, 105-21.
- Dransfield E., Jones R. & MacFie H. (1981) Tenderising in *M. longissimus dorsi* of beef, veal, rabbit, lamb and pork. *Meat Science* **5**, 139-47.
- Dransfield E., Martin J., Bauchart D., Abouelkaram S., Lepetit J., Culioli J., Jurie C. & Picard B. (2003) Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Animal Science* **76**, 387-99.
- Dransfield E. & Zamora F. (1997) Steak de boeuf. A quel prix la tendreté? *Viandes et produits carnés (Aubière)* **18**, 184-90.
- Dubey V.K. & Jagannadham M. (2003) Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry* **62**, 1057-71.
- Dubois T., Kleinschmidt T., SCHNEK A.G., LoozE Y. & BRAUNITZER G. (1988) The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. II. The primary structure of proteinase  $\Omega$ . *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **369**, 741-54.
- Duman Y.A. & Kaya E. (2013a) Purification, recovery, and characterization of chick pea (*Cicer arietinum*)  $\beta$ -galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique. *Protein expression and purification* **91**, 155-60.

- Duman Y.A. & Kaya E. (2013b) Three-Phase partitioning as a rapid and easy method for the purification and recovery of catalase from sweet potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Appl Biochem Biotechnol* **170**, 1119-26.
- Dumont B. (1952) La tendreté de la viande. *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences* **1**, 71-95.
- Dumont B. & Valin C. (1982) Chapitre VI. Bases biochimiques de l'hétérogénéité du tissu musculaire et des viandes (rappel sur la composition et la structure de la viande). *Hygiène et technologie de la viande fraîche. CNERNA Commission" Viandes et produits carnés". Centre National de la Recherche Scientifique., Paris.*

### E

- Effront J., Prescott S.C. & Venable C.S. (2007) *Biochemical catalysts in life and industry: proteolytic enzymes (1917)*. Kessinger Publishing, New York.
- Eichler J. (2001) Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology advances* **19**, 261-78.
- El-Beltagy A., El-Adawy T., Rahma E. & El-Bedawey A. (2004) Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Food chemistry* **86**, 33-9.
- Ellies-Oury M.-P., Durand Y., Delavigne A.-E., Picard B., Micol D. & Dumont R. (2014) Objectivation de la notion de grain de viande et perspectives d'utilisation pour évaluer la tendreté des viandes de bovins Charolais. *INRA Prod. Anim.* 27 347-58.
- El-Shibiny S., Abd El-Salam H., Rifaat I. & Fahmi H. (1973) Studies on milk clotting enzyme from plant source. II Separation of milk clotting enzymes from latex of *Ficus carica* var. Soltani. *Sudan Journal of Food Science and Technology* **5**, 30-4.
- El Khaloui M. (2010) Valorisation de la figue au Maroc. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA. Transf. Technol. Agric* **186**, 1-4.
- El Moussaoui A., Nijs M., Paul C., Wintjens R., Vincentelli J., Azarkan M. & Looze Y. (2001) Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **58**, 556-70.
- Englund P.T., King T.P., Craig L.C. & Walti A. (1968) Ficin. I. Its isolation and characterization. *Biochemistry* **7**, 163-75.

- Ernstrom C. (1983) Milk clotting enzymes and their action in fundamentals of dairy chemistry in WEBB BH, JOHNSON AH. *ALFORD JA The Avi Publishing company* **2**, 663-718.
- Escobar J. & Barnett S.M. (1993) Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei* acid protease. *Enzyme and microbial technology* **15**, 1009-13.
- Eshamah H., Han I., Naas H., Acton J. & Dawson P. (2014) Antibacterial effects of natural tenderizing enzymes on different strains of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* on beef. *Meat Science* **96**, 1494-500.
- Espiard E. (2002) Introduction à la transformation industrielle des fruits (Ed) TEC &DOC. *France*, 259-65.
- Espin N. & Islam M. (1998) Stabilization of papain from papaya peels/Estabilización de la papaína de la cáscara de papaya. *Food science and technology international* **4**, 179-87.
- Esumi H., Sato S. & Sugimura T. (1978) Purification of mouse pepsinogens by pepstatin-affinity chromatography. *FEBS letters* **86**, 33-6.
- Esumi H., Yasugi S., Takeo M. & Fujiki H. (1980) Purification and characterization of a pepsinogen and its pepsin from proventriculus of the Japanese quail. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **611**, 363-70.
- Evrat-Georgel C. (2008) Bibliographie critique des méthodes instrumentales de mesure de la tendreté de la viande bovine. Département technique d'Élevage et Santé, Service Qualité des Viandes: Paris.

## F

- Faccia M., Picariello G., Trani A., Loizzo P., Gambacorta G., Lamacchia C. & Di Luccia A. (2012) Proteolysis of Cacioricotta cheese made from goat milk coagulated with caprifiig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology* **234**, 527-33.
- Facciola S. (1990) *Cornucopia: a source book of edible plants*. Kampong publications.
- Faridnia F., Ma Q.L., Bremer P.J., Burritt D.J., Hamid N. & Oey I. (2014) Effect of freezing as pre-treatment prior to pulsed electric field processing on quality traits of beef muscles. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.
- Farouk M.M., Wu G., Frost D.A., Clerens S. & Knowles S.O. (2014) The in vitro digestibility of beef varies with its inherent ultimate pH. *Food & function* **5**, 2759-67.

- Feidt C. (1996) Ions, peptides et protéolyse post mortem dans le muscle strié. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Feijoo-Siota L. & Villa T.G. (2011) Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess technology* **4**, 1066-88.
- Feng S., Li W. & Lin H. (2008) Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **149**, 275-84.
- Fernández-Lucas J., Castañeda D. & Hormigo D. (2017) New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* **68**, 91-101.
- Fiems L., De Campeneere S., De Smet S., Van de Voorde G., Vanacker J. & Boucqué C.V. (2000) Relationship between fat depots in carcasses of beef bulls and effect on meat colour and tenderness. *Meat Science* **56**, 41-7.
- Foegeding E.A. & Larick D.K. (1986) Tenderization of beef with bacterial collagenase. *Meat Science* **18**, 201-14.
- Foltmann B. (1981) Gastric proteinases-structure, function, evolution and mechanism of action. *Essays Biochem.* **17**, 52-84.
- Foltmann B., Harlow K., Houen G., Nielsen P.K. & Sangild P. (1995) Comparative investigations on pig gastric proteases and their zymogens. In: *Aspartic Proteinases* (pp. 41-51. Springer.
- Fox P.F. & Whitaker J.R. (1977) Isolation and characterization of sheep pepsin. *Biochemical Journal* **161**, 389-98.
- Furihata C., Saito D., Fujiki H., Kanai Y., Matsushima T. & Sugimura T. (1980) Purification and characterization of pepsinogens and a unique pepsin from rat stomach. *European Journal of Biochemistry* **105**, 43-50.

## G

- Gagaoua M. (2018) Aqueous Methods for Extraction/Recovery of Macromolecules From Microorganisms of Atypical Environments: A Focus on Three Phase Partitioning. In: *Methods in Microbiology* (Elsevier Ltd.

- Gagaoua M., Boucherba N., Bouanane-Darenfed A., Ziane F., Nait-Rabah S., Hafid K. & Boudechicha H.-R. (2014) Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (< i> Ficus carica</i> L.) latex. *Separation and Purification Technology* **132**, 461-7.
- Gagaoua M. & Hafid K. (2016) Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification. *Biosensors Journal* **5**.
- Gagaoua M., Hafid K. & Hoggas N. (2016) Data in Support of Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from Zingiber officinale Roscoe rhizomes. *Data in Brief* **6**, 634–9.
- Gagaoua M., Hafid K., Ziane F. & Nait Rabah S. (2015a) Plant Milk-Clotting Enzymes, a New Emerging Technique for their Purification using Three Phase Partitioning system. In: *29th EFFoST International Conference Proceedings*, 10-12 November 2015, Athens, Greece.
- Gagaoua M., Hoggas N. & Hafid K. (2015b) Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from Zingiber officinale Roscoe rhizomes. *International journal of biological macromolecules* **73**, 245-52.
- Gagaoua M., Ziane F., Rabah S.N., Boucherba N., El A.A.K.E.-H., Bouanane-Darenfed A. & Hafid K. (2017) Three phase partitioning, a scalable method for the purification and recovery of cucumisin, a milk-clotting enzyme, from the juice of Cucumis melo var. reticulatus. *International journal of biological macromolecules* **102**, 515-25.
- Gagaoua, M., Dib, A. L., Lakhdara N., LamriM., Botineştean C., Lorenzo, J. M (2020). "Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases." *Current Opinion in Food Science*.
- Gao H.Y., Zhou G.H., Zeng J., Ma H.J., Pan R.S. & Yu X.L. (2011) Tenderization of goose meat by papain, pineapple juice and ginger juice treatment. In: *Advanced Materials Research*, pp. 2349-52. Trans Tech Publ.
- Garcia F. & Woodall R. (2001) Meat tenderization and sterilization using axial planer shockwaves. Google Patents.
- Garg R. & Thorat B.N. (2014) Nattokinase purification by three phase partitioning and impact of t-butanol on freeze drying. *Separation and Purification Technology* **131**, 19-26.

- Gault N. (1991) Marinated meat. In. *Developments in Meat Science*. 5th.(Lawrie, R. ed.) pp. 191-245. Elsevier Science, London, UK.
- Gerelt B., Ikeuchi Y. & Suzuki A. (2000) Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration. *Meat Science* **56**, 311-8.
- Gicquel M., Philippe M., Guillon-Kroon C., Raoult M., Ouest A. & Rabelais B. (2016) Le déterminisme de la tendreté d'une viande bovine est complexe et les méthodes pour l'apprécier sont diverses. *Viandes & Produits Carnés*, 1.
- Gil-Chávez G.J., Villa J.A., Fernando Ayala-Zavala J., Basilio Heredia J., Sepulveda D., Yahia E.M. & González-Aguilar G.A. (2013) Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**, 5-23.
- Gildberg A. & Raa J. (1983) Purification and characterization of pepsins from the Arctic Fish Capelin (*Mallotus Villosus*). *Comp. Biochrnt. Physioi* **75A**, 337-42.
- Gilka J. & Hornich M. (1975) The colour of some rabbit muscles and the content of connective tissue. *Zivocisna Vyroba-UVTI (Czechoslovakia)* 20, 763-71.
- Goll D., Neti G., Mares S. & Thompson V. (2008) Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *Journal of animal science* **86**, E19-E35.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W. & Cong J. (2003) The calpain system. *Physiological reviews*.
- González-Rábade N., Badillo-Corona J.A., Aranda-Barradas J.S. & del Carmen Oliver-Salvador M. (2011) Production of plant proteases in vivo and in vitro—a review. *Biotechnology advances* **29**, 983-96.
- Got F. (1997) Accélération des processus de maturation de la viande bovine par traitements technologiques: injections de calcium; applications d'ultrasons de puissance.
- Gottschall G. & Kies M. (1942) Digestion of beef by papain. *Food Research* **7**, 373-81.
- Grau R. & Hamm R. (1953) A simple method for the determination of water binding in muscles. *Naturwissenschaften* **40**, 29-30.
- Green M.L. & Llewellyn J.M. (1973) The purification and properties of a single chicken pepsinogen fraction and the pepsin derived from it. *Biochemical Journal* **133**, 105-15.

- Grilo A.L., Raquel Aires-Barros M. & Azevedo A.M. (2016) Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends. *Separation & Purification Reviews* **45**, 68-80.
- Grzonka Z., Kasprzykowski F. & Wiczak W. (2007) Cysteine proteases. In: *Industrial Enzymes* (pp. 181-95). Springer.
- Guillemin N., Cassar-Malek I., Hocquette J.-F., Jurie C., Micol D., Listrat A., Levéziel H., Renand G. & Picard B. (2009) La maîtrise de la tendreté de la viande bovine: identification de marqueurs biologiques. *INRAE Productions Animales* **22**, 331-44.
- Gupta R., Beg Q. & Lorenz P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology* **59**, 15-32.

## H

- Ha M., Bekhit A.E.-D.A., Carne A. & Hopkins D.L. (2012) Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food chemistry* **134**, 95-105.
- Haesslein D. & Oreiller S. (2008) Fraîche ou séchée, la figue est dévoilée. Filière Nutrition et diététique. Haute Ecole de Santé. (p. 1-4), Genève, Suisse.
- Hafid K. (2015) Effet de l'âge à l'abattage sur les caractéristiques de la carcasse et la qualité de la viande des poules pondeuses de réformes de la souche ISA F15. In: *Institut de la Nutrition, de l'alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A.)*. Université des frères mentouri Constantine.
- Hafid K., Gagaoua M., Boudechich H.-R., Rabah S.N., Ziane F., Sellama M., Becila S. & Boudjellal A. (2016) A Comparison of the Carcass and Meat Quality of ISA (F15) Spent Hens Slaughtered at Two Different Ages. *American Journal of Food Technology* **11**, 134-42.
- Hafid K., John J., Sayah T.M., Domínguez R., Becila S., Lamri M., Dib A.L., Lorenzo J.M. & Gagaoua M. (2020) One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent. *International journal of biological macromolecules* **146**, 798-810.
- Han J., Morton J., Bekhit A. & Sedcole J. (2009) Pre-rigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness. *Meat Science* **82**, 324-30.



- Harris P. & Shorthose W. (1988) Meat texture. In: Developments in meat science 4 (ed. by Lawrie) ER), pp. 361p.245-96. Elsevier, , UK: London.
- Hartley B. (1960) Proteolytic enzymes. *Annual review of biochemistry* **29**, 45-72.
- Hashim P., Ridzwan M.M. & Bakar J. (2014) Isolation and characterization of collagen from chicken feet. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences* **8**, 250-4.
- He Y., bin Tuan Chik S.M.S. & Chong F.C. (2014) Purification of papain from unclarified papaya juice using reversed phase expanded bed adsorption chromatography (RP-EBAC). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **20**, 4293-7.
- Hedstrom L. (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews* **102**, 4501-24.
- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Boudjellal A. & Ouali A. (2006) Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology* **17**, 394-405.
- Herriott R.M. (1938) Isolation, crystallization, and properties of swine pepsinogen. *The Journal of general physiology* **21**, 501-40.
- Herriott R.M. (1962) Pepsinogen and pepsin. *The Journal of general physiology* **45**, 57-76.
- Hirasawa A., Athauda S.B. & Takahashi K. (1996) Purification and characterization of turtle pepsinogen and pepsin. *The Journal of Biochemistry* **120**, 407-14.
- Ho C., Stromer M. & Robson R. (1994) Identification of the 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. *Biochimie* **76**, 369-75.
- Hocquette J.-F., Ortigues-Marty I., Damon M., Herpin P. & Geay Y. (2000) Métabolisme énergétique des muscles squelettiques chez les animaux producteurs de viande. *Productions Animales* 3 (13), 185-200.(2000).
- Honikel K.O. (1998) Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science* **49**, 447-57.
- Hsieh J.J.-D., Cheng E.H.-Y. & Korsmeyer S.J. (2003) Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115**, 293-303.
- Huet R. (1956) Nature et propriétés de la papaïne. *Fruits* **11**, 51-8.
- Huff-Lonergan E. & Lonergan S.M. (1999) Postmortem mechanisms of meat tenderization. In: *Quality attributes of muscle foods* (pp. 229-51. Springer.

Husain S. & Lowe G. (1970) A reinvestigation of residues 64–68 and 175 in papain. Evidence that residues 64 and 175 are asparagine. *Biochemical Journal* **116**, 689-92.

### I

Imelio N., Marini A., Spelzini D., Picó G. & Farruggia B. (2008) Pepsin extraction from bovine stomach using aqueous two-phase systems: Molecular mechanism and influence of homogenate mass and phase volume ratio. *Journal of Chromatography B* **873**, 133-8.

Islam M.N. & Molinar-Toribio E.M. (2013) Development of a meat tenderizer based on papaya peel. *Observación por Pares Basada en Mapas Conceptuales: Una Estrategia para Fomentar el “Scholarship of Teaching and Learning” en la Universidad Tecnológica de Panamá* **9**, 24-7.

Istrati D. (2008) The influence of enzymatic tenderization with papain on functional properties of adult beef. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* **14**, 140-6.

Istrati D., Vizireanu C. & Dinică R. (2012) Influence of post-mortem treatment with proteolytic enzymes on tenderness of beef muscle. *J. Agroalimentary Proces. Tech* **18**, 70-5.

### J

Jacquet A., KLEINSCHMIDT T., SCHNEK A.G., Looze Y. & BRAUNITZER G. (1989) The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. III. The primary structure of chymopapain. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **370**, 425-34.

Jamdar S. & Harikumar P. (2016) Purification, Identification and Characterization of Aspartic Proteases of Chicken Intestine. *Journal of food biochemistry* **40**, 451-62.

Jeacocke R. (1977) Continuous measurements of the pH of beef muscle in intact beef carcasses. *International Journal of Food Science & Technology* **12**, 375-86.

Jeddi L. (2009) Valorisation des figues de Taounate: potentiel, mode et stratégie proposé. *Rapport DPA de Taounate.*, 29 pp.

Jeleníková J., Pipek P. & Staruch L. (2008) The influence of ante-mortem treatment on relationship between pH and tenderness of beef. *Meat Science* **80**, 870-4.

- Jiang Z.G., Zhang H.D. & Wang W.T. (2015) Purification of papain by metal affinity partitioning in aqueous two-phase polyethylene glycol/sodium sulfate systems. *Journal of separation science* **38**, 1426-32.
- Joo S., Kauffman R., Kim B. & Park G. (1999) The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Science* **52**, 291-7.
- Jorgova V., Danchev S. & Kostov A. (1989) Effect of bacterial enzyme preparation on the solubility and electrophoretic properties of muscle proteins. In: *Proc Int Congr Meat Sci Technol*, pp. 913-7.

### K

- Kadim I., Mahgoub O., Al-Marzooqi W., Al-Zadjali S., Annamalai K. & Mansour M. (2006) Effects of age on composition and quality of muscle Longissimus thoracis of the Omani Arabian camel (*Camelus dromedaries*). *Meat Science* **73**, 619-25.
- Kageyama T. (2002) Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **59**, 288-306.
- Kageyama T., Moriyama A. & Takahashi K. (1983) Purification and characterization of pepsinogens and pepsins from Asiatic black bear, and amino acid sequence determination of the NH<sub>2</sub>-terminal 60 residues of the major pepsinogen. *The Journal of Biochemistry* **94**, 1557-67.
- Kageyama T. & Takahashi K. (1976a) Pepsinogen C and pepsin C from gastric mucosa of Japanese monkey. Purification and characterization. *The Journal of Biochemistry* **80**, 983-92.
- Kageyama T. & Takahashi K. (1976b) Pepsinogens and pepsins from gastric mucosa of Japanese monkey Purification and characterization. *The Journal of Biochemistry* **79**, 455-68.
- Kageyama T. & Takahashi K. (1980) Monkey Pepsinogens and Pepsins. *The Journal of Biochemistry* **88**, 635-45.
- Kageyama T. & Takahashi K. (1984) Rabbit pepsinogens: Purification, characterization, analysis of the conversion process to pepsin and determination of the NH<sub>2</sub>-terminal amino-acid sequences. *European Journal of Biochemistry* **141**, 261-9.

- Kairunnisa K., Vijayalakshmi R. & Natarajan S. (2016) Effect of Butylated Hydroxytoluene on Papain obtained from Fresh Latex of *Carica papaya*. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)* **5**, 89.
- Kamphuis I., Kalk K., Swarte M. & Drenth J. (1984) Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *Journal of molecular biology* **179**, 233-56.
- Karlsson A.H., Klont R.E. & Fernandez X. (1999) Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science* **60**, 255-69.
- Kassell B., Wright C.L. & Ward P.H. (1976) [36] Canine pepsinogen and pepsin. In: *Methods in Enzymology* (pp. 452-8. Elsevier.
- Katsaros G., Katapodis P. & Taoukis P. (2009) High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering* **91**, 42-8.
- Kauffman R., Joo S., Schultz C., Warner R. & Faustman C. (1994) Measuring water-holding capacity in post-rigor muscle. In: *Proceedings 47th reciprocal meat conference*, pp. 70-2.
- Kembhavi A.A., Kulkarni A. & Pant A. (1993) Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. *Appl Biochem Biotechnol* **38**, 83-92.
- Kemp C. & Parr T. (2008) The effect of recombinant caspase 3 on myofibrillar proteins in porcine skeletal muscle.
- Kemp C., Parr T., Bardsley R. & Buttery P. (2006) Comparison of the relative expression of caspase isoforms in different porcine skeletal muscles. *Meat Science* **73**, 426-31.
- Kerboeuf D., Koch C., Le Dréan E. & Lacourt A. (2002) Méthode simplifiée de mesure de la concentration en pepsinogène dans le sérum. *Revue Méd. Vét.* **153**, 707-12.
- Kerth C., Miller M. & Ramsey C. (1995) Improvement of beef tenderness and quality traits with calcium chloride injection in beef loins 48 hours postmortem. *Journal of animal science* **73**, 750-6.
- Ketnawa S., Benjakul S., Martínez-Alvarez O. & Rawdkuen S. (2014) Three-phase partitioning and proteins hydrolysis patterns of alkaline proteases derived from fish viscera. *Separation and Purification Technology* **132**, 174-81.
- Ketnawa S. & Rawdkuen S. (2011) Application of bromelain extract for muscle foods tenderization. *Food and Nutrition Sciences* **2**, 393.

- Kim J.S., Kim Y.O., Ryu H.J., Kwak Y.S., Lee J.Y. & Kang H. (2003) Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant and cell physiology* **44**, 412-4.
- Kim Y.S., Ong A., Bobbili N., DuPonte M.W. & Fukumoto G.K. (2007) Evaluation of Meat Tenderness of Forage-Finished Cattle Produced in Hawai'i, and Factors Affecting the Tenderness. *Food Safety and Technology, FST-27*.
- Kiss E., Szamos J., Tamas B. & Borbas R. (1998) Interfacial behavior of proteins in three-phase partitioning using salt-containing water/tert-butanol systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **142**, 295-302.
- Klomklao S., Kishimura H., Yabe M. & Benjakul S. (2007) Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **147**, 682-9.
- Klont R., Brocks L. & Eikelenboom G. (1998) Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science* **49**, S219-S29.
- Kolle B., McKenna D. & Savell J. (2004) Methods to increase tenderness of individual muscles from beef rounds when cooked with dry or moist heat. *Meat Science* **68**, 145-54.
- Koohmaraie M. (1994) Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science* **36**, 93-104.
- Koohmaraie M. (1996) Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science* **43**, 193-201.
- Koohmaraie M., Crouse J. & Mersmann H. (1989) Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through infusion of calcium chloride: Effect of concentration and ionic strength. *Journal of animal science* **67**, 934-42.
- Koohmaraie M. & Geesink G. (2006) Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* **74**, 34-43.
- Kortt A.A., Hamilton S., Webb E.C. & Zerner B. (1974) Ficins (EC 3.4. 22.3). Purification and characterization of the enzymic components of the latex of *Ficus glabrata*. *Biochemistry* **13**, 2023-8.

- Krid F.A. (2013) Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des proventricules de volailles au profit de la filière lait en Algérie. In: *Institut De La Nutrition, De L'alimentation Et Des Technologies Agro-Alimentaires I.N.A.T.A-A*. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- Kumar A. & Garg N. (2008) Enzyme purification. In: (
- Kundu S., Sundd M. & Jagannadham M.V. (2000) Purification and Characterization of a Stable Cysteine Protease Ervatamin B, with Two Disulfide Bridges, from the Latex of *Ervatamia c oronaria*. *Journal of agricultural and food chemistry* **48**, 171-9.
- Kurokawa T., Uji S. & Suzuki T. (2005) Identification of pepsinogen gene in the genome of stomachless fish, *Takifugu rubripes*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **140**, 133-40.
- L**
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**, 680-5.
- Lang H.M. & Kassell B. (1971) Bovine pepsinogens and pepsins. III. composition and specificity of the pepsins. *Biochemistry* **10**, 2296-301.
- Lansky E. & Paavilainen H. (2011) Figs: the genus *Ficus*. Traditional herbal medicines for modern times. Taylor and Francis, New York.
- Lapendrie A. & Parafita E. (2009) Blade tenderization and injection effects on beef Semitendinosus muscle tenderness and technological yield. . 55th ICOMST (International Congress of Meat Science and Technology)-Copenhagen (Denmark).
- Larbier M. & Leclercq M. (1992) Nutrition et alimentation des volailles. *INRA editions, Paris*, , 347 p.
- Lawrie R. (1998) The conversion of muscle to meat. In: *Lawrie's meat science* (Woodhead Publishing Ltd.
- Lawrie R. & Ledward D.A. (2006) *Lawrie's meat science*, 7th ed. Boca Raton New York Washington, DC: CRC, 600pp.
- Lebret B., Lefaucheur L. & Mourot J. (1999) La qualité de la viande de porc. Influence des facteurs d'élevage non génétiques sur les caractéristiques du tissu musculaire. *Productions Animales 1 (12)*, 11-28.(1999).

- Lecerf J.-M. (2001) *Poids et obésité*. John Libbey Eurotext, Paris, France.
- Lee S., Joo S. & Ryu Y. (2010) Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. *Meat Science* **86**, 166-70.
- Lehmann K. (1907) Studies on the toughness of meat and its origin. *Arch. Hyg* 63, 134-46.
- Lepetit J. (2008) Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Science* **80**, 960-7.
- Li K., Zhang Y., Mao Y., Cornforth D., Dong P., Wang R., Zhu H. & Luo X. (2012) Effect of very fast chilling and aging time on ultra-structure and meat quality characteristics of Chinese Yellow cattle *M. Longissimus lumborum*. *Meat Science* **92**, 795-804.
- Li Z., Jiang F., Li Y., Zhang X. & Tan T. (2013) Simultaneously concentrating and pretreating of microalgae *Chlorella* spp. by three-phase partitioning. *Bioresource technology* **149**, 286-91.
- Lieber R.L. (2002) *Skeletal muscle structure, function, and plasticity*. Lippincott Williams & Wilkins. USA, 13-26, 375 p. .
- Lim T.K. (2015) *Edible medicinal and non-medicinal plants*. Springer, New York
- Listrat A., Lebreton B., Louveau I., Astruc T., Bonnet M., Lefaucheur L. & Bugeon J. (2015) Comment la structure et la composition du muscle déterminent la qualité des viandes ou chairs. *INRA Productions animales* **28**, 125-36.
- Listrat A., Lethias C., Hocquette J., Renand G., Menissier F., Geay Y. & Picard B. (2000) Age-related changes and location of types I, III, XII and XIV collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals. *The Histochemical Journal* **32**, 349-56.
- Liu A., Nishimura T. & Takahashi K. (1994) Structural changes in endomysium and perimysium during post-mortem aging of chicken Semitendinosus muscle—Contribution of structural weakening of intramuscular connective tissue to meat tenderization. *Meat Science* **38**, 315-28.
- Liu C., Xiong Y.L. & Rentfrow G.K. (2011) Kiwifruit protease extract injection reduces toughness of pork loin muscle induced by freeze-thaw abuse. *LWT - Food Science and Technology* **44**, 2026-31.



- Liu W., Ye W., Wang Z., Chao H. & Lian J. (2005) Preparation and Characterization of a Truncated Caricain Lacking 41 Residues from the N-terminal. *The protein journal* **24**, 243-51.
- Liu Y., Zhang Y., Guo H., Wu W., Dong P. & Liang X. (2016) Accelerated digestion of nucleic acids by pepsin from the stomach of chicken. *British poultry science* **57**, 674-81.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Masson P.L. & Sanlaville C. (2005) *Biologie moléculaire de la cellule. 3ème édition*. De Boeck Supérieur. Bruxelles, p. 81.1096p.
- Lorenzen C., Neely T., Miller R., Tatum J., Wise J., Taylor J., Buyck M., Reagan J. & Savell J. (1999) Beef customer satisfaction: Cooking method and degree of doneness effects on the top loin steak. *Journal of animal science* **77**, 637-44.
- Loualiche N. 2020 reportage sur canal algérie sur Tipaza : Culture de fruits exotiques en algérie
- Loureiro D.B., Braia M., Romanini D. & Tubio G. (2017) Partitioning of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in PEG/NaCit aqueous two-phase systems: Structural and functional approach. *Protein expression and purification* **129**, 25-30.
- Lowe G. (1976) The cysteine proteinases. *Tetrahedron* **32**, 291-302.
- Lüllmann-Rauch R. & Sprumont P. (2008) *Histologie*. De Boeck Supérieur.
- Lynn K. & Yaguchi M. (1979) N-terminal homology in three cysteinyl proteases from Papaya latex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* **581**, 363-4.
- Lyon C. & Dickens J. (1993) Effects of electric treatments and wing restraints on the rate of post-mortem biochemical changes and objective texture of broiler pectoralis major muscles deboned after chilling. *Poultry science* **72**, 1577-83.

## M

- Mahajan R.T. & Badgujar S.B. (2010) Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research* **3**, 2048-68.
- Maiti A., Ahlawat S., Sharma D. & Khanna N. (2008) Application of natural tenderizers in meat-a review. *Agricultural Reviews* **29**, 226-30.
- Mancini R. & Hunt M. (2005) Current research in meat color. *Meat Science* **71**, 100-21.

- Marciniszyn J.P. & Kassell B. (1971) Purification and characterization of canine pepsinogen. *Journal of Biological Chemistry* **246**, 6560-5.
- Mashayekhi Mazar F., Shahbaz Mohammadi H., Ebrahimi-Rad M., Gregorian A. & Omidinia E. (2012) Isolation, purification and characterization of a thermophilic alkaline protease from *Bacillus subtilis* BP-36. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* **23**, 7-13.
- McGee M., Henry K., Brooks J., Ray F. & Morgan J. (2003) Injection of sodium chloride, sodium tripolyphosphate, and sodium lactate improves Warner–Bratzler shear and sensory characteristics of pre-cooked inside round roasts. *Meat Science* **64**, 273-7.
- McGeekin B., Sheridan J. & Butler F. (2001) Factors affecting the pH decline in lamb after slaughter. *Meat Science* **58**, 79-84.
- Melendo J., Beltran J., Jaime I., Sancho R. & Roncales P. (1996) Limited proteolysis of myofibrillar proteins by bromelain decreases toughness of coarse dry sausage. *Food chemistry* **57**, 429-33.
- Melody J., Lonergan S.M., Rowe L., Huiatt T.W., Mayes M.S. & Huff-Lonergan E. (2004) Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *Journal of animal science* **82**, 1195-205.
- Mendiratta S., Anjaneyulu A.R., Lakshmanan V., Naveena B. & Bisht G. (2000) Tenderizing and antioxidant effect of ginger extract on sheep meat. *Journal of food science and technology (Mysore)* **37**, 651-5.
- Meunier B., Picard B., Astruc T. & Labas R. (2010) Development of image analysis tool for the classification of muscle fibre type using immunohistochemical staining. *Histochemistry and cell biology* **134**, 307-17.
- Micol D., Jurie C. & Hocquette J.-F. (2010) Qualités sensorielles de la viande bovine. Impacts des facteurs d'élevage. In: *Muscle et viande de ruminants* (pp. 165-74p. Editions Quae, Versailles.
- Micol D., Robelin J. & Geay Y. (1993) Composition corporelle et caractéristiques biologiques des muscles chez les bovins en croissance et à l'engrais. *INRA Productions animales* **6**, 61-9.
- Mitchel R.E., Chaiken I.M. & Smith E.L. (1970) The complete amino acid sequence of papain additions and corrections. *Journal of Biological Chemistry* **245**, 3485-92.

- Moelbert S., Normand B. & De Los Rios P. (2004) Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. *Biophysical chemistry* **112**, 45-57.
- Mondal K., Jain S., Teotia S. & Gupta M.N. (2006) Emerging options in protein bioseparation. *Biotechnology annual review* **12**, 1-29.
- Monti R., Basilio C.A., Trevisan H.C. & Contiero J. (2000) Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **43**, 501-7.
- Morcelle S.R., Trejo S.A., Canals F., Avilés F.X. & Priolo N.S. (2004) Funastrain c II: a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*. *The protein journal* **23**, 205-15.
- Morton J.F. (1987) Papaya *Carica papaya* L. In: *Fruits of Warm Climates*. (pp. 336-46. Creative Resources Inc, Winterville, N.C. .
- Mostofa M., McKellar Q. & Eckersall P. (1990) Comparison of pepsinogen forms in cattle, sheep and goats. *Research in veterinary science* **48**, 33-7.
- Muto N. & Tani S. (1979) Purification and characterization of rat pepsinogens whose contents increase with developmental progress. *The Journal of Biochemistry* **85**, 1143-9.
- N**
- Nadar S.S., Pawar R.G. & Rathod V.K. (2017) Recent Advances in Enzyme Extraction Strategies: A Comprehensive Review. *International journal of biological macromolecules*.
- Nafi A., Ling F.H., Bakar J. & Ghazali H.M. (2014) Partial characterization of an enzymatic extract from Bentong ginger (*Zingiber officinale* var. Bentong). *Molecules* **19**, 12336-48.
- Nakasone H.Y. & Paull R.E. (1998) *Tropical fruits*. Cab International, Wallingford, UK.
- Nalinanon S., Benjakul S. & Kishimura H. (2010) Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food chemistry* **121**, 49-55.
- Nallamsetty S., Kundu S. & Jagannadham M.V. (2003) Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*. *Journal of Protein Chemistry* **22**, 1-13.

- Narayan A., Madhusudhan M. & Raghavarao K. (2008) Extraction and purification of Ipomoea peroxidase employing three-phase partitioning. *Appl Biochem Biotechnol* **151**, 263-72.
- Narsaiah K., Jha S.N., Devatkal S.K., Borah A., Singh D.B. & Sahoo J. (2011) Tenderizing effect of blade tenderizer and pomegranate fruit products in goat meat. *Journal of food science and technology* **48**, 61-8.
- Nassar A. & Newbury H. (1987) Ficin production by callus cultures of *Ficus carica*. *Journal of plant physiology* **131**, 171-9.
- Naveena B. & Mendiratta S. (2001) Tenderisation of spent hen meat using ginger extract. *British poultry science* **42**, 344-9.
- Naveena B. & Mendiratta S. (2004) The tenderization of buffalo meat using ginger extract. *Journal of Muscle Foods* **15**, 235-44.
- Naveena B., Mendiratta S. & Anjaneyulu A. (2004) Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumis trigonus* Roxb (Kachri) and *Zingiber officinale* roscoe (Ginger rhizome). *Meat Science* **68**, 363-9.
- Nevaldine B. & Kassell B. (1971) Bovine pepsinogen and pepsin. IV. A new method of purification of the pepsin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **250**, 207-9.
- Nielsen P.K. & Foltmann B. (1995) Purification and characterization of porcine pepsinogen B and pepsin B. *Archives of biochemistry and biophysics* **322**, 417-22.
- Ningthoujam D.S., Kshetri P., Sanasam S. & Nimaichand S. (2009) Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetes. *World Appl Sci J* **7**, 907-16.
- Nishimura T., Ra Rhue M., Okitani A. & Kato H. (1988) Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agricultural and biological chemistry* **52**, 2323-30.
- Nitsawang S., Hatti-Kaul R. & Kanasawud P. (2006) Purification of papain from *Carica papaya* latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and microbial technology* **39**, 1103-7.

Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M. & Dadie A. (2009) Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J Food Technol* **7**, 20-9.

## O

Obregón W.D., Arribére M.C., Del Valle S.M., Liggieri C., Caffini N. & Priolo N. (2001) Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *Journal of Protein Chemistry* **20**, 317-25.

Obuz E., Dikeman M., Grobbel J., Stephens J. & Loughin T. (2004) Beef longissimus lumborum, biceps femoris, and deep pectoralis Warner–Bratzler shear force is affected differently by endpoint temperature, cooking method, and USDA quality grade. *Meat Science* **68**, 243-8.

Öner M. & Akar B. (1993) Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in gaziantep cheese production. *LWT-food Science and Technology* **26**, 318-21.

Ouali A. (1990) Meat tenderization: possible causes and mechanisms. A review. *Journal of Muscle Foods* **1**, 129-65.

Ouali A. (1991) Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande. *INRA Productions animales* **4**, 195-208.

Ouali A. (1992) Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie* **74**, 251-65.

Ouali A., Gagaoua M., Boudida Y., Becila S., Boudjellal A., Herrera-Mendez C.H. & Sentandreu M.A. (2013) Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Science* **95**, 854-70.

Ouali A., Herrera-mendez C., Becila S. & Boudjellal A. (2006a) Maturation des viandes: Une nouvelle donne pour la compréhension de la maturation des viandes. *VIANDES ET PRODUITS CARNES* **24**, 205-13.

Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L. & Sentandreu M.A. (2006b) Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science* **74**, 44-58.

- Ouali A. & Talmant A. (1990) Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science* **28**, 331-48.
- Oukabli A. (2003a) Le figuier: un patrimoine génétique diversifié à exploiter. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA* **106**.
- Oukabli A. (2003b) Le figuier: un patrimoine génétique diversifié à exploiter. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA. Fiche technique Transfert de Technologie en Agriculture. Unité de Recherche sur l'Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto-génétiques INRA, Centre Régional de Meknès. Maroc.* **106**.
- Oury M., Agabriel J., Blanquet J., Micol D., Picard B., Laboure H., Roux M. & Dumont R. (2007) Quality classification of the muscle rectus abdominis of Charolais Heifers. *Publication-European Association For Animal Production* **123**, 205.
- Oury M.P., Quillard F., Durand Y., Micol D. & Dumont R. (2010) Construction d'une grille de notation du «grain de viande» sur animal vivant chez les bovins charolais. 13èmes Journées «Sciences du Muscle et Technologies des Viandes», 213-2014.
- Özer B., Akardere E., Çelem E.B. & Önal S. (2010) Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochemical Engineering Journal* **50**, 110-5.
- P**
- Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I. & Luis A. (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 521-30.
- Pascual M. & Pla M. (2007) Changes in carcass composition and meat quality when selecting rabbits for growth rate. *Meat Science* **77**, 474-81.
- Patel B.K. & Jagannadham M.V. (2003) A high cysteine containing thiol proteinase from the latex of *Ervatamia heyneana*: purification and comparison with ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 6326-34.
- Patil V.V. & Patil V.R. (2011) *Ficus carica* Linn.-an overview. *Research Journal of Medicinal Plant* **5**, 246-53.
- Pawar V., Mule B. & Machewad G. (2007) Effect of marination with ginger rhizome extract on properties of raw and cooked chevon. *Journal of Muscle Foods* **18**, 349-69.

- Payne C.T. (2009) Enzymes in Meat Systems. In: *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications* (ed. by Tarté R), pp. 173-98. Springer Science + Business Media, new york.
- Pendzhiev A. (2002) Proteolytic enzymes of papaya: medicinal applications. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **36**, 315-7.
- Permanne R.L. (1964) La culture du papaya en vue de la production de papaïne. . *Bull. Doc. Tech. Agric.* **4**, 12.
- Picard B., Robelin J. & Geay Y. (1995) Influence of castration and postnatal energy restriction on the contractile and metabolic characteristics of bovine muscle. In: *Annales de zootechnie*, pp. 347-57. EDP Sciences.
- Picard B., Kammoun M., Gagaoua M., Barboiron C., Meunier B., Chambon C. & Cassar-Malek I. (2016) Calcium homeostasis and muscle energy metabolism are modified in HspB1-null mice. *Proteomes* **4**, 17.
- Pichová I. & Kostka V. (1990) Molecular characteristics of pepsinogen and pepsin from duck glandular stomach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **97**, 89-94.
- Pierson J.T., Dietzgen R.G., Shaw P.N., Roberts-Thomson S.J., Monteith G.R. & Gidley M.J. (2012) Major Australian tropical fruits biodiversity: Bioactive compounds and their bioactivities. *Molecular nutrition & food research* **56**, 357-87.
- Pietrasik Z., Aalhus J.L., Gibson L.L. & Shand P.J. (2010) Influence of blade tenderization, moisture enhancement and pancreatin enzyme treatment on the processing characteristics and tenderness of beef semitendinosus muscle. *Meat Science* **84**, 512-7.
- Pike R. & Dennison C. (1989) Protein fractionation by three phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures. *Biotechnology and bioengineering* **33**, 221-8.
- Pletschke B.I., Naudé R.J. & Oelofsen W. (1995a) Ostrich pepsins I and II: a kinetic and thermodynamic investigation. *The international journal of biochemistry & cell biology* **27**, 1293-302.
- Pletschke B.I., Naudé R.J., Oelofsen W., Muramoto K. & Yamauchi F. (1995b) Ostrich pepsinogens I and II: Purification, activation and chemical and immunochemical characterization of the enzymes from the proventriculus. *The international journal of biochemistry & cell biology* **27**, 613-24.



- Polaina J. & MacCabe A.P. (2007) *Industrial enzymes*. Springer.
- Pouliot E., 2015. Optimisation de la qualité de la viande d'agneau par l'utilisation et la compréhension des traitements postabattages et des événements postmortem. Thèse Doctorat en sciences animales Philosophiæ Doctor (Ph.D.) Université laval .Québec.Canda .3-57p.
- Powers J.C., Asgian J.L., Ekici Ö.D. & James K.E. (2002) Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical reviews* **102**, 4639-750.
- Priolo N., Del Valle S.M., Arribère M.C., López L. & Caffini N. (2000) Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *Journal of Protein Chemistry* **19**, 39-49.
- Puolanne E. & Halonen M. (2010) Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat Science* **86**, 151-65.
- Purslow P.P. (2005) Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Science* **70**, 435-47.
- Purwanto M.G.M. (2016) The Role and Efficiency of Ammonium Sulphate Precipitation in Purification Process of Papain Crude Extract. *Procedia Chemistry* **18**, 127-31.

## Q

- Qihe C., Guoqing H., Yingchun J. & Hui N. (2006) Effects of elastase from a *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Food chemistry* **98**, 624-9.

## R

- Raisonnier A. (2004. ) Digestion-Detoxification. In: *Université Pierre et Marie Curie Faculté de médecine*, p. 163.
- Raj S.J. & Joseph B. (2011) Pharmacognostic and traditional properties of *Cissus quadrangularis* Linn-An overview. *International Journal of Pharma and Bio Sciences2011* **2**, 131-9.
- Rajeeva S. & Lele S. (2011) Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma* sp. WR-1. *Biochemical Engineering Journal* **54**, 103-10.

- Raksakulthai R. & Haard N.F. (2001) Purification and characterization of a carboxypeptidase from squid hepatopancreas (*Illex illecebrosus*). *Journal of agricultural and food chemistry* **49**, 5019-30.
- Ramet J. (1997) La presure et les enzymes coagulantes. In: *Le Fromage* (pp. 165-73. Lavoisier Tec and Doc Paris.
- Rani K., Rana R. & Datt S. (2012) Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences* **2**, 12-8.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. & Deshpande V.V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews* **62**, 597-635.
- Raufman J. (2004) Pepsin. *Encyclopedia of Gastroenterology*, Johnson L R. Ed., Academic Press, Amsterdam **3**, 147-8.
- Rawdkuen S. & Benjakul S. (2012) Biochemical and microstructural characteristics of meat samples treated with different plant proteases. *African Journal of Biotechnology* **11**, 14088-95.
- Rawdkuen S., Chaiwut P., Pintathong P. & Benjakul S. (2010) Three-phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex. *Biochemical Engineering Journal* **50**, 145-9.
- Rawdkuen S., Vanabun A. & Benjakul S. (2012) Recovery of proteases from the viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning. *Process Biochemistry* **47**, 2566-9.
- Rehfeldt C. & Kuhn G. (2006) Consequences of birth weight for postnatal growth performance and carcass quality in pigs as related to myogenesis. *Journal of animal science* **84**, E113-E23.
- Rhodes D.N. & Dransfield E. (1973) Effect of pre-slaughter injections of papain on toughness in lamb muscles induced by rapid chilling. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **24**, 1583-8.
- Richter C., Tanaka T. & Yada R. (1998) Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *The Biochemical journal* **335**, 481-90.

- Ritonja A., Buttle D.J., Rawlings N.D., Turk V. & Barrett A.J. (1989) Papaya proteinase IV amino acid sequence. *FEBS letters* **258**, 109-12.
- Robelin J. & Casteilla L. (1990) Différenciation, croissance et développement du tissu adipeux.
- Robert A., Dann L. & Lown G. (1974) The specificity of the S'1 subsite of papain. *J. Biochem* **141**, 495-501.
- Rocha M.V., Di Giacomo M., Beltramino S., Loh W., Romanini D. & Nerli B.B. (2016) A sustainable affinity partitioning process to recover papain from *Carica papaya* latex using alginate as macro-ligand. *Separation and Purification Technology* **168**, 168-76.
- Rodriguez A.E., Ducker G.S., Billingham L.K., Martinez C.A., Mainolfi N., Suri V., Friedman A., Manfredi M.G., Weinberg S.E. & Rabinowitz J.D. (2019) Serine metabolism supports macrophage IL-1 $\beta$  production. *Cell metabolism* **29**, 1003-11. e4.
- Rohwer (2013) *Guide des plantes tropicales: A l'état sauvage ou acclimatées*. Delachaux et Niestlé.
- Roncalés P., Geesink G., Van Laack R., Jaime I., Beltran J., Barnier V. & Smulders F. (1995) Meat tenderisation: enzymatic mechanisms. *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality*, 311-32.
- Roseiro L.B., Barbosa M., Ames J.M. & Wilbey R.A. (2003) Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology* **56**, 76-85.
- Roudot A.-C. (2002) *Rheology and texture analysis of foods*. Editions Tec & Doc. 189p
- Roussilhes V. (1994) Etude ultrastructurale des gels de protéines myofibrillaires de deux types musculaires. Mémoire d'étude approfondies option Sciences Alimentaires. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Roy I. & Gupta M.N. (2002) Three-phase affinity partitioning of proteins. *Analytical biochemistry* **300**, 11-4.
- Roy I., Mondal K. & Gupta M.N. (2014) Simultaneous Purification and Refolding of Proteins by Affinity Precipitation and Macro (Affinity Ligand)-Facilitated Three Phase Partitioning (MLFTPP). *Protein Downstream Processing: Design, Development and Application of High and Low-Resolution Methods*, 111-23.

- Roy I., Sharma A. & Gupta M.N. (2004) Three-phase partitioning for simultaneous renaturation and partial purification of *Aspergillus niger* xylanase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **1698**, 107-10.
- Ryle A. (1970) [20] The porcine pepsins and pepsinogens. In: *Methods in Enzymology* (pp. 316-36. Elsevier.
- Ryle A. & Hamilton M.P. (1966) Pepsinogen C and pepsin C. Further purification and amino acid composition. *Biochemical Journal* **101**, 176-83.

## S

- Saláková A. (2012) Instrumental measurement of texture and color of meat and meat products. *maso-international-2012-2*, pp 107- 14.
- Sams A., Birkhold S. & Mills K. (1991) Fragmentation and tenderness in breast muscle from broiler carcasses treated with electrical stimulation and high-temperature conditioning. *Poultry science* **70**, 1430-3.
- Sánchez-Chiang L., Cisternas E. & Ponce O. (1987) Partial purification of pepsins from adult and juvenile salmon fish *Oncorhynchus keta*. Effect of NaCl on proteolytic activities. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* **87**, 793-7.
- Sandhya C., Sumantha A. & Pandey A. (2004) Proteases. In: *Enzyme Technology* (ed. by A. Pandey CW, C.R. Soccol, C. Larroche (Eds.)), pp. 312–25. Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India.
- Sanny C., Hartsuck J.A. & Tang J. (1975) Conversion of pepsinogen to pepsin. Further evidence for intramolecular and pepsin-catalyzed activation. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 2635-9.
- Santé V., Renou J.-P., Fernandez X. & Monin G. (2001) Nouvelles méthodes de mesure de la qualité des viandes de volaille. *Productions animales* **14**, 247-54.
- Saxena L., Iyer B.K. & Ananthanarayan L. (2007) Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor. *Process Biochemistry* **42**, 491-5.
- Schaller A. (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**, 183-97.

- Schenkova N., Šikulová M., Jelenikova J., Pipek P., Houška M. & Marek M. (2007) Influence of high isostatic pressure and papain treatment on the quality of beef meat. *High Pressure Research* **27**, 163-8.
- Schiaffino S., Gorza L., Sartore S., Saggin L., Ausoni S., Vianello M., Gundersen K. & LØmo T. (1989) Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *Journal of Muscle Research & Cell Motility* **10**, 197-205.
- Schiaffino S. & Reggiani C. (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological reviews* **76**, 371-423.
- Schneider B., Renema R., Betti M., Carney V. & Zuidhof M. (2012) Effect of holding temperature, shackling, sex, and age on broiler breast meat quality. *Poultry science* **91**, 468-77.
- Schwimmer S. (1981) *Source book of food enzymology*. AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut, USA.
- Şen A., Eryilmaz M., Bayraktar H. & Önal S. (2011) Purification of  $\alpha$ -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning. *Separation and Purification Technology* **83**, 130-6.
- Senphan T. & Benjakul S. (2014) Use of the combined phase partitioning systems for recovery of proteases from hepatopancreas of Pacific white shrimp. *Separation and Purification Technology* **129**, 57-63.
- Sentandreu M., Coulis G. & Ouali A. (2002) Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology* **13**, 400-21.
- Sequeiros C., Torres M., Trejo S., Esteves J., Natalucci C. & López L. (2005) Philibertain g I, the most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn.(Apocynaceae). *The protein journal* **24**, 445-53.
- Sequeiros C., Torres M.J., Nieves M.L., Caffini N.O., Natalucci C.L., López L.M. & Trejo S.A. (2016) The proteolytic activity of *Philibertia gilliesii* latex. Purification of Philibertain g II. *Appl Biochem Biotechnol* **179**, 332-46.
- Shah M.A., Mir S.A. & Paray M.A. (2014) Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology* **94**, 5-16.

- Sharma A. & Gupta M. (2001) Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional protease/amylase inhibitor. *Process Biochemistry* **37**, 193-6.
- Shaw B. & Wright C.L. (1976) The pepsinogens of cat gastric mucosa and the pepsins derived from them. *Digestion* **14**, 142-52.
- Shugerman R., Hirschowitz B., Bhowan A., Schrohenloher R. & Spenny J. (1982) A unique "mini" pepsinogen isolated from bullfrog esophageal glands. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 795-8.
- Siar E.-H., Zaak H., Kornecki J.F., Zidoune M.N., Barbosa O. & Fernandez-Lafuente R. (2017) Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry* **58**, 98-104.
- Sidrach L., García-Cánovas F., Tudela J. & Rodríguez-López J.N. (2005) Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry* **66**, 41-9.
- Simpson B.K. (2000) Digestive proteinases from marine animals. In: *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality* (eds. by Haard N & Simpson B), pp. 191-214. Food Science and Technology. Marcel Dekker, New York.
- Simpson B.K., Nollet L.M., Toldrá F., Benjakul S., Paliyath G. & Hui Y. (2012) *Food biochemistry and food processing*. John Wiley & Sons.
- Singh A.N., Shukla A.K., Jagannadham M. & Dubey V.K. (2010) Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. *Process Biochemistry* **45**, 399-406.
- Sinkovits A.F., Bryksa B.C., Tanaka T. & Yada R.Y. (2007) Understanding the structure–function role of specific catalytic residues in a model food related enzyme: Pepsin. *Enzyme and microbial technology* **40**, 1175-80.
- Smith G., Culp G. & Carpenter Z. (1978) Postmortem aging of beef carcasses. *Journal of food science* **43**, 823-6.
- Smith J. & Hong-Shum L. (2011) *Food additives data book*. John Wiley & Sons.

- Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y., Mizukami Y., Ichihara Y. & Takahashi K. (1983) Primary structure of human pepsinogen gene. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 5306-11.
- Srinivasan S., Xiong Y.L., Blanchard S.P. & Tidwell J.H. (1997) Physicochemical Changes in Prawns (*Machrobrachium rosenbergii*) Subjected to Multiple Freeze-Thaw Cycles. *Journal of food science* **62**, 123-7.
- Starley I.F., Mohammed P., Schneider G. & Bickler S.W. (1999) The treatment of paediatric burns using topical papaya. *Burns* **25**, 636-9.
- Staron T. (1982) *Viandes et alimentation humaine. Edition Apria, Paris. 110p.*
- Starr F., Starr K. & Loope L. (2003) *Ficus carica: Edible fig, Moraceae. Maui, Hawai'i, United States Geological Survey--Biological Resources Division, Haleakala Field Station, (pp 1–6).*
- Streicher E., Naudé R.J. & Oelofsen W. (1985) The isolation and characterization of pepsinogens from the proventriculus of the ostrich *Struthio camelus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **82**, 67-72.
- Sugiura M. & Sasaki M. (1974) Studies on proteinases from *Ficus carica* var. *Hōraishi*. V. Purification and properties of a sugar-containing proteinase (Ficin S). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **350**, 38-47.
- Sullivan G.A. & Calkins C.R. (2010) Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science* **85**, 730-4.
- Sumantha A., Larroche C. & Pandey A. (2006) Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology* **44**, 211.
- Sumner I.G., Harris G.W., Taylor M., Pickersgill R.W., Owen A.J. & Goodenough P.W. (1993) Factors effecting the thermostability of cysteine proteinases from *Carica papaya*. *European Journal of Biochemistry* **214**, 129-34.
- Sun X. (2009) Utilization of restructuring technology in the production of meat products: a review. *CyTA–Journal of Food* **7**, 153-62.
- Suzuki M., Narita Y., Oda S.-I., Moriyama A., Takenaka O. & Kageyama T. (1999) Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **122**, 453-60.



Szczesniak A.S. & Torgeson K.W. (1965) Methods of meat texture measurement viewed from the background of factors affecting tenderness. *Adv. Food Res* **14**, 165.

### T

Taber L.A. (1998) Biomechanical growth laws for muscle tissue. *Journal of theoretical biology* **193**, 201-13.

Takagi H., Kondou M., Hisatsuka T., Nakamori S., Tsai Y.C. & Yamasaki M. (1992) Effects of an alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Journal of agricultural and food chemistry* **40**, 2364-8.

Takahashi K., Kim O.H. & Yano K. (1987) Calcium-induced weakening of Z-disks in postmortem skeletal muscle. *The Journal of Biochemistry* **101**, 767-73.

Tan K.H. & Lovrien R. (1972) Enzymology in aqueous-organic cosolvent binary mixtures. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 3278-85.

Tanji M., Yakabe E., Kageyama T., Yokobori S.-i., Ichinose M., Miki K., Ito H. & Takahashi K. (2007) Purification and characterization of pepsinogens from the gastric mucosa of African coelacanth, *Latimeria chalumnae*, and properties of the major pepsins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **146**, 412-20.

Tanji M., Yakabe E., Kubota K., Kageyama T., Ichinose M., Miki K., Ito H. & Takahashi K. (2009) Structural and phylogenetic comparison of three pepsinogens from Pacific bluefin tuna: molecular evolution of fish pepsinogens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **152**, 9-19.

Tappel A., Miyada D., Sterling C. & Maier V. (1956) Meat tenderization. II. Factors affecting the tenderization of beef by papain. *Journal of food science* **21**, 375-83.

Taylor R.G., Geesink G.H., Thompson V.F., M. K. & Goll D.E. (1995) Is Z-Disk Degradation Responsible for Postmortem Tenderization?'. *J Anim Sci* **73**, 1351-67.

Temiz H., Aykut U., Okumus E. & Turhan S. (2007) The partial purification and properties of pepsin obtained from Turkey proventriculus. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **12**, 450-6.

Timpl R., Rohde H., Gehron Robey P., I. R.S., Foidart J.-M. & Martin G.R. (1979) The isolation and localization of laminin by Rupert Timpl. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 9933-7.

- Toldrá F. (2008) *Meat biotechnology*. Springer Science & Business Media.
- Tonelli N. & Gallouin F. (2013) *Des fruits et des graines comestibles du monde entier*. Lavoisier.
- Touraille C. (1986) Réactions sensorielles à la structure des produits. PP 183-193. In: La restructuration des viandes (ed. by Dumont BL), p. p 514. CNRS-CNERNA. Ed ERTI.
- Touraille C. (1994) Effect of muscle characters on organoleptic traits in meat. *Renc Rech Ruminants* **1**, 169-75.
- Tsai Y.-C., Yamasaki M., Yamamoto-Suzuki Y. & Tamura G. (1983) A new alkaline elastase of an alkalophilic bacillus. *Biochemistry international* **7**, 577-83.
- U**
- Uttaro B. & Aalhus J. (2007) Effect of thawing rate on distribution of an injected salt and phosphate brine in beef. *Meat Science* **75**, 480-6.
- V**
- Valin C. (1988) Différenciation du tissu musculaire. Conséquences technologiques pour la filière viande. *Reproduction Nutrition Développement* **28**, 845-56.
- Valin C. (1995) Animal and muscle variability in tenderisation: Possible causes. In: *Expression of tissue proteinases and regulation of protein as related to meat quality* (eds. by Ouali A, Deneyer DI & M. SFJ), pp. 435-42. ECCEAMST, Utrecht, Pays-Bas.
- Van Oort M. (2010) Enzymes in food technology – introduction. In: *Enzymes in food technology* (ed. by Whitehurst RJaVO, Maarten ), pp. 1-17. Blackwell Publishing Ltd.
- Veiseth E., Shackelford S., Wheeler T. & Koohmaraie M. (2001) Technical note: Comparison of myofibril fragmentation index from fresh and frozen pork and lamb longissimus. *Journal of animal science* **79**, 904-6.
- Velooralappil N.J., Robinson B.S., Selvanesan P., Sasidharan S., Kizhakkepawothail N.U., Sreedharan S., Prakasan P., Moolakkariyil S.J. & Sailas B. (2013) Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research* **1**, 39-51.
- Verbeke W., Pérez-Cueto F.J., de Barcellos M.D., Krystallis A. & Grunert K.G. (2010) European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Science* **84**, 284-92.

Villegas V.N. (1997) *Carica papaya* L. In: *Plant Resources of South-East Asia 2: Edible Fruits and Nuts*. (ed. by EWM Verheij RC, eds.). JSTOR, PROSEA Foundation, Bogor, Indonesia.

## W

Wald M., Rehbein H., Beermann C., Bußmann B. & Schwarz K. (2016) Purification and characterization of pepsinogen and pepsin from the stomach of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *European Food Research and Technology* **242**, 1925-35.

Ward W.W. (2008) Three-phase partitioning method for purifying a protein. Google Patents.

Ward W.W. (2009) Three-phase partitioning for protein purification. *Innovations Pharm. Technol.*, 28-34.

Wati R.K., Theppakorn T., Benjakul S. & Rawdkuen S. (2009) Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds. *Process Biochemistry* **44**, 1307-14.

Watson B. (1997) Agronomy/agroclimatology notes for the production of banana.

Watson D.C., Yaguchi M. & Lynn K. (1990) The amino acid sequence of chymopapain from *Carica papaya*. *Biochemical Journal* **266**, 75-81.

Wattanachant S., Benjakul S. & Ledward D.A. (2005) Effect of heat treatment on changes in texture, structure and properties of Thai indigenous chicken muscle. *Food chemistry* **93**, 337-48

Weissman J., Guthrie C. & Fink G.R. (2010) *Guide to yeast genetics: functional genomics, proteomics and other systems analysis*. Academic Press.

Weston A., Rogers R. & Althen T. (2002) Review: The role of collagen in meat tenderness. *The Professional Animal Scientist* **18**, 107-11.

Whitaker J.R. (1972) *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Mercel Dekker. Inc. USA.

Wu T., Sun L.-C., Du C.-H., Cai Q.-F., Zhang Q.-B., Su W.-J. & Cao M.-J. (2009) Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food chemistry* **115**, 137-42.

## X

Xia X., Kong B., Liu Q. & Liu J. (2009) Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze–thaw cycles. *Meat Science* **83**, 239-45.

## Y

Yakabe E., Tanji M., Ichinose M., Goto S., Miki K., Kurokawa K., Ito H., Kageyama T. & Takahashi K. (1991) Purification, characterization, and amino acid sequences of pepsinogens and pepsins from the esophageal mucosa of bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Journal of Biological Chemistry* **266**, 22436-43.

Yamamoto A. (1975) Proteolytic enzymes. In: *Enzymes in food processing* (ed. by Reed G), pp. 124-79, 573 p. Academic press.

Yan J.-K., Wang Y.-Y., Qiu W.-Y., Ma H., Wang Z.-B. & Wu J.-Y. (2018) Three-phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes. *Critical reviews in food science and nutrition* **58**, 2416-31.

Ying M., Huang F., Ye H., Xu H., Shen L., Huan T., Huang S., Xie J., Tian S. & Hu Z. (2015) Study on interaction between curcumin and pepsin by spectroscopic and docking methods. *International journal of biological macromolecules* **79**, 201-8.

Yonezawa H., Nonaka T., Ucmkoba T., Hattori S., Ohno M. & Kaneda M. (2000) Isolation and characterization of pepsinogen from *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). *The Journal of Biochemistry* **127**, 755-60.

Yu L., Lee E., Jeong J., Paik H., Choi J. & Kim C. (2005) Effects of thawing temperature on the physicochemical properties of pre-rigor frozen chicken breast and leg muscles. *Meat Science* **71**, 375-82.

## Z

Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A., Dransfield E. & Ouali A. (1996) Predicting variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis. *Meat Science* **43**, 321-33.

Zhao L. (2011) Partition of Pepsinogen from the Stomach of Red Perch (*Sebastes Marinus*) by Aqueous Two Phase Systems.

- Zhao L., Budge S.M., Ghaly A.E., Brooks M.S. & Dave D. (2011) Extraction purification and characterization of fish pepsin: a critical review. *Journal of Food Processing & Technology* **2**.
- Zhou Q., Fu X.-P., Zhang L.-J., Su W.-J. & Cao M.-J. (2007) Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus* Houttuyn) pepsinogens and pepsins. *Food chemistry* **103**, 795-801.
- Zhou Q., Liu G.-M., Huang Y.-Y., Weng L., Hara K., Su W.-J. & Cao M.-J. (2008) Pepsinogens and pepsins from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Journal of agricultural and food chemistry* **56**, 5401-6.
- Ziane F., Gagaoua M. & Nait Rabah S. (2014) Some endemic Algerian plant proteases as milk-clotting enzymes and meat tenderizers: an overview. In: *Deuxièmes journées scientifiques de l'agro-alimentaire JSAA*, Sousse, Tunisie, affiche n° 88, p159.
- Zerizer H., Merouane F., Bougherara C., Gagaoua M., Hafid K., Boughachiche F., Raoult D. & Boulahrouf A. (2016) Characterization of proteolytic enzyme secreted by *Streptomyces cinereoruber* ssp. *cinereoruber* isolated from human pleural fluid. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* **4**, 276-86.
- Zunjar V., Mammen D., Trivedi B. & Daniel M. (2011) Pharmacognostic, physicochemical and phytochemical studies on *Carica papaya* Linn. leaves. *Pharmacognosy Journal* **3**, 5-8.

# Liste de Publications

---

**Articles**

**Hafid, K.**, John, J., Sayah, T. M., Domínguez, R., Becila, S., Lamri, M., Dib A. L., Lorenzo J. M. & Gagaoua, M. (2020). One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using Three Phase Partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent. *International journal of biological macromolecules* 146: 798-810.. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.048> (ISSN/: 0141-8130; e-ISSN: 1879-0003)

Mohammed Gagaoua, Nawel Boucherba, Amel Bouanane-Darenfed, Ferhat Ziane, Sabrina Nait-Rabah, **Kahina Hafid**, Hiba-Ryma Boudechicha. (2014). Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica L.*) latex. *Separation and Purification Technology* 132, 461–467. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.05.050>

Mohammed Gagaoua, Naouel Hoggas, **Kahina Hafid**. (2015). Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale Roscoe rhizomes*. *International Journal of Biological Macromolecules* 73, 245–252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.069>

Gagaoua M., **Hafid K.** & Hoggas N. (2016) Data in Support of Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale Roscoe rhizomes*. *Data in Brief* 6, 634–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.01.014>. (c: ISSN:26909379, e-ISSN:PMC4735474)

Mohammed Gagaoua, **Kahina Hafid** (2016) Three Phase Partitioning system, an emerging non-chromatographic tool for proteolytic enzymes recovery and purification. *Biosensors Journal* 5: 135. <http://dx.doi.org/10.4172/2090-4967.1000134> (c: ISSN: 2090-4967BJR)

**Kahina Hafid**, Mohammed Gagaoua, Hiba-Ryma Boudechicha, Sabrina Nait Rabah, Ferhat Ziane, Meriem Sellama, Samira Becila and Abdelghani Boudjellal, 2016. A Comparison of the Carcass and Meat Quality of ISA (F15) Spent Hens Slaughtered at Two Different Ages. *American Journal of Food Technology*, 11: 134-142. <http://dx.doi.org/10.3923/ajft.2016.134.142>. (c: ISSN: 1557-4571, HAL Id : hal-01568770, version 1)

Gagaoua, M., Ziane, F., Nait Rabah, S., Boucherba, N., Ait Kaki El-Hadef El-Okki, A., Bouanane-Darenfed, A. and **Hafid, K.** (2017). Three Phase Partitioning, a scalable method for the purification and recovery of *Cucumis*, a milk-clotting enzyme, from the juice of *Cucumis melo* var. *reticulatus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.060>. (A) ISSN: 0141-8130, eISSN: 1879-0003)

**Proceeding**

Becila S., **Hafid K.**, Gagaoua M., Boudjellal A., Agli A. Et Ouali A. Prédiction de la tendreté de la viande d'agneau par pénétrométrie. 15èmes Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes. 4 et 5 Novembre 2014. Clermont-Ferrand. France.

**Kahina Hafid**, Mohammed Gagaoua, Hiba-Ryma Boudechicha, Samira Becila and Abdelghani Boudjellal. A comparison of the carcass and meat quality of isa (f15) spent hens at two different ages. 61st International Congress of Meat Science and Technology, 23-28th August 2015, Clermont-Ferrand, France.

Mohammed Gagaoua , **Kahina Hafid**, Ferhat Ziane, Sabrina Nait Rabah. Plant Milk-Clotting Enzymes, a New Emerging Technique for their Purification using Three Phase Partitioning



system. 29th EFFoST International Conference Proceedings. 10-12 November 2015, Athens, Greece.

**Kahina HAFID**, Mohammed GAGAOUA, Hiba-Ryma BOUDECHICHA, Samira BECILA, Abdelghani BOUDJELLAL (2016). Proteomic analysis of the breast muscle of aged spent hens and relationships of sarcoplasmic and myofibrillar proteins with meat tenderness. In: X Annual Congress of the European Proteomics Association (EuPA) (ed. by Ozpinar PA), Istanbul, Turkey. between 22-25 June 2016.

Gagaoua M., Laouar K., Hammou I. & **Hafid K.** (2016). Towards Proteomic Biomarkers of Water Holding Capacity of Algerian Dromedary One-Humped Camel Meat: proteome basis concerning the drip loss defect In: X Annual Congress of the European Proteomics Association (EuPA) (ed. by Ozpinar PA), Istanbul, Turkey.

Gagaoua M., Laouar K., Hammou I. & **Hafid K.** (2016). Proteomic biomarkers of water holding capacity of Algerian dromedary one-humped camel Meat. In: 30th EFFoST International Conference, Vienna, Austria.

### Communication orale

**Kahina HAFID**, Taha Mansour SAYAH, Mounir AYAD, Lamia SENANI, Katar-Ennada SINACER, Samira BECILA, Mohammed GAGAOUA (2018) Extraction, purification partielle et caractérisation de la pepsine de proventricules de poulet par le système de répartition en trois phases en vue de son application en industrie agro-alimentaire. Séminaire International sur L'Agroalimentaire « SIA 2018 » 16-17 Octobre, 2018. Guelma, Algérie

**Kahina HAFID**, Ferhat ZIANE, Sabrina NAIT RABAH, Naouel HOGGAS, Mohammed GAGAOUA. Purification, caractérisation et propriétés coagulante de la zingibaine du rhizome du gingembre (*zingiber officinale*). Séminaire international des biotechnologies. Les 19,20 et 21 Octobre 2015. Constantine.

Mohammed GAGAOUA, **Kahina HAFID**. Three phase partitioning: a potential non-chromatographic bioseparation technique of plant milk-clotting enzymes. Séminaire International des biotechnologies appliquées à l'agriculture, la santé et l'environnement. Du 17-19 avril 2016. Khenchela.

### Communication affichée

**Kahina HAFID**, Mohammed GAGAOUA, Samira BECILA, Abdelghani BOUDJELLAL. Vers une nouvelle approche par traitement d'image pour la mesure de la capacité de rétention d'eau de la viande. Séminaire international des biotechnologies. Les 19,20 et 21 Octobre 2015. Constantine.

Ferhat ZIANE, **Kahina HAFID**, Sabrina NAIT RABAH, Mohammed GAGAOUA. Vers une nouvelle stratégie de purification d'enzymes coagulantes par le système three phase partitioning : le cas de la ficaine du latex du *Ficus Carica L.* Séminaire international des biotechnologies. Les 19,20 et 21 Octobre 2015. Constantine.

Sabrina NAIT RABAH, **Kahina HAFID**, Ferhat ZIANE, Mohammed GAGAOUA. La cucumisine, enzyme coagulante du lait: extraction, purification partielle et caractérisation par le système de répartition triphasique. Séminaire international des biotechnologies. Les 19,20 et 21 Octobre 2015. Constantine.



## One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent

Kahina Hafid <sup>a,1</sup>, James John <sup>a,b</sup>, Taha Mansour Sayah <sup>a</sup>, Rubén Domínguez <sup>c</sup>, Samira Becila <sup>a</sup>, Melisa Lamri <sup>d</sup>, Amira Leila Dib <sup>e</sup>, José M. Lorenzo <sup>c</sup>, Mohammed Gagaoua <sup>f,\*</sup>

<sup>a</sup> INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

<sup>b</sup> AMTZ Technology Company Limited, Dar Es Salaam, Tanzania

<sup>c</sup> Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia n° 4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrao das Viñas, 32900 Ourense, Spain

<sup>d</sup> Laboratoire de Qualité et Sécurité des Aliments, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou 15000 Algeria

<sup>e</sup> GSPA Research Laboratory, Institute of Veterinary Sciences, Université Frères Mentouri Constantine 1, 05 Route de Batna, El-Khroub, Constantine 25000, Algeria

<sup>f</sup> Food Quality and Sensory Science Department, Teagasc Ashtown Food Research Centre, Ashtown, Dublin 15, Ireland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 July 2019

Received in revised form 2 October 2019

Accepted 4 October 2019

Available online 11 November 2019

#### Keywords:

Separation

Three phase partitioning

Plant proteases

Papain

Enzyme activity

### ABSTRACT

Three Phase Partitioning (TPP) system as an elegant non-chromatographic and bulk separation method was successfully applied for the extraction and recovery of papain from the latex of *Carica papaya*. The optimized parameters of TPP allowed achieving a purification fold of 11.45 and activity recovery of 134% with 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0:0.75 ratio of crude extract: t-BuOH at pH and temperature of 6.0 and 25 °C, respectively. The recovered papain had a molecular weight of 23.2 kDa and revealed maximum activity at pH 6.0 and temperature of 50 °C. The maximum values of *K<sub>m</sub>* and *V<sub>max</sub>* parameters were 10.83 mg mL<sup>-1</sup> and 33.33 U mL<sup>-1</sup>, respectively. The protease with 4 isoforms was stable at 40–80 °C and a pH range of 6.0–7.5 against numerous metal ions and none of them inactivated the recovered protease. Moreover, 10 mM Ca<sup>2+</sup> improved 2-folds the activity and half-life of the protease at temperatures from 30 to 50 °C. The milk-clotting activity tests revealed high stability of latex papain at storage, namely at –20 °C compared to 4 °C and 25 °C for up than 5 weeks. As a meat tenderizing agent, it showed promising role under different treatments by improving the texture of tough meat. The findings indicated that one-step TPP system is a simple, quick, economical and very attractive process for fast recovery of latex papain compared to other proposed protocols.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Downstream processing of proteins as well as other macromolecules of interest can represent more than 70% of the total production costs. Therefore, the development of efficient and economical downstream processing strategies for their recovery and purification, namely for enzymes, has become an important area in different fields of applied biotechnology [1,2]. Among the proposed bulk separations, aqueous systems has the potential for high-throughput purifications to solve the drawbacks of chromatographic techniques described as expensive, time consuming, involving number of steps and furthermore their scale up is difficult [3,4]. These systems based namely on precipitation, allow to concentrate and purify the macromolecules by attaining the desirable degree of purification. Moreover, the ease of modification in properties of the aqueous solution such as pH or temperature, or

amounts of salts and solvents, allow fast precipitation and recovery of the targeted proteins [3,5].

Three Phase Partitioning (TPP) is one of the aqueous separation systems that were efficiently applied for the recovery of enzymes from various sources (fluids, tissues and cells) such as plants, animals and microorganisms including atypical environments and fermentation broths [5–7]. TPP is a modest, fast and relatively emerging bioseparation tool first described by Lovrien's group [8], and nowadays intensively used to purify several target macromolecules with wide applications as it becomes a versatile and early-exploratory strategy [5,7,9–11]. From the large literature, about 70% of the studies that used TPP have been focused on the recovery of proteins and enzymes, while the other 30% concerned oils, lipids, small-molecule organic compounds, DNA and carbohydrates [5]. TPP was described as a three-stage recovery batch method, which is a hybrid of alcohol precipitations and salting-out for extracting, dewatering, purifying and concentrating the proteins of interest for either small or large manufacturing operations [5]. Its principle consists in mixing the crude slurry (protein extract) with solid salt, mostly ammonium sulfate [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] and an organic

\* Corresponding author.

E-mail address: [gamber2001@yahoo.fr](mailto:gamber2001@yahoo.fr) (M. Gagaoua).

<sup>1</sup> Joint first author

solvent, usually t-BuOH (*tert*-butanol) to obtain three phases. Thus, the process is based on the ability of the salt to separate a t-BuOH – water mixture, an otherwise miscible solution, into two phases, an upper organic phase and a lower aqueous phase [12]. In the presence of proteins, an intermediate protein layer is formed from which the target macromolecule precipitate and can be easily extracted. The process of TPP involves collective operation of principles including salting out, isoionic precipitation, cosolvent precipitation, osmolytic, kosmotropic precipitation, protein hydration shifts and conformation tightening, which all play in a sophisticated interaction manner, important role to recover the target protein [5–7,9,10].

TPP was used to separate several enzyme classes [5,9,10] as its efficiency is evident from the reported increase in the total activity [9,11,13–15]. Proteases, such as ficain [11], zingibain [16,17], cucumisin [13], papain from dried papaya peels [18], alkaline proteases from farmed giant catfish [19], proteinase and calotropain from *Calotropis procera* latex [12,20] and many others were successfully purified. Proteases constitute the most important classes of enzymes used in food industry, contributing to about 60% of total industrial market [21]. Among their sources, latex of *Carica papaya* contains four main cysteine proteases that are papain, chymopapain, glycyendopeptidase, and caricain endopeptidases [18,22].

Papain, a cysteine protease of 212 amino acids, has a strong proteolytic capacity, hydrolyzing a board of proteins into small peptides and amino acids. It is widely used in several industries such as food applications for meat tenderization, cheese-making, brewing/wine industry, baking industry as well as for the production of protein hydrolysates [23–28]. The purification of papain from papaya latex has been traditionally achieved by precipitation methods [22]; however, the purified enzyme still remains contaminated with other molecules [29]. As alternative purification approaches, chromatographic techniques including ion exchange, covalent, or affinity chromatography were used [30–32]. Most of them as stated above have multiple steps, need large process times as well as high operation costs. Because of potential and applicability of papain in food industry and other biotechnology sectors, we proposed in this report TPP process as a one-step alternative tool for quick and efficient extraction, concentration and recovery of this protease. Thus, the optimal conditions after optimizing the main TPP parameters ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; ratio of crude extract: t-BuOH; pH and temperature) to achieve a maximum purity and yield of papain, were investigated, followed by a comparison with previously reported methods. An overall biochemical characterization of the recovered latex papain was performed and its potential use as meat-tenderizing or milk-clotting agents was further investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Substrates and chemicals

Unless specified, all the substrates, chemicals, and reagents used in this study were of analytical grade or highest available purity and were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All solutions were prepared with double-distilled water.

### 2.2. Latex sampling

Fresh latex was collected from *C. papaya* trees grown in Mwanza, Tanzania. After washing the fruits with distilled water, several vertical incisions were made along the surface with a knife to a depth of 2–3 mm (Fig. 1). The exuded latex was collected into a glass beaker set on ice. After collection, the latex was fractionated into volumes of 50 mL, stored at  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  and transported in the same conditions until use.

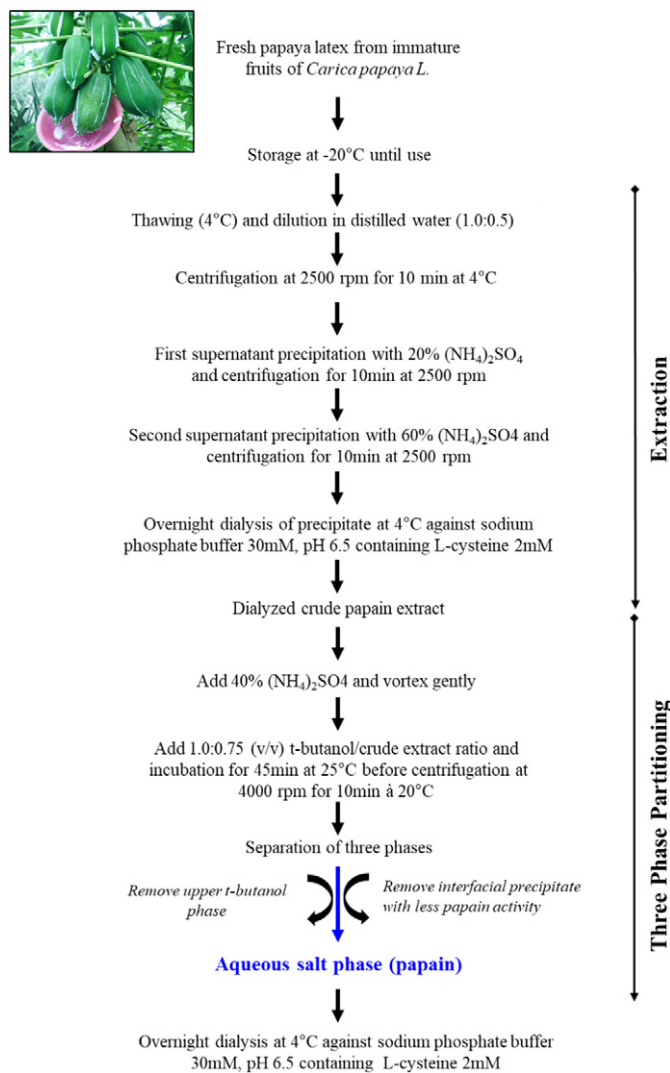


Fig. 1. Workflow highlighting the main steps applied for the recovery of papain from the crude papaya latex using Three Phase Partitioning system.

### 2.3. Crude extract preparation

Thawed latex was mixed with fresh distilled water at a ratio of 1:0.5 (v/v) using a vortex. The insoluble material was removed by centrifugation at 2500 rpm for 10 min at  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . The clarified supernatant was saturated at ambient temperature with 20% ammonium sulfate; the mixture was then centrifuged for 10 min at 2500 rpm at  $4\text{ }^\circ\text{C}$  to collect the supernatant, which was concentrated using ammonium sulfate to 60% saturation. The pellet was dissolved with fresh distilled water (Fig. 1). The volume of fresh distilled water is the initial volume of latex + distilled water used at the beginning multiply by 1.2. The crude extract obtained was dialyzed overnight (membrane molecular weight cut off: 14 kDa) against 30 mM, pH 6.5 phosphate buffer containing 2 mM L-Cysteine at  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . After dialysis, the crude papain extract sample was subjected to three phase partitioning (TPP) purification system (Fig. 1).

### 2.4. Three phase partitioning experiments of papain

TPP experiments were carried according to the guidelines reviewed by Gagaoua [5] following the detailed protocol used for latex ficin [11]. First, according to the preliminary assays, the crude extract of *C. papaya* was concentrated at  $25\text{ }^\circ\text{C}$  with 40% ammonium sulfate, followed by addition of an equal volume of t-BuOH. The mixture was vortexed gently

and then allowed to stand for an approximate of 45 min at room temperature. Afterwards, the mixture was centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4 °C to facilitate the separation of the phases (Fig. 1). The upper t-BuOH phase was removed by a Pasteur pipette. The lower aqueous and interfacial phases were taken carefully for enzyme activity and protein content analyses. The interfacial precipitate was fully dissolved in a low volume of 50 mM, pH 7.5 phosphate buffer by gentle vortex and dialyzed (Fig. 1).

For the optimization of the parameters affecting the TPP process, effects of ammonium sulfate (AS) salt concentrations (20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80%) (w/v) at the constant crude extract: t-BuOH ratio (1.0:1.0) was investigated. Then, various t-BuOH ratios (crude extract: t-BuOH; 1.0:0.5, 1.0:0.75, 1.0:1.0, 1.0:1.25, 1.0:1.5, 1.0:2.0) were employed with constant 40% AS saturation at 25 °C. After, the t-BuOH and salt, different pH values effects on the medium were investigated. The crude extract was saturated with 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and pH was adjusted to 3, 4, 5, 6, 7, and 8 with fresh 0.5 M HCl or 0.5 M NaOH, then 1.0:0.75 t-BuOH was added and the best pH value on the recovery of papain was determined. The last investigated factor was temperature that we varied from 15 °C to 40 °C to determine the conditions leading to obtain the high partitioning behavior of the system using the optimized conditions of 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0:0.75 t-BuOH ratio and medium pH of 6.0 (Fig. 1).

After optimization of those parameters, the aqueous phase containing the highest papain activity was collected and dialyzed overnight against phosphate buffer (50 mM, pH 7.0). The recovered papain was stored at –20 °C until use for further characterization to determine its general biochemical properties.

#### 2.5. Protein content determination

Protein concentrations were determined with the dye binding method of Bradford [33] using bovine serum albumin as a standard (Bio-Rad Protein Assay kit, Bio-Rad, France).

#### 2.6. Enzymatic activity

Papain activity was measured under room temperature (RT) following the modified method of [34] in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing 38 mM EDTA and 34 mM cysteine, using casein as substrate. Briefly, 800 µL of 1% (w/v) aqueous solution of casein was added to 100 µL of recovered fraction of papain (with 20 BSA equivalent /mL) diluted in 700 µL of buffer. The reaction mixture was then incubated for 10 min. Subsequently, hydrolysis casein was stopped by addition of 1.6 mL of 10% trichloroacetic acid solution. The mixture was incubated at RT for 30 min, centrifuged at 2500 rpm for 10 min and the absorbance of the supernatant measured at 280 nm. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that increases the absorbance by 0.001 min<sup>-1</sup>.

#### 2.7. Purity, molecular weight and identity of the recovered papain

To assess the content and purity of the different fractions of TPP process, tricine SDS-PAGE (1-dimensional electrophoresis (1DE)) was carried out according to Gaguaoua et al. [11] using 12% separating and 4% stacking gels. Briefly, the protein extract fractions were mixed at a ratio of 1.0:1.0 with 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1% (w/v) SDS, 0.75% (w/v) DTT, 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 and 20% (w/v) glycerol and heated for 10 min in a bath water at 75 °C. Ten micrograms of proteins were loaded and then subjected to separate for 3 h at 130 V. After separation, the gel was stained overnight with staining solution containing 4.9 mM Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50% (v/v) ethanol and 7.5% (v/v) acetic acid. Un-Scan-It gel 6.5 analysis program (Silk Scientific, Orem, UT) was used to estimate the molecular weight of the protein bands. Another identical gel run in the same conditions was used to transfer the proteins onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, MA, USA) and blocked using Tris-buffered saline with Tween

20 containing 5% skim milk. A polyclonal antibody (rabbit) specific to papain is used to recognize the protein. A second anti-papain antibody (goat) conjugated with horse-radish peroxidase (HRP) is added which binds to any fraction of papain [35]. The membranes were incubated with the chemiluminescence SuperSignal West Dura (Pierce) for 10 min, and the autoradiograms were scanned and treated as blue colored gels.

#### 2.8. Two-dimensional electrophoresis and pI determination

Isoelectric focusing (IEF) was carried out following the protocol described by Picard et al. [36] using 18 cm-long IPG (immobilized pH gradient) strips with a pH range of 3–7. The proteins were separated in the second dimension according to the following conditions: 200 V for 1 h; 500 V for 1 h; 1000 V for 3 h, increasing to 8000 V over 9 h; 8000 V continuously until 73,500 Vh. After migration, the gel was not stained and used as for 1DE for immunoblotting.

#### 2.9. Effect of temperature and pH on partitioned papain activity and stability

The temperature profile of papain was determined by performing the standard assay procedure at different temperatures of 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90 °C [13]. The relative activities as percentages were expressed as the ratio of papain activity obtained at a certain temperature to the maximum activity obtained at the given temperature range.

The effect of pH was evaluated from pH 2.5 to 7.5 [37] using the following buffers: 50 mM citrate buffer (pH 3.0–6.0) and 50 mM phosphate buffer (pH 6.5–7.5). Activity of the papain was determined as mentioned above. Furthermore, the thermal and pH stability of the enzyme was determined by measuring the residual activity of papain under the same conditions after 1 h incubation.

The residual activity of the protease up to 3 h after 30 min intervals for temperature (from 30 to 70 °C, with 5 °C intervals) and pH (from 3.5 to 7.0, with 0.5 pH units' interval) were further determined. After desired incubation periods, enzyme aliquots were withdrawn and assayed at optimal assay conditions to determine the residual enzyme activity.

#### 2.10. Effect of inhibitors and metals on papain activity

The effect of various metal ions (KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> and FeSO<sub>4</sub>) and enzyme inhibitors (EDTA, EGTA, PMSF, iodoacetamide, iodoacetic acid and iode) on the partitioned papain activity were evaluated by its incubation with the metal ion (2 mM) or enzyme inhibitor (5 mM) at 20 °C for 30 min, followed by determining the remaining activity using casein assay as described above. The enzyme activity assayed in the absence of metal ions or inhibitor was considered as control and defined as 100% [13].

#### 2.11. Half-life of the recovered papain

The half-life of the recovered enzyme was determined in the presence of calcium at different concentrations [13]. Briefly, the residual activity was assessed over a total period of 3 h min using concentration of 1.0, 2.5, 5 and 10 mM of Ca<sup>2+</sup>, and then the mixture sample was incubated at 30 until 70 °C with 5 °C intervals. The values were averages of three independent experiments.

#### 2.12. Kinetic parameters of the recovered papain

K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> of the recovered papain were determined by measuring the enzymatic activity at various concentrations of bovine casein (from 0 to 50 mg/mL) as a specific substrate [16]. The activity was measured under the standard assay conditions as discussed above.



Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk (Reciprocal) plots were acquired using Sigma Plot 12 software to determine  $K_m$  and  $V_{max}$ .

### 2.13. Storage stability

Stability at storage at 25 °C, 4 °C and –20 °C of the recovered papain for 36 days was assayed [13,17]. The activity of the papain was determined as mentioned above.

### 2.14. Preliminary tests for potential industrial applications of the recovered papain

#### 2.14.1. As a milk-clotting agent

Milk clotting activity (MCA) was determined according to Gagoua et al. [13,17]. Briefly, the substrate was prepared by dissolving commercial bovine skimmed milk powder in 100 mL of 10 mM CaCl<sub>2</sub> to a final concentration of 12% (w/v, pH 6.4). Then, 2 mL of the substrate was pre-incubated for 5 min at 37 °C and 0.2 mL of the recovered papain was added. Test tubes were periodically rotated by hand until appearance of visible discrete particles. One milk-clotting unit was defined as the amount of enzyme that clots 10 mL of the substrate within 40 min (2400 s) at 37 °C [13,17]. The effect of pH, temperature and concentration of CaCl<sub>2</sub> on MCA of papain was further evaluated [13]. The temperature of milk was varied from 20 to 90 °C; pH from pH 6.5 to 8.5, and the concentration of CaCl<sub>2</sub> from 0 to 50 mM.

#### 2.14.2. As a meat-tenderizer agent

*Longissimus thoracis* and *Semitendinosus* muscles were excised 48 h post-mortem from 3 male dromedary [38] with approximate age of 5 and 6 years to ensure that the meat is slightly tough. For that, 10 pieces of 3 × 2 × 2 cm in size were cut from each muscle. The pieces of meat from each muscle were sealed in individual plastic boxes, labeled, and randomly used for different tenderizing treatments using the same concentration of 4 mg of the recovered papain (data not shown, defined after preliminary tests). Five treatments were applied:

(i) Control: without any treatment (a control for each condition was performed);

(ii) Immersion: the meat pieces were immersed in 100 mL distilled water containing 4 mg of the recovered latex papain;

(iii) Injection: the meat pieces were injected with 4 mg of the recovered latex papain;

(iv) Pulverization: the meat pieces were pulverized with 4 mg of the recovered latex papain;

(v) Freeze/thaw cycle: the meat pieces were first pulverized with 4 mg of the recovered latex papain and then subjected to one freeze/thaw cycle.

Each sample and for the whole treatments was first incubated 60 min at 37 °C before storage for 24 h at 4 °C. Afterwards, the petrotest PNR 10 penetrometer was used to evaluate the final texture of each treated sample [39]. The instrument device was provided with a discerning body (2.5 g weight), which penetrates in free fall (perpendicularly to the muscular fibers) the sample under its own weight, during approximately 5 sec. The depth of penetration was measured in mm and expressed as unit of penetration (UP), where 1 UP = 0.1 mm. The measurements were repeated 5 times for each piece of muscle.

Water holding capacity (WHC) was evaluated according to the Grau-Hamm method with slight modifications [39]. Briefly, 300 ± 5 mg from each treated sample was weighed (G) and deposited on a previously desiccated and weighed (P) filter paper disk (Whatman No. #1). After that, the sample on the paper was placed between two Plexiglass plates and a weight of 2.25 kg was applied. After 5 min, the areas of meat spot (M) and released juice (T) were drawn on clear plastic and the damp paper filter was weighed (D) after removing the compressed meat sample. The mean of three replicates was used. Water Holding Capacity was calculated as  $M \times 100/T$  of the areas. The percentage of released water (PRW) was calculated as  $(D - P) \times 100/G$ . The

areas of meat spot (M) and released juice (T) were first scanned and measured using the open source ImageJ 1.48 software.

### 2.15. Statistical analysis

The XLSTAT 2018.2 (AddinSoft, Paris, France) software was used to analyze the data. Most of the determinations, unless stated, were performed in three independent replicates, and the control experiments were performed under the same conditions. The experimental results were expressed as the mean of the replicate determinations and standard errors. Statistical significance was evaluated using t-tests for two-sample comparison and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by t-test. The results were considered statistically significant at a significant level of 5%.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Three phase partitioning

Proteases are the primary active agents in several industrial sectors thanks to their activity properties over a wide range of temperature and pH. Considering their potential industrial uses, it becomes desirable the developing of simple and efficient methods for their recovery and purification. As it is stated above, TPP is quietly appropriate for this aim because it is economic, fast and simple to apply in order to achieve high yield recovery of the protease in only one step. This report is the first to use TPP for the recovery and purification of papain from latex of papaya. The main focus of its use was to achieve a maximum purity and yield of latex papain. Therefore, the effects of various parameters on TPP were investigated. The starting protein amount of the crude extract and its enzymatic activity were 9.6 mg/mL and 52.1 U/mL, respectively (Table 1). From this same slurry, different partitioning experiments at various (i) saturations (w/v) of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% and 80%; (ii) crude extract to t-BuOH ratios (v/v): 1.0:0.5, 1.0:0.75, 1.0:1.0, 1.0:1.25, 1.0:1.5, and 1.0:2.0; (iii) pHs: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, and 8.0; and (iv) temperatures: 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C and 40 °C, were optimized to get the highest purification fold and recovery yield (Fig. 2). In all the TPP experiments of this trial, papain was found to exclusively partition in the aqueous phase (Fig. 3A). In this bottom phase, high enzymatic activity recovery and purity as assessed by SDS-PAGE were found (Fig. 3B). The influence of these process parameters on the degree of purification and on the activity recovery of papain is shown in Fig. 2.

#### 3.1.1. Effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturation

The maximum purification fold of 11.92-fold along with 134.4% recovery of papain activity in the aqueous phase was obtained with 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturation (Fig. 2A). Below and beyond this salt concentration, a decrease in percentage recoveries of the latex papaya protease was observed. This would be explained by the irreversible denaturation of the protein [17,40,41]. In this regard, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturation is of critical importance and plays a major role in TPP, as it is responsible for protein-protein interaction and precipitation. Therefore, 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration was selected as the best amount for the optimization of the other factors. This salt concentration was sufficient enough to concentrate the protease with the desired purity. We can suggest that at this lower saturation, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was unable to change the hydrophobic surface of papain. By increasing salt concentration, both the surface and interfacial tensions of the TPP system increased following the interfacial behavior of proteins in TPP [5,42]. It well known that in TPP process, salting-out of a protein by SO<sub>4</sub> can be viewed in different ways: (i) ionic strength effects, (ii) kosmotropy, (iii) dehydration (osmotic stressor), (iv) exclusion crowding and (v) the binding of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> to the cationic sites of the targeted protein [5]. The findings for this first parameter agree to the known proteases properties to precipitate at 40–60% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturation. For example, in an earlier preliminary

**Table 1**  
Recovery profile and overall purification of papain from crude *Carica papaya* latex extract by Three-phase partitioning.

Purification step <sup>1</sup>	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Crude extract	52.1	9.60	5.43	1.00	100
Aqueous phase of TPP (AP)	69.57	1.12	62.11	11.45	134
Interfacial phase of TPP (IP)	1.16	6.49	0.18	0.03	2.2

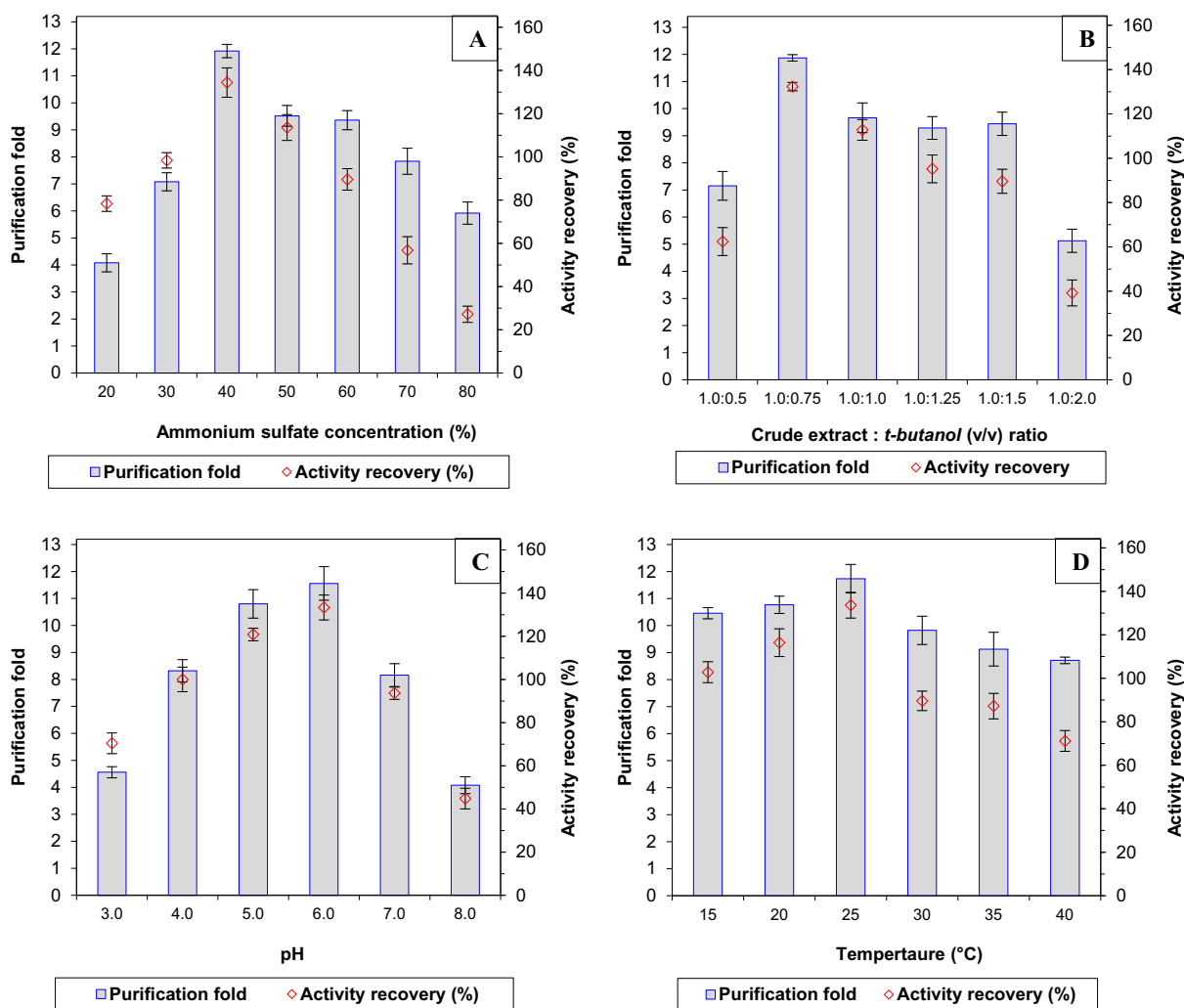
<sup>1</sup> The ammonium sulfate (40%, w/v) was added to the dialyzed crude extract of *C. papaya* latex and then pH was adjusted to 6.0. This was followed by the addition of *t*-BuOH in a ratio of 1.0:0.75 (v/v) (crude extract: *t*-BuOH) at an average temperature of 25 °C. The three phases formed were collected separately. The upper phase was removed and then the lower aqueous phase and interfacial precipitate were tested for enzyme activity and protein amount. The aqueous phase containing the highest proteolytic activity was used for the overall characterization of papain.

study, most proteases from papaya extract of dried peels were found to precipitate in the aqueous phase of a two-step TPP process [18].

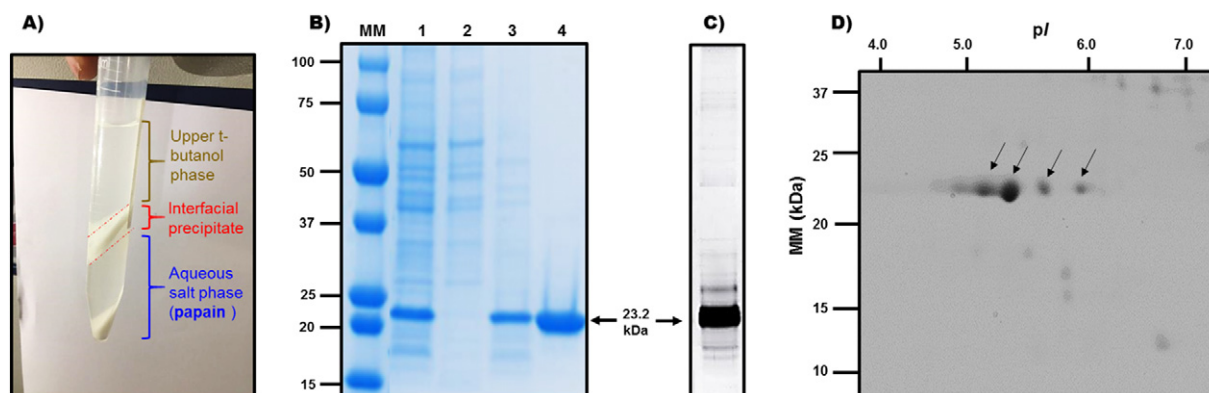
### 3.1.2. Effect of crude extract to *t*-BuOH

The relative amount of *t*-BuOH within the protein extract is further important in TPP. The saturation of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was fixed to 40% and the ratio of crude extract to *t*-BuOH varied from 1.0:0.5 to 1.0:2.0 (Fig. 2B). The best purification fold of 11.87-fold along with 132.3% recovery of papain activity were obtained with 1.0:0.75 (v/v) ratios. Previously, Gagaoua [5] reviewed that the optimum ratio of *t*-BuOH arises as a result of two conditions. If the quantity of *t*-BuOH is lower, it does not sufficiently synergize with the salt [5,11,12]; however, if it is higher, it is likely to cause a saturation of the medium and hence strongly decrease the activity

of the targeted protease [6]. The reason of this decrease in production yield would be due to an increase in the viscosity of the medium. Meanwhile, owing to the larger molecular size and branched structure of *t*-BuOH, no permeation inside the folded proteins can occur, and we suppose that no direct denaturation effect can be observed. It is worthwhile to note that most studies reported an increase in the activities of the recovered enzymes in *t*-BuOH/water mixtures [8], a peculiarity of *t*-BuOH that is confirmed by several reports (for review: [5–7,9,10,12]). For instance, we believe this is related to the kosmotropic nature of this C4 non-ionic alcohol, which stabilizes intramolecular interactions in proteins and thus offers milder process of dehydration when compared with small molecules of either methanol, iso propanol or ethanol [13,16] that can easily penetrate, and thus degrade, many proteins [6,41].



**Fig. 2.** Optimization of the parameters affecting Three Phase Partitioning process and their effect on purification fold and activity recovery of papain from the crude papaya latex. (A)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration; (B) crude extract: *t*-BuOH ratio; (C) pH effect at 40% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation and 1:0.75 crude extract: *t*-BuOH ratio; and (D) effect of temperature variation from 15 °C to 40 °C. Data represents mean  $\pm$  standard error.



**Fig. 3.** Three Phase Partitioning (TPP) and molecular weight and purity analysis of the recovered papain from the latex of *Carica papaya*. (A) A TPP result depicted by a picture of the glass test tube highlighting the final aspect of the crude latex extract partitioning into three distinct separated phases, showing the recovered papain in the aqueous phase. (B) Tricine SDS-PAGE (10% separating polyacrylamide gel): lane MM, molecular mass standards; lane 1, dialyzed crude extract; lane 2, interfacial phase of TPP; lane 3, recovered papain (aqueous phase of TPP) with an apparent molecular mass of 23.2 kDa and lane 4, concentrated papain using Amicon Ultra device (10 kDa MWCO) after dialysis against 30 mM, pH 6.5 phosphate buffer containing 2 mM L-Cysteine at 4 °C. (C) Western-Blotting, using an anti-papain antibody raised against the fraction of the lane 4. (D) Two-dimensional electrophoresis analysis revealed by western-blotting of the concentrated fraction of papain precursor (from lane 4 of (B)). The arrows in the 2DE gel designate the different isoforms by pI.

### 3.1.3. Effect of pH

The pH of the medium is very important for best recovery and activity of the targeted protease. Indeed, it would affect the protein concentration in a pH-dependent net charge manner due to electrostatic interactions between phases and charged residues of the protein [5]. The recovered papain was separated selectively in the bottom phase at pH 6.0 as the best condition, hence allowing the highest purification fold of 11.55 with 133% activity recovery. The TPP behavior for pH is illustrated in Fig. 2C. The raised recovery at this pH could be a result of a better conformational stability of papain towards t-BuOH and salt at that pH. Otherwise, the recovery is very low at pHs 3.0, 4.0 or 7.0 and 8.0, but interesting as well at pH 5.0. According to Pike and Dennison [43], the solubility of proteins was maximized when TPP was carried out at the pI of the protein. According to Gagaoua [5], when the pH of the system is much lower than the pI of the protein, there is protein target accumulation in the interfacial phase; and when the pH of the system is much higher than the pI of the protein, there is protein target accumulation in the aqueous phase. The 2-dimensional electrophoresis analysis (Fig. 3) supports these statement as the pI of the recovered papains are mainly around 4.3, in accordance with the recovery in the aqueous phase of several cysteine proteases such as zingibain [17], calotropain [20] or papain of dried papaya leaves [18].

### 3.1.4. Effect of temperature

The effect of temperature as it influences the protease configuration and overall stability [16] was further investigated at the above optimized parameters of 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , ratio of 1:0.75 (v/v) of crude extract to t-BuOH and pH 6.0. The recovery of papain increased with an increase in temperature from 15 to 25 °C, and then it decreased (Fig. 2D). At temperatures above 25 °C, there may not be significant kosmotropic and crowding effects, which resulted in decreased recovery and purity of papain. Thus, the highest purification fold of 11.74 and activity recovery of 134% were obtained at 25 °C. Accordingly, Nadar et al. [10], highlighted that at 25 °C, the conformation of enzyme changed into highly active form, explaining the good partitioning obtained at this temperature. From the large literature, it seems also that working at lower or at room temperatures, the recovery yield or activity may be quietly similar, which is postulated to be due to the low movement of particle solvent [5,6]. In agreement to our findings, an earlier study by Jian et al. [44] investigated the effect of temperature on the yield and purification fold of papain separated by metal affinity partitioning in aqueous two-phase systems at 25, 35, and 45 °C. They observed that the yield and purification recovery of papain were almost the same at the three temperatures, hence indicating less variation

whatever the temperature. One can relate this resistance to temperature and enhancement of papain activity, to its three-dimensional structure as it displays a globular protein with three disulfide bonds and two catalytic L- and R-domains (Fig. 4). From this graph, Fernández-Lucas and co-workers pointed out the interesting Trp177 that is involved in the generation of the nucleophilic character of Cys25/His159 ion pair [23], reported so far to play important role in its stability.

### 3.1.5. Overall evaluation of the TPP recovery profile

The partitioning and concentration of *C. papaya* latex papain with one-step TPP is given in the overall purification profile of Table 1. As presented above, the partitioned papain has tendency to concentrate in the bottom phase of TPP system using optimal parameters of 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.0:0.75 ratios of the crude extract to t-BuOH at pH 6.0 and 25 °C. The highest recovery and purification fold of 134% and 11.45, respectively, were achieved. The specific activity of the recovered fraction that was used to determine the biochemical characteristics of papain as well as its ability of use by industry has a specific activity of 62.11 U/mg.

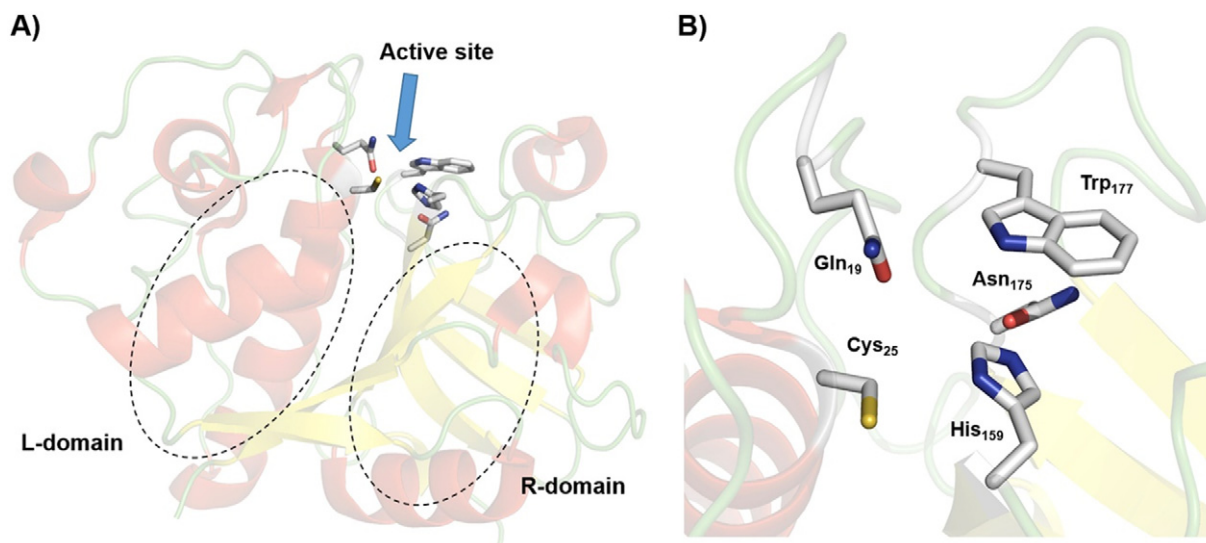
In Table 2, we compared the one-step TPP protocol described in this trial to other protocols from the large literature aimed to purify papain from different parts of *C. papaya* plant. Overall, the protocol we developed gave almost the best results in terms of recovery and purification folds. For example, He and co-workers purified papain from unripe green papaya fruits by reversed phase expanded bed adsorption chromatography and obtained a papain fraction of 23.4 kDa with 74.98% of recovery and 7.04 purification fold [45]. Purwanto et al. [46] used ion exchange chromatography after 60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation, and they found a very weak purification recovery of 10.7. Further studies applied aqueous two-phase system, and reported overall recovery ranging from 72 to 88% [47,48]. Our findings, comforted the previous TPP based separations highlighting high superiorities of this system in comparison to conventional techniques; where selective partition and concentration of desired protease into one phase, less money and steps, and work at room temperature, are the main peculiarities and advantages [5].

## 3.2. Characterization of the purified latex papain

### 3.2.1. Purity of the recovered latex papain and steps of TPP system by electrophoresis

The analysis of the different fractions of TPP system by an adapted Tricine SDS-PAGE confirmed that the one-step TPP allows an efficient removal of contaminating proteins or other molecules in the interfacial and upper phases, whereas the papain is mainly concentrated in the aqueous phase (Fig. 3B). The papain fraction was homogenous and had a molecular weight of 23.2 kDa. This is in agreement with the





**Fig. 4.** (A) Three-dimensional structure of papain (PDB accession code 1PPN). The arrow indicates the situation of active site. (B) Catalytic residues in the active site of papain. Cys<sub>25</sub> and His<sub>159</sub> are forming the catalytic ion pair. (The figure was reprinted with permission from Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., & Hormigo, D. (2017). New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **68**, 91–101).

molecular weight reported for papain in several studies [29,49–51]. Some of those studies are further summarized in Table 2 in comparison to different plant parts of papaya as well as methods of purification. In comparison to the large literature, the estimated molecular weight of the recovered papain falls in the range of 19–29 kDa, which is the reported range of values for many papain-like proteases [52]. In comparison to cysteine proteases from latex plants, Table 3 listed a non-exhaustive manner some characteristics of the studied proteases including their molecular weight. On another hand, the concentrated TPP fraction was further run on 1-dimensional gel to be revealed by western-blotting using an antibody raised against papain (Fig. 3C), therefore confirming its identity. However, the same fraction separated using 2-dimensional gel (Fig. 3D) revealed four main different isoforms that had pI ranging from 5.0 to 6.0, with high abundance of one spot close to pH 5.0 than 6.0. Our study is the first to highlight this polymorphism, and further studies are worthy to be done to better characterize each protein isoform spot. Meanwhile, the isoforms would be also contaminating glycyl endopeptidase as it was earlier reported for chymopapain [53,54]

### 3.2.2. Effect of temperature and pH on the activity and stability of the recovered papain

The effect of temperature on papain activity and stability was studied in the temperature range of 20–90 °C (Fig. 5A). The partitioned

papain was very active over a broad temperature range, with an optimum temperature of 40–80 °C and maximum activity at 60 °C. The enzyme was active at 80 °C. The purified papain was also stable under a wide range of temperature and it retained more than 60% of its activity in the temperature range from 30 to 70 °C when it was incubated for 1 h and it retains 70% of its initial activity at 40 °C. However, it loses the activity when incubated at temperature more than 70 °C for 1 h. The results obtained showed that the recovered latex protease is more stable at the usual industrial temperatures. The findings are in line with previous reports [29]. Furthermore, calcium at different concentration (1 mM, 2.5 mM, 5 mM and 10 mM of Ca<sup>2+</sup>) enhanced the activity and the half-life of the latex protease whatever the temperature from 30 to 55 °C but not above 55 °C (Fig. 6). Similarly, the analysis of temperature effect in serial time by taking samples each 30 min up to 3 h and for temperatures ranging from 30 to 70 °C, with 5 °C elevation temperature (Fig. 7A) confirms the broad range of temperature stability of the recovered latex papain. In agreement to our results, thermal denaturation studies of papain by both differential scanning calorimetry and spectrophotometric methods indicated that papain starts losing its activity from 55 °C [55]. Moreover, most of the listed cysteine proteases in Table 3 had optimal temperatures ranging from 40 to 60 °C and stability plateau at 40 to 70 °C

The effects of pH are given in Fig. 5B. An increase in the activity of papain was observed by increasing pH from 3.0 to 6.0. The protease had a

**Table 2**

Comparison of different processes from literature for papain extraction and purification from various parts of papaya plant.

Used part	Purification methods	MW (kDa)	Recovery (%)	Purification fold	References
Unripe green papaya fruits	Reversed phase expanded bed adsorption chromatography	23.4	74.98	7.04	[45]
	Two-step three phase partitioning		253.5	15.8	[18]
Dried papaya peels	Precipitation of insoluble complexes of papain and poly vinyl sulfonate	23.4	86	2	[29]
			88		[47]
			49		
		21			[56]
Latex	Chromatography				
	Column chromatography	23.4			[51]
	Ion exchange chromatography		10.7		[46]
	Fractionation using 60% ammonium sulphate and ion exchange chromatography		6.3		
	Aqueous two-phase systems		72	2.41	[48]
	Three phase partitioning system	23.2	134	11.45	Present study

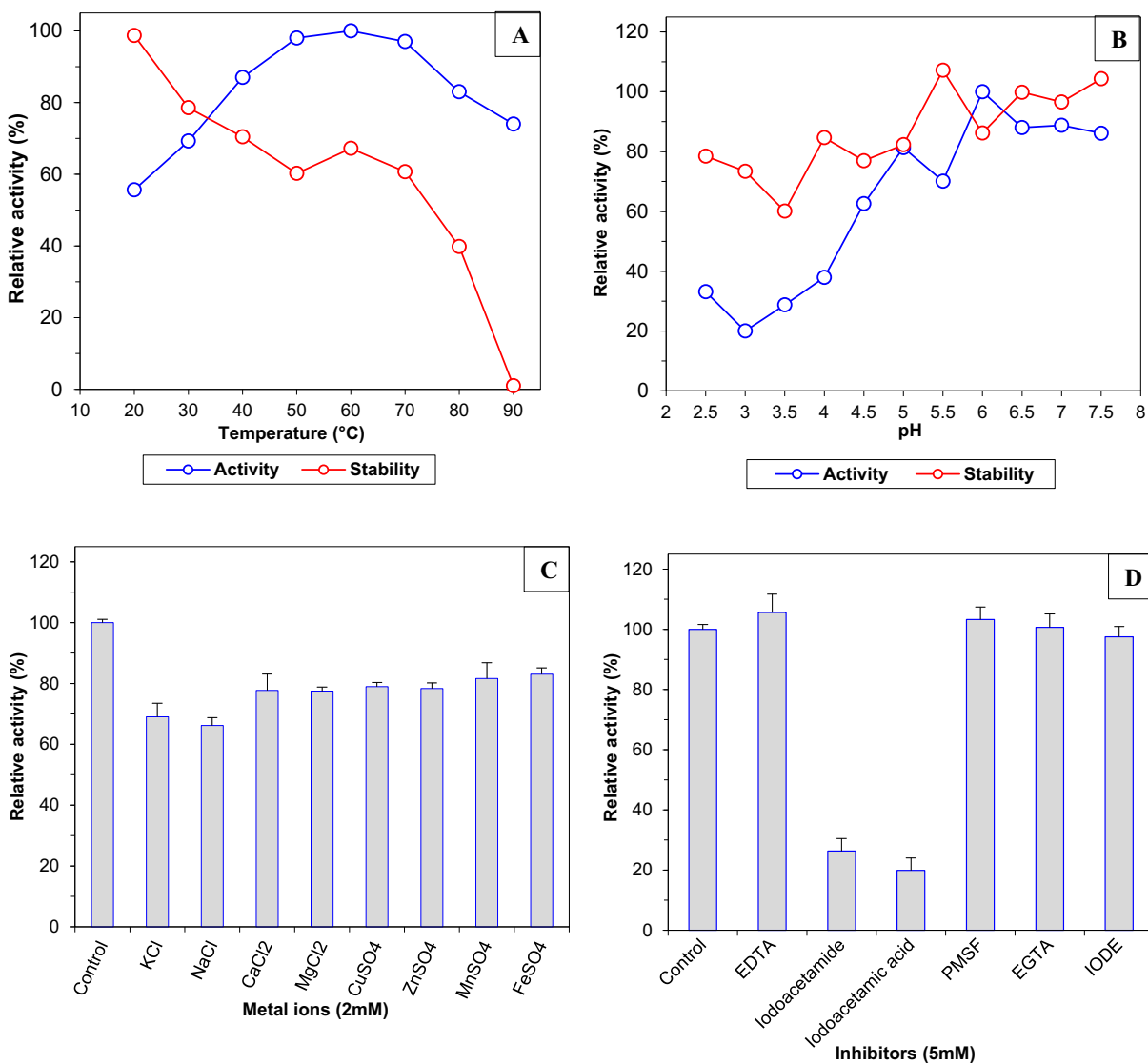
**Table 3**

Brief overview of the characterized cysteine proteases from some latex of plants in comparison to the TPP recovered papain in this study.

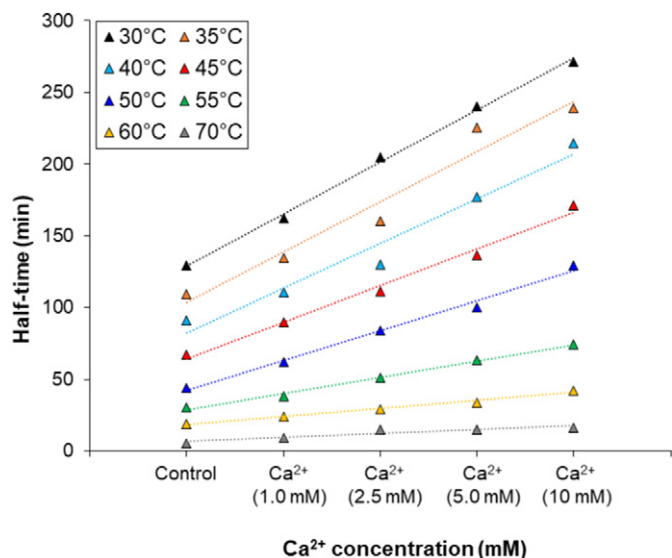
Protease name	Plant source	MW (kDa)	pH optima	Temperature optima (°C)	pH stability	Temperature stability (°C)	References
Papain	<i>Carica papaya</i> (latex)	23.2	6.0	60	6.0–7.5	40–80	Present study
Papain	<i>Carica papaya</i>	23.4	8.75	–	5.0–8.0	–	[51]
Ficin	<i>Ficus carica</i>	23.4	6.5	60	6.0–7.0	40–70	[11]
Ficin S	<i>Ficus carica</i> var. <i>Horaishi</i>	26.0	8.0	60	2.0–8.0	60	[72]
Procerain	<i>Calotropis procera</i>	28.8	8.0	55	7.0–9.0	55–60	[73]
Procerain B	<i>Calotropis procera</i>	25.7	8.0	40	6.5–8.5	40–60	[74]
Araujain h I	<i>Araujia hortorum</i>	24.1	8.5	60	8.0–9.5	–	[75]
Araujain h II	<i>Araujia hortorum</i>	23.7	8.0	–	8.0–9.0	–	[76]
Araujain h III	<i>Araujia hortorum</i>	23.5	8.5	–	8.0–9.0	–	[76]
Ervatamin B	<i>Ervatamia coronaria</i>	26.0	6.0	55	6.0–5.0	50–55	[77]
Ervatamin A	<i>Ervatamia coronaria</i>	27.6	8.5	50	8.0–8.5	50–55	[78]
Funastrain c II	<i>Funastrum clausum</i>	23.6	9.5	–	9.0–10.0	–	[79]
Heynein	<i>Ervatamia heyneana</i>	23.0	8.0–8.5	52	2.5–11.5	10–60	[80]
Philibertain g I	<i>Philibertia gilliesii</i> Hook. et Arn	23.5	7.0–8.0	–	–	–	[81]
Philibertain g II	<i>Philibertia gilliesii</i> Hook. et Arn	23.9	9.0	–	7.0–10.0	25–45	[82]
Caricain	<i>Carica papaya</i>	23.2	7.0	50	5.5–9.5	40–55	[83]
Caricain II	<i>Carica papaya</i>	18.8	6.5	45	5.5–9.5	40–45	[83]

neutral optimum pH; and seems that it is more stable at pH 6.5 to 7.5. Note that there was retention of activity after 1 h incubation at that pH range. The pH profile obtained in this experiment agrees with

those of previous studies [46] which mainly described an optimum pH of 6.0 when papain was purified by ion exchange chromatography. An optimum pH in the range of 5–8 was also reported [49,51]. Further



**Fig. 5.** Activity and stability of the TPP recovered papain from latex of *Carica papaya*. (A) Effect of temperature; (B) effect of pH; (C) effect of metal ions at a concentration of 2 mM; and (D) effect of some usual inhibitors at a concentration of 5 mM. Data represents mean  $\pm$  standard error.



**Fig. 6.** Half-life of the TPP recovered papain from latex of *Carica papaya* in the presence of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) at different concentrations at a range of temperatures from 30 to 70 °C. The values are means of three independent experiments determined after 3 h of incubation.

comparisons to most studied cysteine proteases including papain-like are summarized in Table 3. Most of the enzymes were found to be likely stable at the neutral and basic pH than acidic. The broad pH stability found for papain is an important factor for industrial application of enzymes. For example, it can be easily applied for meat tenderizing or further industrial applications detailed above. As for temperature, the recovered papain by TPP is highly stable when it is incubated for 3 h at pHs  $\geq 4.5$  (Fig. 7B). The high stability of the papain against pH and temperature together makes this protease potentially beneficial in industrial applications.

### 3.2.3. Effect of various effectors on partitioned papain activity

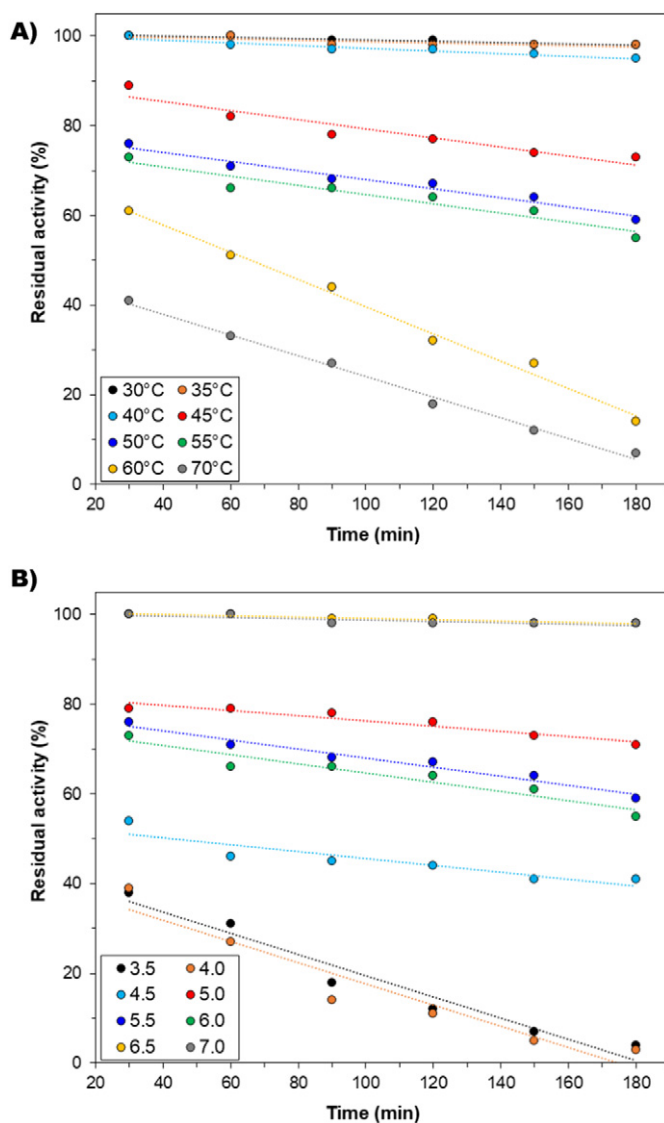
Various metal ions (KCl, NaCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  and  $\text{FeSO}_4$ ) at 2 mM concentration inhibited the enzyme activity for more than 20% (Fig. 5C), indicating that we have to use ion chelators such as EDTA to maintain or improve the proteolytic activity of papain. Among the inhibitors we investigated, iodoacetamide and iodoacetamic acid, which are cysteine protease inhibitors, inhibited more than 75% of the proteolytic activity of the recovered papain, while PMSF, EGTA and iode had no effect on the protease (Fig. 5D). EDTA, a metalloprotease inhibitor, enhanced as expected the proteolytic activity of the protease. These findings for the effectors investigated in this study are mostly in line to the data described in the literature for papain purification [18, 29,45–48,51,56], which are summarized in Table 2.

### 3.2.4. Kinetic parameters

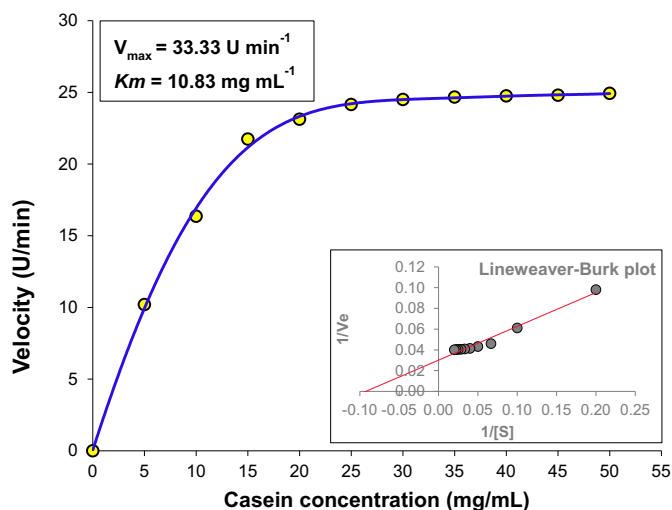
In order to determine the kinetic constants ( $V_{\max}$  and  $K_m$ ) of the partitioned latex papain, the variation of enzymatic activity with the initial casein concentration was investigated (Fig. 8). The initial casein concentration was changed between 0 and 50 mg/ml. The  $V_{\max}$  and  $K_m$  values were calculated from Lineweaver-Burk plot as  $33.33 \text{ U min}^{-1}$  and  $10.83 \text{ mg ml}^{-1}$ , respectively. The values are similar to those of cysteine or serine proteases recovered by one-step TPP such as ficain [11], zingibain [17] and cucumisin [13]. Furthermore, the Lineweaver-Burk plot indicated that the enzyme follows simple Michaelis-Menten kinetics.

### 3.2.5. Storage stability at different temperatures

The recovered papain was fractionated into different aliquots in Eppendorf tubes and stored at three temperatures ( $-20^\circ\text{C}$ ,  $+4^\circ\text{C}$  and  $25^\circ\text{C}$ ) up to 36 days to evaluate the residual activity based on milk-



**Fig. 7.** Effect of (A) temperature and (B) pH on the TPP recovered papain stability at different time points.



**Fig. 8.** Summary of the Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plot kinetics of the TPP recovered papain from latex of *Carica papaya*.

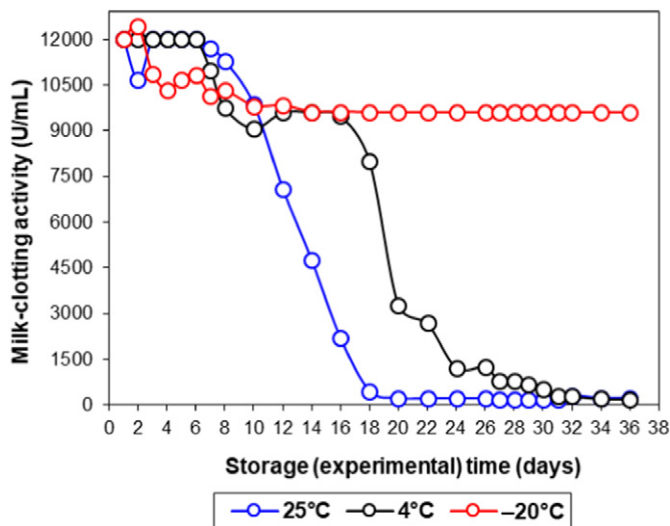
clotting activity (MCA) along this period (Fig. 9). A strong MCA was observed whatever the storage temperature during the first 10 days, where it stabilizes at  $-20^{\circ}\text{C}$  around 10 000 U/mL but it decreases drastically for  $25^{\circ}\text{C}$  and continue in the same value as for  $-20^{\circ}\text{C}$  for the  $+4^{\circ}\text{C}$  until 16 days. At 18 days, the protease lost 95% of its activity at  $25^{\circ}\text{C}$ , when this same lost is achieved at 28 days for  $+4^{\circ}\text{C}$ . The best condition of storage for the recovered partitioned latex papain is  $-20^{\circ}\text{C}$ . This MCA activity profile over days is similar to that we recently reported for cucumisin [13]. Overall, these findings suggest that the partitioned papain might be preserved at  $25^{\circ}\text{C}$  for a short period of 10 days, whereas a slightly longer life of 14 days or 36 days may be obtained by storage in a fridge at  $+4^{\circ}\text{C}$  or under freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$ , respectively. Previous studies reported the potential use of additive stabilizers such as cysteine, ascorbic acid, sodium ascorbate, erythorbic acid, sodium erythorbate and many others to preserve the proteolytic activity of industrial enzymes including papain [17,57–60].

### 3.3. Milk-coagulation ability of papain for dairy industry

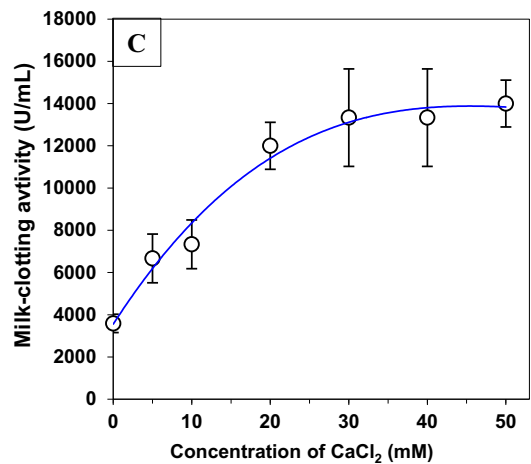
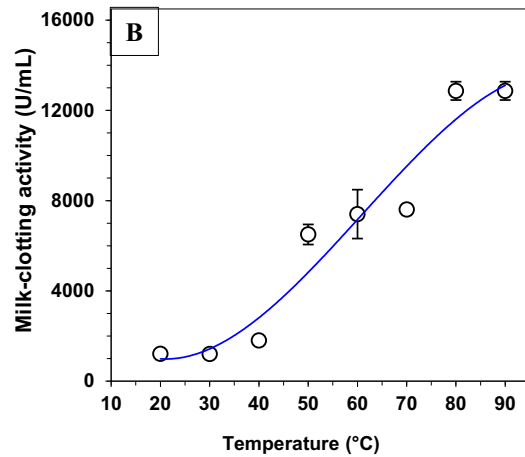
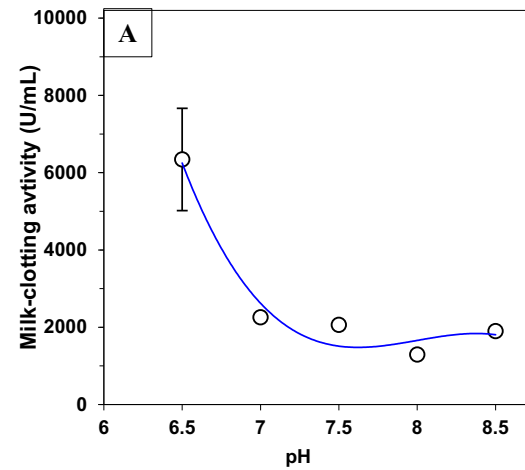
In order to determine the optimal conditions of the recovered latex papain by TPP system for milk coagulation and thus for cheese-making, it is important to determine the effect of usual physico-chemical parameters such as temperature, pH and  $\text{CaCl}_2$  used by dairy industry. This investigation was done in the present study based on the determination of MCA.

The effect of pH of milk on the activity of papain has been assessed at pH ranging from 6.5 to 8.5. The choice of this pH interval is based on the fact that, in pH lower than 5.5, the coagulation can become an acidic coagulation due to acid pH ( $<4.6$ ). According to the results presented in Fig. 10A, we observe a reduction of MCA as pH of milk increases. This activity decreases until only 20% of activity at pH 8.0 was retained. The increase of the pH up to 7.0 can provoke the inactivation of papain. The same effect of pH on papain activity has been previously reported [61], suggesting more MCA activity at neutral pH. In an earlier study on ficain, we observed that this cysteine protease from fig latex had an interesting MCA at pH 6.5 [11].

The optimal temperature was determined by MCA of papain on milk at temperatures varying from 20 to  $90^{\circ}\text{C}$ . The results are given in Fig. 10B. We note that more the temperature of milk increases, more its coagulation is fast. This profile is similar to that generally reported for plant proteases that were purified from *Balanites aegyptiaca* fruit



**Fig. 9.** Effect of storage temperature on the proteolytic activity of the TPP recovered papain from latex of *Carica papaya*. Aliquots of the recovered protease, stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  (red line),  $4^{\circ}\text{C}$  (black line) and  $25^{\circ}\text{C}$  (blue line), were removed at different periods and the milk-clotting activities were determined. Data represents mean  $\pm$  standard error of three independent experiments.



**Fig. 10.** Milk pH, temperature, and salt ( $\text{CaCl}_2$ ) concentration effects on milk-clotting activity (MCA) of the TPP recovered papain. Data represents mean  $\pm$  standard error.

pulp [62], thistle of *Cynara cardunculus* L., and artichoke [63,64]. Besides, recently and using cucumisin recovered by TPP system from, we reported a strong increase in the MCA by increasing temperature until  $70^{\circ}\text{C}$ , then the protease loose progressively its activity beyond  $75^{\circ}\text{C}$  [13]. These results confirm those of previous studies, which reported the thermostable peculiarity of plant proteases [65–68].

The addition of the calcium chloride to milk, currently used in dairy industry, has as effect the reducing of coagulation time and increasing firmness of the coagulum [64]. The effect of  $\text{CaCl}_2$  on MCA of the purified papain is shown in Fig. 10C, where it can be seen that addition of  $\text{CaCl}_2$



strongly decreased the milk-clotting time. Optimal concentration for MCA was from 40 to 50 mM  $\text{CaCl}_2$ . A similar behavior was previously observed [13].

### 3.4. Meat tenderization ability

The effects of various meat tenderizing treatments on penetration depth (which gives us information on texture or tenderness of meat pieces) and water holding capacity (WHC) of *Longissimus thoracis* (LT) and *Semitendinosus* (ST) are given in Fig. 11. We observe that papain improved from 1 to 2 mm of penetration depth, consequently the tenderness of meat cuts. The reduction of meat toughness can be explained by the high activity of the papain. In line to these findings, an earlier study reported that papain is a powerful protease, that efficiently catalyzes the breaking of the peptidic bonds in the protein molecules as substrates and their degradation products to amino acids [69]. According to Ashie and co-workers [26], the enzymatic hydrolysis of meat proteins is generally known to increase the solubilisation of free amino groups and hydroxyproline to a loss of the integrity of the muscle and therefore, an increase in meat tenderness. These authors, reported also that injection papain reduce shear force of the muscle [26]. Since 80's century, plant cysteine proteases were proposed to allow the breakdown of myofibrillar proteins and the disruption of the muscular fibril structure [70].

From the other treatments investigated in this study using the recovered papain, we note that for LT muscle, freeze/thaw cycle is characterized by the deepest penetration followed by marinade, then injection and finally pulverization treatment (Fig. 11). For ST muscle, the freeze/thaw cycle allowed to obtain the greatest on tenderness followed by pulverization, injection and marinade. Therefore, freeze/thaw cycle presents the most interesting treatment to improve tenderness using the recovered papain by TPP at a concentration of 4 mg. The best treatment found in this study was further reported by [71] to enhance tenderness using actinidin from kiwi juice. Further investigations using accurate methodologies such as transmission electron microscopy are under process to better characterize the effect of a fixed concentration of the latex

papain recovered by TPP on the ultrastructural changes that occur on muscle using the different treatments described above.

## 4. Conclusion

In comparison to chromatographic and other aqueous system methods, TPP is very cheap, simple and efficient method to purify papain from papaya latex. Effect of various process parameters has been evaluated and latex-papain was recovered in the aqueous phase to 11.45-fold and 134% recovery activity by optimized one-step TPP system: 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.0:0.75 ratios of the crude extract to t-BuOH, pH 6.0 and 25 °C. The characterization of the recovered papain showed interesting and better stability over a broad temperature and pH range, resistance to metal ions and inhibitors. The protease was further tested for its ability as milk-clotting and meat tenderizing agent. TPP could be attractive for the purification of latex papain in an easy way to be implemented in food industry or other industries.

## Declaration of Competing Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

## Acknowledgements

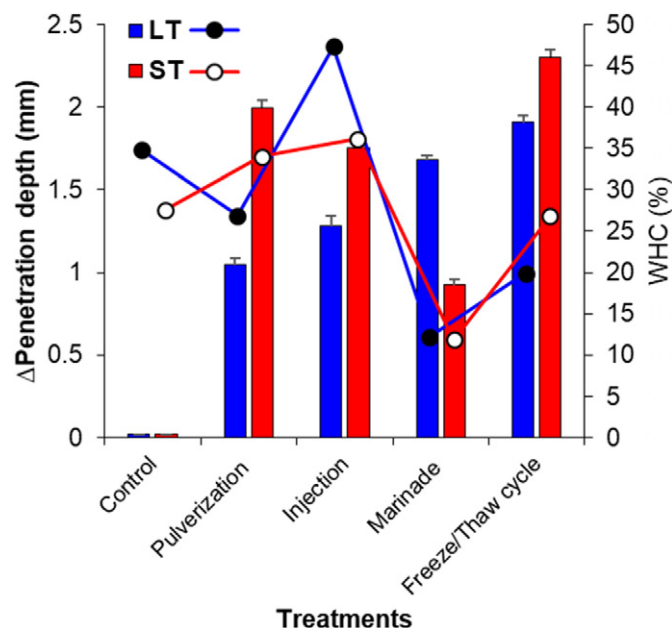
The first author conveys special thanks for the technical help from the following students from INATAA institute: Nahla BOUNEB, Imane BOUROUIS, Sara EL ACHI, and Nouhad SALAH AYECH. The authors acknowledge also Mr. Brahim BENSARI, the butcher in Constantine, Algeria for his help in camel meat sampling.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.048>.

## References

- [1] G.D. Najafpour, CHAPTER 7 – Downstream Processing, in: G.D. Najafpour (Ed.), *Biochemical Engineering and Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam 2007, pp. 170–198.
- [2] R. Gupta, Q. Beg, S. Khan, B. Chauhan, An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60 (4) (2002) 381–395.
- [3] Enrique Alvarez-Guerra, Angel Irabien, Separation of Proteins by Ionic Liquid-Based Three-Phase Partitioning, *Ionic Liquids in Separation Technology*, Elsevier 2014, pp. 207–234.
- [4] J.A. Asenjo, B.A. Andrews, Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective, *J. Chromatogr. A* 1218 (49) (2011) 8826–8835.
- [5] M. Gagaoua, Aqueous Methods for Extraction/Recovery of Macromolecules From Microorganisms of Atypical Environments, A Focus on Three Phase Partitioning, *Methods in Microbiology*, Academic Press 2018, pp. 203–242.
- [6] C. Dennison, Three-Phase Partitioning, in: H. Tschesche (Ed.), *Methods in Protein Biochemistry*, Walter de Gruyter, Berlin, Germany 2011, pp. 1–5.
- [7] J.K. Yan, Y.Y. Wang, W.Y. Qiu, H. Ma, Z.B. Wang, J.Y. Wu, Three-phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58 (14) (2018) 2416–2431.
- [8] K.H. Tan, R. Lovrien, Enzymology in aqueous-organic cosolvent binary mixtures, *J. Biol. Chem.* 247 (10) (1972) 3278–3285.
- [9] K.W. Chew, T.C. Ling, P.L. Show, Recent developments and applications of three-phase partitioning for the recovery of proteins, *Sep. Purif. Rev.* (2018) 1–13.
- [10] S.S. Nadar, R.G. Pawar, V.K. Rathod, Recent advances in enzyme extraction strategies: a comprehensive review, *Int. J. Biol. Macromol.* 101 (2017) 931–957.
- [11] M. Gagaoua, N. Boucherba, A. Bouanane-Darenfed, F. Ziane, S. Nait-Rabah, K. Hafid, H.-R. Boudechicha, Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex, *Sep. Purif. Technol.* 132 (2014) 461–467.
- [12] M. Gagaoua, K. Hafid, Three phase partitioning system, an emerging non-chromatographic tool for proteolytic enzymes recovery and purification, *Biosens. J.* 5 (1) (2016) 1–4.
- [13] M. Gagaoua, F. Ziane, S.N. Rabah, N. Boucherba, A.A.K.E.H. El, A. Bouanane-Darenfed, K. Hafid, Three phase partitioning, a scalable method for the purification and recovery of cucumis, a milk-clotting enzyme, from the juice of *Cucumis melo* var. *Reticulatus*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 102, 2017, pp. 515–525.
- [14] N. Boucherba, M. Gagaoua, A. Bouanane-Darenfed, C. Bouiche, K. Bouacem, M.Y. Kerbous, Y. Maafa, S. Benallaoua, Biochemical properties of a new thermo- and



**Fig. 11.** Penetration depth difference (bars in mm) and water-holding capacity (continuous lines in percentage) of the samples from camel meat of both *Longissimus thoracis* (LT) (in blue) and *Semitendinosus* (ST) (in red) muscles treated with the TPP recovered papain at a concentration of 4 mg/mL. The four treatments (pulverization, injection, marinade and freeze/thaw cycle) were compared to the control treated in the presence of water. Data represents mean  $\pm$  standard error of three independent experiments.

- solvent-stable xylanase recovered using three phase partitioning from the extract of *Bacillus oceanisediminis* strain SJ3, *Bioresour. Bioprocess.* 4 (1) (2017) 29.
- [15] Amel Ait Kaki El-Hadef El-Okki, Mohamed Gagaoua, Hayat Bourekoua, Kahina Hafid, Leila Bennamoun, Shahrzad Djekrif-Dakhmouch, Mohamed El-Hadef El-Okki, Zahia Meraihi, Improving bread quality with the application of a newly purified thermostable  $\alpha$ -amylase from *Rhizopus oryzae* FSIS4, *Foods* 6 (1) (2017) 1, <https://doi.org/10.3390/foods6010001>.
- [16] M. Gagaoua, K. Hafid, N. Hoggas, Data in support of three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes, *Data Brief* 6 (2016) 634–639.
- [17] M. Gagaoua, N. Hoggas, K. Hafid, Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes, *Int. J. Biol. Macromol.* 73 (2015) 245–252.
- [18] P. Chaiwut, P. Pintathong, S. Rawdkuen, Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels, *Process Biochem.* 45 (7) (2010) 1172–1175.
- [19] S. Rawdkuen, A. Vanabun, S. Benjakul, Recovery of proteases from the viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning, *Process Biochem.* 47 (12) (2012) 2566–2569.
- [20] S. Rawdkuen, P. Chaiwut, P. Pintathong, S. Benjakul, Three-phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex, *Biochem. Eng. J.* 50 (3) (2010) 145–149.
- [21] A. Dhillon, K. Sharma, V. Rajulapati, A. Goyal, *Proteolytic Enzymes, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier 2017, pp. 149–173.
- [22] B.S. Baines, K. Brocklehurst, A necessary modification to the preparation of papain from any high-quality latex of *Carica papaya* and evidence for the structural integrity of the enzyme produced by traditional methods, *Biochem. J.* 177 (2) (1979) 541–548.
- [23] J. Fernández-Lucas, D. Castañeda, D. Hornmigo, New trends for a classical enzyme: papain, a biotechnological success story in the food industry, *Trends Food Sci. Technol.* 68 (2017) 91–101.
- [24] Y. Ma, Y. Yuan, X. Bi, L. Zhang, Y. Xing, Z. Che, Tenderization of Yak meat by the combination of papain and high-pressure processing treatments, *Food Bioprocess Technol.* 12 (4) (2019) 681–693.
- [25] H.H.S. Abdel-Naeem, H.M.H. Mohamed, Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain, *Meat Sci.* 118 (2016) 52–60.
- [26] I.N.A. Ashie, T.L. Sorensen, P.M. Nielsen, Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness, *J. Food Sci.* 67 (6) (2002) 2138–2142.
- [27] S. Barezat, N. Soltanizadeh, Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment, *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 39 (2017) 223–229.
- [28] M. Esti, I. Benucci, C. Lombardelli, K. Liburdi, A.M.V. Garzillo, Papain from papaya (*Carica papaya* L.) fruit and latex: Preliminary characterization in alcoholic-acidic buffer for wine application, *Food Bioprod. Process.* 91 (4) (2013) 595–598.
- [29] M. Braia, M. Ferrero, M.V. Rocha, D. Loureiro, G. Tubio, D. Romanini, Bioseparation of papain from *Carica papaya* latex by precipitation of papain-poly (vinyl sulfonate) complexes, *Protein Expr. Purif.* 91 (1) (2013) 91–95.
- [30] M. Funk, Y. Nakagawa, J. Skochdopole, E. Kaiser, Affinity chromatographic purification of papain a reinvestigation, *Int. J. Pept. Protein Res.* 13 (3) (1979) 296–303.
- [31] L. Fukal, J. Káň, E. Paluska, Chromatographic separation of papain evaluated by immunochemical methods, *J. Chromatogr. A* 285 (1984) 365–372.
- [32] M. Azarkan, A. El Moussaoui, D. van Wuytswinkel, G. Dehon, Y. Looze, Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*, *J. Chromatogr. B* 790 (1–2) (2003) 229–238.
- [33] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1) (1976) 248–254.
- [34] A.A. Kembhavi, A. Kulkarni, A. Pant, Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38 (1) (1993) 83–92.
- [35] J.G. Sargeant, H.M. Bowie, M.J. Billington, Determination of papain in raw meat by immunoassay, *Meat Sci.* 34 (1) (1993) 39–47.
- [36] B. Picard, M. Kammoun, M. Gagaoua, C. Barboiron, B. Meunier, C. Chambon, I. Cassar-Malek, Calcium homeostasis and muscle energy metabolism are modified in HspB1-null mice, *Proteomes* 4 (2) (2016) 17.
- [37] K. Devaraj, L.R. Gowda, V. Prakash, An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.), *Phytochemistry* 69 (3) (2008) 647–655.
- [38] M. Gagaoua, K. Laouar, I. Hammou, K. Hafid, Towards Proteomic Biomarkers of Water Holding Capacity of Algerian Dromedary One-Humped Camel Meat: proteome basis concerning the drip loss defect, in: P.A. Ozpinar (Ed.), X Annual Congress of the European Proteomics Association (EuPA), Istanbul, Turkey, 2016.
- [39] K. Hafid, M. Gagaoua, H.-R. Boudechich, S.N. Rabah, F. Ziane, M. Sellama, S. Becila, A. Boudjellal, A comparison of the carcass and meat quality of ISA (F15) spent hens slaughtered at two different ages, *Am. J. Food Technol.* 11 (4) (2016) 134–142.
- [40] S. Dhananjay, V. Mulimani, Purification of  $\alpha$ -galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*, *Biotechnol. Lett.* 30 (9) (2008) 1565–1569.
- [41] C. Dennison, R. Lovrien, Three phase partitioning: concentration and purification of proteins, *Protein Expr. Purif.* 11 (2) (1997) 149–161.
- [42] E. Kiss, J. Szamos, B. Tamas, R. Borbas, Interfacial behavior of proteins in three-phase partitioning using salt-containing water tert-butanol systems, *Colloid Surface A* 142 (2–3) (1998) 295–302.
- [43] R. Pike, C. Dennison, Protein fractionation by three phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures, *Biotechnol. Bioeng.* 33 (2) (1989) 221–228.
- [44] Z.G. Jiang, H.D. Zhang, W.T. Wang, Purification of papain by metal affinity partitioning in aqueous two-phase polyethylene glycol/sodium sulfate systems, *J. Sep. Sci.* 38 (8) (2015) 1426–1432.
- [45] Y. He, S.M.S. bin Tuan Chik, F.C. Chong, Purification of papain from unclarified papaya juice using reversed phase expanded bed adsorption chromatography (RP-EBAC), *J. Ind. Eng. Chem.* 20 (6) (2014) 4293–4297.
- [46] M.G.M. Purwanto, The role and efficiency of ammonium sulphate precipitation in purification process of papain crude extract, *Procedia Chem.* 18 (2016) 127–131.
- [47] S. Nitsawang, R. Hatti-Kaul, P. Kanasawud, Purification of papain from *Carica papaya* latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (5) (2006) 1103–1107.
- [48] M.V. Rocha, M. Di Giacomo, S. Beltramo, W. Loh, D. Romanini, B.B. Nerli, A sustainable affinity partitioning process to recover papain from *Carica papaya* latex using alginate as macro-ligand, *Sep. Purif. Technol.* 168 (2016) 168–176.
- [49] S. Blumberg, I. Schechter, A. Berger, The purification of papain by affinity chromatography, *Eur. J. Biochem.* 15 (1) (1970) 97–102.
- [50] M. Azarkan, R. Dibiani, C. Baulard, D. Baeyens-Volant, Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 38 (3) (2006) 216–224.
- [51] A. Pendzhiev, Proteolytic enzymes of papaya: medicinal applications, *Pharm. Chem. J.* 36 (6) (2002) 315–317.
- [52] B. Turk, V. Turk, D. Turk, Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors, *Biol. Chem.* 378 (3–4) (1997) 141–150.
- [53] D.H. Calam, J. Davidson, R. Harris, High-performance liquid chromatographic investigations on some enzymes of papaya latex, *J. Chromatogr. A* 326 (1985) 103–111.
- [54] D.J. Buttle, P.M. Dando, P.F. Coe, S.L. Sharp, S.T. Shepherd, A.J. Barrett, The preparation of fully active chymopapain free of contaminating proteinases, *Biol Chem Hoppe Seyler* 371 (11) (1990) 1083–1088.
- [55] I.G. Sumner, G.W. Harris, M.A. Taylor, R.W. Pickersgill, A.J. Owen, P.W. Goodenough, Factors effecting the thermostability of cysteine proteinases from *Carica papaya*, *Eur. J. Biochem.* 214 (1) (1993) 129–134.
- [56] R. Monti, C.A. Basilio, H.C. Trevisan, J. Contiero, Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*, *Brazilian Archives of Biol. Technol.* 43 (5) (2000) 501–507.
- [57] A. Nafi, F. Ling, J. Bakar, H. Ghazali, Partial Characterization of an Enzymatic Extract from Bentong Ginger (*Zingiber officinale* var. Bentong), *Molecules* 19 (8) (2014) 12336–12348.
- [58] A.A. Homaei, R.H. Sajedi, R. Sariri, S. Seyfzadeh, R. Stevanato, Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain, *Amino Acids* 38 (3) (2010) 937–942.
- [59] K. Sangeetha, T.E. Abraham, Chemical modification of papain for use in alkaline medium, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 38 (3) (2006) 171–177.
- [60] N. Espin, M.N. Islam, Stabilization of papain from papaya peels / Estabilización de la papaina de la cáscara de papaya, *Food Sci. Technol. Int.* 4 (3) (1998) 179–187.
- [61] C.C. Ming, A. Bono, D. Krishnaiah, T. Han, Effects ionic and non-ionic surfactants on papain activity, *Borneo Sci* 12 (2002) 71–77.
- [62] R.G. Beka, F. Krier, M. Botquin, V.D. Guiama, P. Donn, D.G. Libouga, C.M. Mbofung, K. Dimitrov, M.-C. Slomianny, D. Guillochon, D. Vercaigne-Marko, Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp, *Int. Dairy J.* 34 (2014) 25–31.
- [63] V. García, S. Rovira, K. Bouteoil, D. Álvarez, M. López, A comparison of the use of thistle (*Cynara cardunculus* L.) and artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extracts for milk coagulation, *Dairy Sci. Technol.* 95 (2) (2014) 197–208.
- [64] A. Zikiou, M.N. Zidoune, Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a camembert-type cheese, *Int. J. Dairy Technol.* 72 (1) (2019) 89–99.
- [65] L. Sidrach, F. García-Cánovas, J. Tudela, J.N. Rodríguez-López, Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A, *Phytochemistry* 66 (1) (2005) 41–49.
- [66] L.B. Roseiro, M. Barbosa, J.M. Ames, R.A. Wilbey, Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses, *Int. J. Dairy Technol.* 56 (2) (2003) 76–85.
- [67] S. Chazarra, L. Sidrach, D. López-Molina, J.N. Rodríguez-López, Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers, *Int. Dairy J.* 17 (12) (2007) 1393–1400.
- [68] F. Claverie-Martín, M.C. Vega-Hernández, Aspartic proteases used in cheese making, *Springer, Industrial Enzymes*, 2007 207–219.
- [69] D. Istrati, The influence of enzymatic tenderization with papain on functional properties of adult beef, *J. Agroaliment. Proc. Technol.* 14 (2008) 140–146.
- [70] V. Jorgova, S. Danchev, A. Kostov, Effect of bacterial enzyme preparation on the solubility and electrophoretic properties of muscle proteins, *Proc. Int. Congr. Meat Sci. Technol.* (1989) 913–917.
- [71] C. Liu, Y.L. Xiong, G.K. Rentfrow, Kiwifruit protease extract injection reduces toughness of pork loin muscle induced by freeze–thaw abuse, *LWT – Food Sci. Technol.* 44 (10) (2011) 2026–2031.
- [72] M. Sugiura, M. Sasaki, Studies on proteinases from *Ficus carica* var. Hōraishi. V. Purification and properties of a sugar-containing proteinase (Ficin S), *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Enzymol.* 350 (1) (1974) 38–47.
- [73] V.K. Dubey, M. Jagannadham, Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*, *Phytochemistry* 62 (7) (2003) 1057–1071.
- [74] A.N. Singh, A.K. Shukla, M. Jagannadham, V.K. Dubey, Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain, *Process Biochem.* 45 (3) (2010) 399–406.
- [75] N. Priolo, S.M. Del Valle, M.C. Arribère, L. López, N. Caffini, Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits, *J. Protein Chem.* 19 (1) (2000) 39–49.
- [76] W.D. Obregón, M.C. Arribère, S.M. Del Valle, C. Liggieri, N. Caffini, N. Priolo, Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits, *J. Protein Chem.* 20 (4) (2001) 317–325.
- [77] S. Kundu, M. Sundd, M.V. Jagannadham, Purification and characterization of a stable cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *ervatamia coronaria*, *J. Agric. Food. Chem.* 48 (2) (2000) 171–179.

- [78] S. Nallamsetty, S. Kundu, M.V. Jagannadham, Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*, *J. Protein Chem.* 22 (1) (2003) 1–13.
- [79] S.R. Morcelle, S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Avilés, N.S. Priolo, Funastrin c II: a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*, *Protein. J.* 23 (3) (2004) 205–215.
- [80] B.K. Patel, M.V. Jagannadham, A high cysteine containing thiol proteinase from the latex of *Ervatamia heyneana*: purification and comparison with ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*, *J. Agric. Food. Chem.* 51 (21) (2003) 6326–6334.
- [81] C. Sequeiros, M. Torres, S. Trejo, J. Esteves, C. Natalucci, L. López, Philibertain g I, the most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii*, Hook. et Arn. (Apocynaceae), *The Protein Journal* 24 (7–8) (2005) 445–453.
- [82] C. Sequeiros, M.J. Torres, M.L. Nievas, N.O. Caffini, C.L. Natalucci, L.M. López, S.A. Trejo, The proteolytic activity of *Philibertia gilliesii* latex Purification of Philibertain g II, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 179 (2) (2016) 332–346.
- [83] W. Liu, W. Ye, Z. Wang, H. Chao, J. Lian, Preparation and characterization of a truncated caricain lacking 41 residues from the N-terminal, *Protein. J.* 24 (4) (2005) 243–251.





## Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex



Mohammed Gagaoua<sup>a,\*</sup>, Nawel Boucherba<sup>b</sup>, Amel Bouanane-Darenfed<sup>c</sup>, Ferhat Ziane<sup>d</sup>, Sabrina Nait-Rabah<sup>d</sup>, Kahina Hafid<sup>a</sup>, Hiba-Ryma Boudechicha<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Equipe Maquav, Laboratoire Bioqual, INATAA, Université Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

<sup>b</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Nature Science and Life, University of Abderrahmane MIRA, Targa Ouzemmour, Bejaia 06000, Algeria

<sup>c</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Biology (Microbiology group), Faculty of Biology, University of Science and Technology, Houari Boumediene, Bab Ezzouar, Algiers 16000, Algeria

<sup>d</sup> INATAA, Université Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 February 2014

Received in revised form 21 May 2014

Accepted 24 May 2014

Available online 12 June 2014

#### Keywords:

Fig (*Ficus carica* L.) latex

Ficin

Recovery

Purification

Three phase partitioning (TPP)

### ABSTRACT

Three phase partitioning or TPP consists of proteins' precipitation due to simultaneous presence of ammonium sulfate and *t*-butanol. The technique has been successfully used for the partial purification of ficin (EC 3.4.22.3) from *Ficus carica* latex. In this study, ficin of Mediterranean *F. carica* was for the first time partially purified and recovered in a single step using TPP. Optimal purification parameters of the system were 40% ammonium sulfate saturation (*w/v*) with 1.0:0.75 (*v/v*) ratio of crude extract: *t*-butanol at pH 7.0, which gave 6.04 purification fold with 167% recovery of ficin. The enzyme was found to be exclusively partitioned in the interfacial precipitate phase. The Tricine SDS–polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the enzyme showed comparatively purification and protein molecular weight of the enzyme was nearly found to be 23.4 kDa. Characterization of enzyme showed that optimal pH of purified enzyme was 6.5 and optimal temperature was 60 °C. The enzyme was found to be stable at 40–70 °C for 1 h. This study showed that TPP is a simple, economical and quick method for ficin recovering from *F. carica* latex trees and can be performed in a purification process to be used successfully in food industries.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Numerous purification protocols have been described in the last decades but none of them can be generally applied. Most of these separation techniques are expensive, time consuming, involving number of steps and furthermore the scale up of these methods is difficult. Considering these problems, there is a prominent need to perform simple, more efficient and economical purification strategies for separation and purification of target proteins, especially enzymes. Three-phase partitioning (TPP), a technique first described by Lovrien's group [1], was intensively used to purify several target proteins [2–6].

TPP is a relatively novel method, which uses tertiary butanol (*t*-BuOH) and ammonium sulfate to form a two-phase system in which macromolecules precipitate at the interface, hence forming

the third phase. TPP involves several techniques such as salting out, isoionic precipitation and co-solvent precipitation of proteins. It is easily scalable and can be used directly with crude suspensions [7]. By this method, the desired enzymes or proteins are selectively partitioned to one phase while contaminants such as pigments and lipids to the other one. It does not only purify the proteins but also concentrate them into one of the phases [4,8,9]. The present study describe, for the first time, the purification and recovery of ficin (also spelled as ficain, EC 3.4.22.3) from a crude extract of Mediterranean latex fig trees (*Ficus carica*) using the TPP system by optimizing some parameters such as concentration of *t*-butanol, pH and ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) amount. *F. carica*, a deciduous tree belonging to the Moraceae family, is one of the earliest cultivated fruit trees and an important crop worldwide for both dry and fresh consumption. The latex of this plant constitutes an important source of many proteolytic components known under the general term of ficin, which belongs to the cysteine proteases of the papain family. They can be used in food industry as meat tenderizers [10,11] and in cheese production [12]. They are also used, in their purified forms, as proteolytic agents in many laboratory procedures [13].

\* Corresponding author. Address: Maquav Team, Bioqual Laboratory, I.N.A.T.A.-A – Université Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria. Tel.: +213 31 66 18 83, mobile: +213 776 09 88 07; fax: +213 31 66 18 84.

E-mail addresses: [gmb2001@yahoo.fr](mailto:gmb2001@yahoo.fr), [mgagaoua@inataa.org](mailto:mgagaoua@inataa.org) (M. Gagaoua).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

*Tert*-Butanol, ammonium sulfate, Coomassie Brilliant Blue R-250, acrylamide, bisacrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), dithiothreitol (DTT), L-cysteine, ammonium persulfate, *N,N,N,N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), Casein from bovine milk, bovine serum albumin (BSA) and Tricine, were of pure grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bradford reagent and molecular markers for electrophoresis were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Trichloroacetic acid (TCA), hydrochloric acid and tris-(hydroxymethyl)-aminomethane were from Merck (Germany). All other chemicals and reagents were of the highest available purity and used as purchased. All solutions were prepared using deionized water and stored at the appropriate temperatures.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Collection of latex

Fresh fig latex was collected by breaking the immature green fruits of *F. carica* L. tree growing in Kabylia, a Mediterranean region (Beni-Djellil, Bejaia), in a clean tube containing 0.05%  $\text{NaN}_3$ . All the latex samples used in this study were collected early in the morning at the end of August. The latex fluid was transported to the laboratory in adequate conditions and immediately stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use.

#### 2.2.2. Preparation of crude extract

The frozen latex was thawed at  $4^\circ\text{C}$  and diluted with distilled water (1.0:0.5), mixed well and then subjected to centrifugation at 5000 rpm for 15 min at  $4^\circ\text{C}$  to remove gum and other debris. The insoluble material was discarded and the supernatant was filtered through Whatman paper No. 1. The clarified juice referred to as "crude extract" was dialyzed overnight (membrane molecular weight cut off: 14 kDa) against 50 mM, pH 7.0 phosphate buffer, at  $4^\circ\text{C}$ . After dialysis, the crude extract sample was subjected to TPP purification system. A flow sheet of the various steps involved in the purification is shown in Fig. 1.

#### 2.2.3. Three phase partitioning of ficin

TPP experiments were carried out as described by Dennison and Lovrien [7] with slight modifications. First, the crude extract of *F. carica* latex (2 ml containing 21.34 units and 15.78 mg protein) was saturated at  $25^\circ\text{C}$  with 30% ammonium sulfate. The mixture was vortexed gently and then allowed to stand for 45 min at  $25^\circ\text{C}$ . Afterward the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min at  $+4^\circ\text{C}$  to facilitate the separation of the three phases. The upper *t*-butanol phase was removed by a Pasteur pipette. The lower aqueous phase and the interfacial phase were separated carefully and analyzed for enzyme activity and protein content. The interfacial precipitate was dissolved in 50 mM, pH 7.0 phosphate buffer.

The effect of salt concentrations (20, 30, 40, 50, 60, and 70%) (*w/v*) on the crude enzyme extract for the TPP at the constant crude extract: *t*-butanol ratio (1.0:1.0) was investigated.

After that, various *t*-butanol ratios (crude extract: *t*-butanol; 1.0:0.25, 1.0:0.5, 1.0:0.75, 1.0:1.0, 1.0:1.25, 1.0:1.5, 1.0:1.75, 1.0:2.0) were employed with a constant ammonium sulfate saturation at 40% at  $25^\circ\text{C}$ .

After, the *t*-butanol and ammonium sulfate, effects with different pH values of medium study were studied. Crude extract was saturated with 40% ammonium sulfate and pH was adjusted to 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 with the 0.5 M HCl or 0.5 M NaOH, then 1.0:0.75

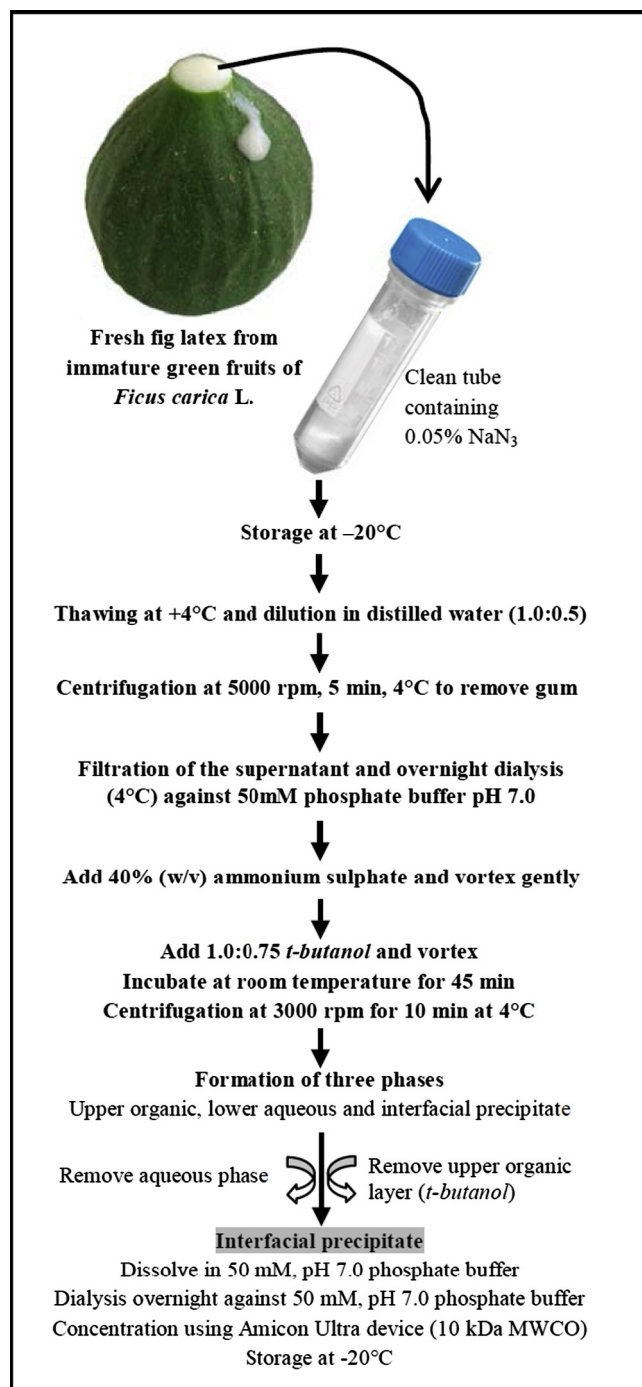


Fig. 1. Flow sheet of the steps involved in the three phase partitioning (TPP) of ficin from fresh Mediterranean *Ficus carica* latex.

*t*-butanol was added and the best pH value on the partitioning behavior of ficin was investigated.

After optimisation of the parameters (40% ammonium sulfate, 1.0:0.75 ratio crude extract to *t*-butanol and pH 7.0), the interfacial precipitate phase always containing the higher ficin activity was collected, dissolved in 50 mM, pH 7.0 phosphate buffer, dialyzed overnight against the same buffer and concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra device with a 10 kDa molecular weight cut-off. The concentrated enzyme was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use for further characterization studies in order to determine the general biochemical properties of the enzyme.

#### 2.2.4. Protein determination

The protein concentration was quantified by the dye binding method of Bradford [14] using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Bovine serum albumin (BSA) at a concentration of 1 mg ml<sup>-1</sup> was used as standard.

#### 2.2.5. Enzymatic activity measurements

Ficin activity was assayed at 37 °C using bovine casein (1% w/v) as substrate in a 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 containing 250 mM EDTA and 250 mM L-cysteine at enzyme concentrations of 0.25 mg/ml. The hydrolyzing activity of ficin was based on the method described by Kunitz with some modifications using denatured casein as a substrate [15]. In activity measurements, 0.12 ml enzyme was incubated at 37 ± 1 °C for 20 min prior to the assay. The reaction was stopped by the addition of 1.8 ml of 5% Trichloroacetic acid (TCA). For the blank, the substrate was added after the enzyme was first inactivated by TCA. The resulting precipitate was removed by centrifugation at 4500 rpm for 15 min, and the absorbance of TCA soluble peptides in the supernatant was measured at 280 nm. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that increases the absorbance by 0.001 min<sup>-1</sup> under given assay conditions.

#### 2.2.6. Effect of temperature on the activity and stability of partitioned ficin

The temperature profile of ficin was determined by performing the standard assay procedure at different temperatures (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90 °C). The relative activities as percentages were expressed as the ratio of ficin activity obtained at a certain temperature to the maximum activity obtained at the given temperature range.

The thermal stability of the enzyme was determined by measuring the residual activity of the enzyme exposed at the same temperatures in phosphate buffer for 1 h with continuous shaking. After desired incubation periods, enzyme aliquots were withdrawn and assayed at optimal assay conditions to determine the residual enzyme activity.

#### 2.2.7. Effect of pH on enzyme activity

The effect of pH on the enzyme activity of ficin was evaluated from pH 3.0 to 9.0 as described by Devaraj et al. [16] using the following buffers: 50 mM citrate buffer (pH 3.0–6.0), 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5–7.5), and 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0–9.0). Activity of the ficin was determined as mentioned above.

#### 2.2.8. Tricine SDS–poly acrylamide gel electrophoresis

Tricine SDS–PAGE with slight modifications was carried out according to Haider et al. [17] using 10% separating and 4% stacking gels. The samples were mixed at a ratio of 1:1 with the buffer sample containing 100 mM Tris–HCl (pH 6.8), 1% (w/v) SDS, 0.75% (w/v) DTT, 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 and 20% (w/v) glycerol and heated for 10 min in a bath water at 75 °C. Fifteen micrograms of proteins were loaded and then subjected to separate in 25 mM Tris, 25 mM Tricine and 0.05% (w/v) SDS migration buffer for 4 h at 120 V. After separation, the gel was stained overnight with staining solution (4.9 mM Coomassie Brilliant Blue R-250) in 50% (v/v) ethanol, and 7.5% (v/v) acetic acid. Protein patterns were then visualized after destaining the gel until a clear background was achieved. A mixture of protein molecular weight markers obtained from Bio-Rad (No. 161-0304), contained: Lysozyme (14.400), Soybean trypsin inhibitor (21.500), carbonic anhydrase (31.000), ovalbumin (45.000), bovine serum albumin (66.200) and Phosphorylase b (97.400) was used. The molecular mass of the protein bands was calculated using the Un-Scan-It gel 6.5 analysis program (Silk Scientific, Orem, UT).

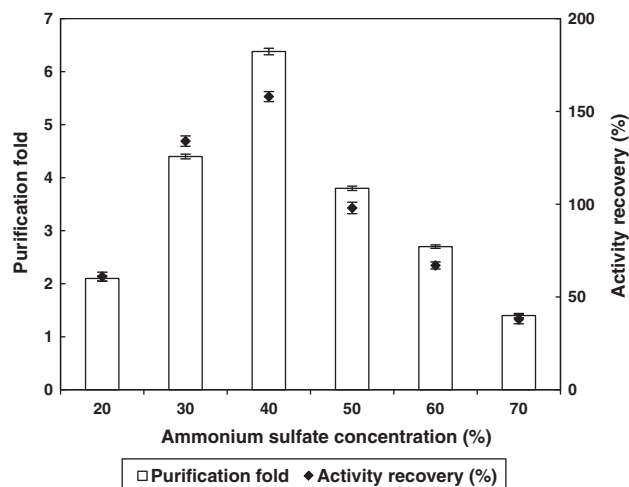
### 3. Results and discussions

Proteases from plant sources have received special attention from the pharmaceutical industry and by food biotechnology due to their properties of activity over a wide range of temperature and pHs. Proteases from plant latex were widely used to reduce meat toughness [10]. These proteases include papain from *Carica papaya* [18], ficin from *F. carica* [19] and many others (for review see [11]). They are also used, in their purified forms, as proteolytic agents in many laboratory procedures. For example, two partially purified ficin forms were observed to activate human coagulation factor X [13]. When compared to other cysteine proteases like papain and bromelain, ficin was shown to specifically cleave mouse IgG1, giving better yields and immunoreactivity [20]. Considering their potential uses in industry, it becomes desirable the developing of simple and efficient methods for the recovery and purification of these enzymes.

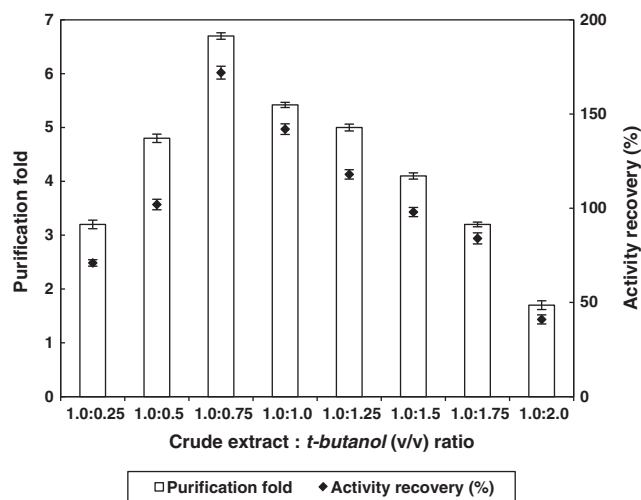
#### 3.1. Three-phase partitioning of Ficin from *F. carica* latex

The latex of *F. carica* L. constitutes an important source of many proteolytic components known under the general term of ficin or recently ficain (EC 3.4.22.3). This enzyme is similar to papain in structure and it contains sulfhydryl group as the main involving part for the proteolytic activity [21,22]. To this date, most of the work has been carried out on the enzyme prepared from the latex of *Ficus glabrata* (the commercially available dried latex) and a very few studies have been done on the ficin isolated from *F. carica* latex. This study aimed the purification of ficin using a rapid and efficient method, given that all known methods are expensive and time-consuming. In our study, the enzyme was purified for the first time to homogeneity from immature green fruits of the Mediterranean *F. carica* fig using three phase partitioning system. TPP is a simple, economical and large-scale applicable but an elegant non chromatographic process used for purification and concentration of proteins. Separation of the enzyme from complex media during the partitioning was operated by multiple effects, such as salt concentration, solvent ratio and pH [7]. Therefore, the effect of various parameters on TPP was investigated. For this purpose, different partitioning experiments at various saturations of ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20%, 30%, 40%, 50%, 60% and 70%, w/v), crude extract to *t-butanol* ratios (1.0:0.25, 1.0:0.5, 1.0:0.75, 1.0:1.0, 1.0:1.25, 1.0:1.5, 1.0:1.75 and 1.0:2.0, v/v) and pHs (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0) were performed. The starting protein concentration (containing 10.65 units/ml of ficin activity) was 7.89 mg/ml. The effects of these parameters on the degree of purification and on the activity recovery of ficin from the crude extract are presented in Figs. 2–4, respectively. As presented in the figures, all these process parameters are very important and effective on the partitioning of the ficin from *F. carica* fig latex.

The efficiency of the salting out of proteins will first depend on (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and second on the net charge of the proteins. Ammonium sulfate saturation is of a critical importance and must be optimized so that adequate quantities of ficin are extracted with minimal interference from contaminating material coming from complex media. Generally, one starts with a minimum salt concentration of 20% (w/v) and optimizes this so as to obtain the maximum amount of the desired protein in the interfacial precipitate [7]. The influence of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturation was studied by maintaining the ratio of crude extract to *t-butanol* ratio constant (1.0:1.0) and varying the saturation of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> from 20% to 70% (w/v) (Fig. 2). As shown in Fig. 2, the maximum fold purification of 6.4-fold along with 158% recovery of ficin activity in the interfacial precipitate was obtained with 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturation. This salt saturation was sufficient enough to concentrate the

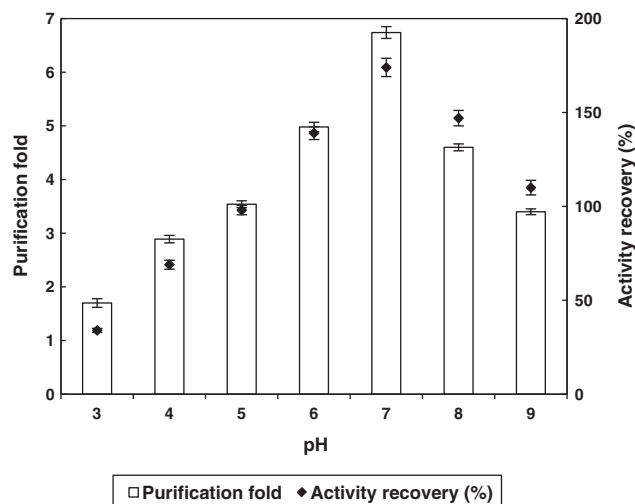


**Fig. 2.** Effect of varying saturations of ammonium sulfate on the degree of purification and activity recovery of *Ficus carica* ficin. The crude extract (2 ml containing 21.34U) was brought to different levels of saturation and *t-butanol* was added in the ratio 1.0:1.0 (v/v) with respect to the volumes of the aqueous extract.



**Fig. 3.** Optimization of crude extract to *t-butanol* ratio for the recovery of *Ficus carica* ficin. Various amount of *t-butanol* was added to crude extract, 2 ml containing 21.34U and saturated with 40% ammonium sulfate.

ficin in this phase, a finding in agreement to its known property as a soluble protein against ammonium sulfate [23]. Sometimes TPP leads to simultaneous activation of the enzyme and this may be the result of increased flexibility in the enzyme molecule [6]. A remarkable increase in the catalytic activity and yield of pectinase [24] and invertase [2,25] obtained from TPP has been reported. With an increase in concentration of ammonium sulfate, the degree of purification (purification fold) decreased significantly above 40% (w/v), while the activity recovery initially increased from 61% at 20%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  to 158% at 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and then decreased to 38% at 70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Fig. 2). Sulfate ion and *t-butanol* are known to be excellent protein structure markers (kosmotropes) [7]. The principle of sulfate ion for salting out protein has been viewed in five different ways namely, (i) ionic strength effects, (ii) kosmotropy, (iii) cavity surface tension enhancement osmotic stressor (dehydration), (iv) exclusion crowding agent, and (v) the binding of  $\text{SO}_4^{2-}$  to cationic sites of protein [6]. At concentrations of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  greater than 40%, the activity yield decreased significantly due to the precipitation of protein and may possibly cause its irreversible denaturation. Higher



**Fig. 4.** Influence of pH on the degree of purification and activity recovery of *Ficus carica* ficin. Ammonium sulfate (40%, w/v) was added to the crude extract (2 ml containing 21.34U). The pH of the medium was adjusted to different pH values. This was followed by addition of *t-butanol* in a ratio of 1.0:0.75 (v/v).

concentrations of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (>40%) causes a reduction in the selectivity of extraction and also degree of purification. Therefore, ammonium sulfate saturation was used as 40% (w/v) for further partitioning experiments.

After the selection of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation, the ratio of the volume of crude extract to *t-butanol* which is also very important in TPP was optimized. *t-Butanol* was chosen as the organic co-solvent for partitioning of ficin in TPP as it has been generally reported to give best results [1,3,4,7,9]. Due to its size and branched structure, *t-butanol* does not easily permeate inside the folded protein molecules and hence does not cause denaturation. In order to determine the best ratio, the ammonium sulfate saturation was fixed to 40% (v/v) and the crude extract: *t-butanol* ratio was varied from 1.0:0.25 to 1.0:2.0 (v/v). The highest ficin recovery (172%) and purification fold (6.7) were obtained from the interfacial precipitate phase of the TPP system when the crude extract to *t-butanol* ratio was 1.0:0.75 at 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation (Fig. 3). From these findings, the ratio of crude extract to *t-butanol* of 1.0:0.75 was selected for investigating the effect of pH value on the TPP system. This optimum ratio presumably arises as a result of two factors. If the amount of *t-butanol* is lower, it does not adequately synergize with ammonium sulfate. If it is higher, it is likely to cause protein denaturation [3,6]. In this study, we have sometimes met some difficulties in the reproducibility of the enzyme recovery using the same experimental conditions. Numerous explanations can be provided. The first one concern the exclusive partitioning of our enzyme in the interfacial phase where sometimes we assist to a little loss of the protein in the bottom phase at the recuperation step, hence a little loss of the specific activity. The second one, the differences in the enzyme activities can be due to the fantastic characteristic of the TPP system by its enhancing activity. This curious feature of this elegant non chromatographic process believed to be unexpected in protein isolations, was reported to occur in numerous studies [26,27] as discussed above. Also, probably conformation changes occurred in the mixtures but with little differences in the rate and extent of the partitioning process in spite of the rigorous applied conditions. This point of view needs more investigations for better knowledge. Nevertheless, this phenomenon was already reported in previous studies. For example, when pure Proteinase K was subjected to TPP and its structure analyzed by X-ray diffraction at 1.5 Å resolution [26], a higher overall temperature factor was observed, as a result of which side chains of several



amino acid residues in the binding site were found to adopt more than one conformation. This led us to stress forward that little differences in the excited state of the ficin at the moment of the separation were occurred. Another explication is probably the ficin autolysis/activity enhancing fold. The enhancing activity of the TPP system is the most favored in our case to prevent the enzyme digestion. Otherwise, the ability of TPP to refold proteins suggests that the higher specific activity often observed after TPP using the same conditions (for example see [2]) may be partly due to renaturation of partially denatured ficins.

The pH of the reaction mixture was also reported to be a very important parameter in TPP [4,6,28]. The efficiency of the salting out of proteins will depend on the net charge of the proteins present in the medium which is highly pH dependent. Also, distribution and partitioning of macromolecules in TPP systems change with pH due to electrostatic interactions between phases and charged proteins. Hence, the effect of pH on the partitioning of ficin was investigated. The ficin crude extract was saturated with 40% (w/v) of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and then the pH was adjusted. *t-Butanol* was added to this mixture in the ratio of 1.0:0.75 (v/v). After 45 min, the three phases were formed and collected separately. Ficin had partitioned selectively to the interfacial phase. 40% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation with 1.0:0.75 ratio of crude extract to *t-butanol* (v/v) at pH 7.0 gave a maximum 6.74-fold purification and 174% activity recovery of ficin (Fig. 4). TPP systems usually sharply change around the isoionic point of enzymes because of the electrostatic component of the reactions when sulfate anion binding to cationic proteins is involved [7]. In TPP, if the system pH is above isoelectric point (pI) of protein, the protein will acquire net negative charge and will be propelled to bottom aqueous phase. On the other hand, if system pH is below pI of target protein, it will be precipitated or accumulated at the interfacial phase. Dennison [6] reviewed recently that change in pH facilitates the change in net charge of target protein and influences partitioning of protein. Effect of different pH on TPP of ficin (Fig. 4) indicates that, as pH increased from 3 to 7, fold purity of partitioned enzyme was increased along with increased% yield as pI of ficin is around 9.0. Wang et al. [28] have reported enhanced partitioning of  $\alpha$ -amylase inhibitors in bottom phase at a pH 5.25 and 6.0, which was above its pI 5.2. Hence, pH 7.0 was found to be optimum in this study for partitioning of *F. carica* ficin.

The overall purification profile of ficin from *F. carica* latex by TPP is summarized in Table 1. As understood from the obtained results, it can be said that ficin has tendency to concentrate in the interfacial phase of the TPP system that is related to its structure. The TPP system consisting of 1.0:0.75 of sample to *t-butanol* and 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  resulted in the highest proteases recovery at 167%, and a 6.04-fold purification at the interfacial precipitate. TPP is known as a concentrating or dewatering step and some enzymes have enhanced catalytic activities in these conditions. This process system leads to simultaneous activation of enzyme which results to such an apparently observed yield value more than 100% [29]. This may be the result of increased flexibility in the enzyme molecule. A remarkable increase in the catalytic activity and yield of pectinase, proteinase K and trypsin inhibitor

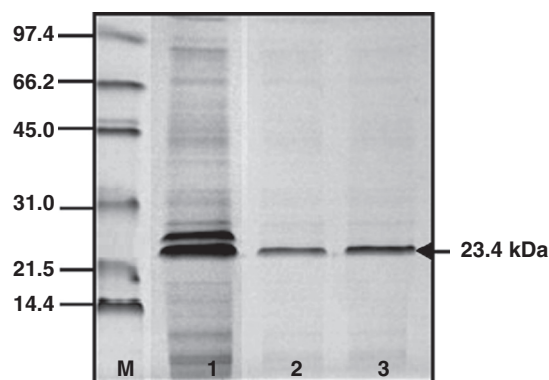


Fig. 5. Tricine SDS-PAGE analysis using a 10% separating polyacrylamide gel. M: molecular mass standards; lane 1: crude extract after dialysis; lane 2: purified ficin using TPP system after dialysis; lane 3: concentrated ficin using Amicon Ultra device (10 kDa MWCO).

obtained from TPP has been reported [4,24,26,30]. A TPP process has been gave the yield of 183% with purification fold of 9 for the interphase of tomato pectinase [24]. Singh et al. [26] have been reported an increase in the catalytic activity of proteinase K obtained from TPP. The specific activity of the enzyme obtained after TPP has been estimated as 210% of the initial enzyme activity. Wati et al. [4] used the TPP as a single step process to purify trypsin inhibitor which has been purified to 5-, 14- and 7-fold with 315%, 441% and 228% yield (for the bottom phases of TPP) for navy bean, red kidney and adzuki bean, respectively. Dennison and Lovrien [7], reported that a *Bacillus subtilis* protease, *Saccharomyces cerevisiae* invertase, and *Candida cylindracea* lipase gave a yield of 300, 100 and 900%, respectively, after TPP. Additionally, Kumar et al. [31] reported that when TPP was applied to laccase, a yield of approximately 161% with 27.8 fold purity was obtained. As shown in Table 1, ficin was exclusively partitioned to the interfacial precipitate instead of the aqueous bottom phase, as indicated by the very high recovery.

### 3.2. Characterization of the purified Ficin from *F. carica* L. latex

The good properties of an enzyme offer potential for use in production processes. The biochemical properties of ficin are very critical for evaluation of its potential use especially in food and medicine industry. Therefore, we have an attempt to characterize the partitioned *F. carica* ficin. We have also determined the properties of the enzyme regarding remaining activity, pH and thermal stability. The results are given below in proper sections and also discussed by comparing with other enzymes isolated from *Ficus* species.

#### 3.2.1. SDS-PAGE analysis

For good protein separation and high resolution, a Tricine SDS-PAGE analysis was judged more advantageous and hence used in this study to characterize the partitioned ficin. The enzyme was

Table 1  
Three-phase partitioning purification and recovery profile of Ficin from fresh Mediterranean *Ficus carica* latex.<sup>1</sup>

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	10.65	7.89	1.35	1	100
Interfacial phase of TPP	17.78	2.18	8.15	6.04	167
TPP aqueous phase	0.002	0.06	0.03	0.02	0.02

<sup>1</sup> The ammonium sulfate (40%, w/v) was added to the crude extract of *Ficus carica* latex (2 ml containing 21.34U) and then pH was adjusted to pH 7.0. This was followed by addition of *t-butanol* in a ration of 1.0:0.75 (v/v) (crude extract: *t-butanol*). Three phases formed were collected separately. The upper phase was removed and then the lower aqueous phase and interfacial precipitate were tested for enzyme activity and protein amount.

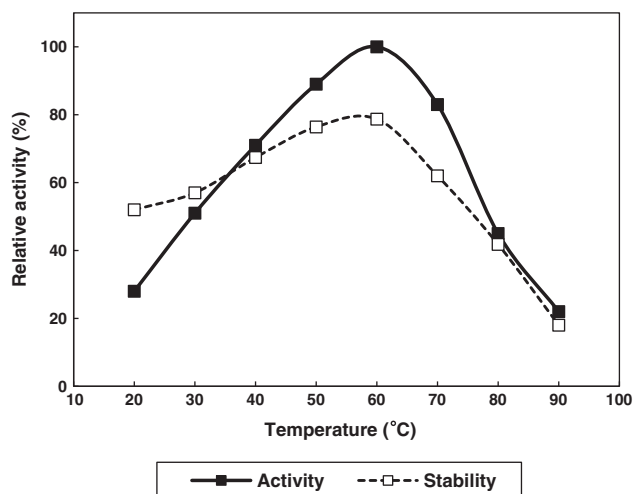


Fig. 6. Effect of temperature on the activity and the stability of *Ficus carica* ficin. Activity was done at defined temperatures by using bovine casein. Thermal stability was done after 1 h incubation at the indicated temperatures.

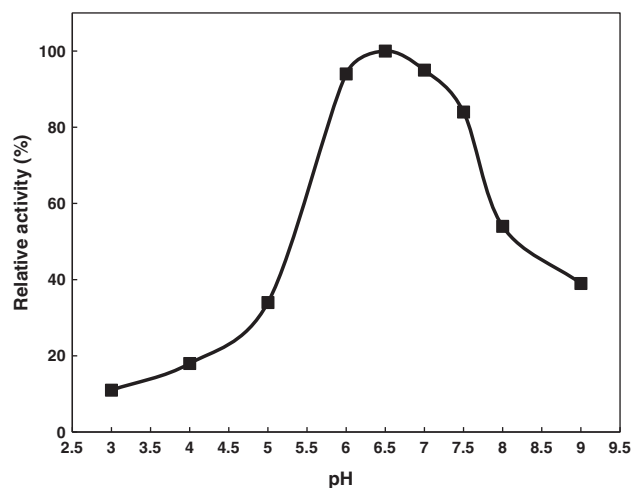


Fig. 7. Effect of pH on the activity of *Ficus carica* ficin. Activity was done after incubation at indicated pHs and activities were assayed using bovine casein.

found to be nearly homogenous with a molecular weight corresponding to 23.4 kDa (Fig. 5). The molecular weights of ficin are varying according to their source and the applied method. Ficin with an apparent molecular weight of 26 kDa is obtained from

the latex of *F. glabrata*, *Ficus anthelmintica* and *F. forsteriana* [32]. In agreement to our findings, Devaraj et al. [16] purified using cation-exchanger column chromatography, a single homogenous ficin from *F. carica* with an apparent molecular weight of 23.1 kDa  $\pm$  0.3 kDa. In addition, Zare et al. [33] purified recently a homogenous ficin from *Ficus c. cv. Sabz* which was found to share a molecular weight of 23 kDa. Generally, the estimated molecular masses of purified ficins falls in the range of 20–35 kDa, which is also the reported range of values for many other cysteine proteases [34]. Otherwise, the molecular weight of ficin fractions isolated from *Ficus glabrata* is in the range between 25 and 26 kDa [35–37]. From these findings, it appears that ficins may vary in their amino acid sequences, which can lead to conformational differences. Until now, most of the work has been carried out on the enzymes prepared from the latex of fig species, and very few studies have been done from the latex of specific fig cultivars. However, previous work showed that the number and relative amounts of the components of *F. carica* differed among the studied cultivars or varieties [23].

### 3.2.2. Effect of temperature on the activity and stability of ficin

The effect of temperature on ficin activity and stability was studied in the temperature range of 20–90 °C (Fig. 6). It is well known that the reaction rate of enzymes increases with increasing temperature, but after a certain temperature activity, it decreases due to denaturation [25,31,38]. The optimum temperature of the fractionated ficin was found to be 60 °C (Fig. 6). Our findings show that even at high temperatures the activity of the enzyme was not lost rapidly. The enzyme retained more than 50% of its initial activity at a broad temperature range of 40–70 °C. The results compare well with the previous studies indicating optimal temperature range for ficin activity to be between 50 and 65 °C [16,39]. Thermal stability results indicated that the enzyme is stable between the temperatures' range of 40–70 °C.

### 3.2.3. Effect of pH on the activity of ficin

The purified ficin has pH activity as shown in the Fig. 7. The maximum activity was observed between pH 6.0 and 7.5 and showed optimum at pH 6.5. These results show that the enzyme is more active in the neutral range as compared to the acidic range characterized by the very low activity. In agreement to Devaraj et al. [16], the results again confirmed that the enzyme is unstable at acidic pH and the enzyme is most stable at pH 7.0. Similar results have been reported earlier by Kramer and Whitaker [40] that the different ficin forms from *F. carica* are more active at the neutral pH range. The acid liable nature of ficin from *F. glabrata* was also reported by Eugland et al. [35]. Also, the optimal pH for ficin activity varies with the substrate, ranging from 5 (for gelatin

Table 2  
Comparison of different processes from literature for ficin purification.

Source	Purification method steps	MW (kDa)	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Thermal stability	Refs.
<i>Ficus carica</i>	SP-Sepharose chromatography <sup>a</sup>	23.1	7	–	70 <sup>b</sup>	[16]
<i>F. carica cv. Horaishi</i>	CM-cellulose, CM-Sephadex and crystallization	26	8	60	67 <sup>c</sup>	[39]
<i>Ficus glabrata</i>	Ammonium sulfate precipitation, CM-cellulose chromatography and gel filtration	25–26	5–8	45–65	–	[35,36,41]
<i>Ficus racemosa</i>	Ammonium sulfate precipitation, Size exclusion chromatography and anion exchange chromatography	44.5	4.5–6.5	60	70 <sup>d</sup>	[42]
<i>Ficus carica</i>	Three phase partitioning system	23.4	6.5	60	40–70	Present study

<sup>a</sup> Commercial lyophilized ficin extract was used.

<sup>b</sup> Ficin loses 37% of its activity after 10 min of incubation.

<sup>c</sup> Inactivation temperature at pH 7.0 for 30 min.

<sup>d</sup> The enzyme exhibit 50% of its original activity after 1 h.

and elastin) to 9.5 (for casein). With gelatin there is another optimum at pH 7.5, and casein has another optimum at pH 6.7 [21].

### 3.2.4. Comparison of purification protocols with literature

Table 2 shows purification protocols and the biochemical results of ficin from different *Ficus* species. As seen in Table 2, the purification of ficin from several *Ficus* species includes at least two steps and one of them is certainly chromatography. These methods are cost effective and time consuming when compared to TPP. Though the overall purification is high in previous studies, the present study showed the same degree of purification and activity yields using TPP as a single purification step.

## 4. Conclusion

TPP was effectively applied for the first time for the purification and recovery of ficin from Mediterranean *F. carica* latex. The enzyme was purified to 6.04-fold with 167% recovery. TPP is an efficient method to separate proteins directly from crude enzyme extracts. The technique is of prime importance in protein concentration and purification, because it is fast, simple, scale-applicable and economic process. TPP system via *t-butanol* can be easily used at room temperature giving high recovery purifications. Using TPP system, ficin from *F. carica* was quickly purified to homogeneity with very high purity and activity. Using this technique, the enzyme was prevented from autolysis reported as a serious problem due to the different chromatographical steps used in the conventional methods.

## Acknowledgements

The authors would like to express their sincere thanks to INATAA institute, Constantine 1 University for financial support. Financial support and help to M.G from Arlabosse Family (Chemilly, France) is gratefully acknowledged.

## References

- [1] R. Lovrien, C. Goldensoph, P.C. Anderson, B. Odegaard, Three phase partitioning (TPP) via *t-butanol*: enzyme separation from crudes, *Protein Purif.: Micro Macro* (1987) 131–148.
- [2] E. Akardere, B. Ozer, E.B. Celem, S. Onal, Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast, *Separ. Purif. Technol.* 72 (2010) 335–339.
- [3] K. Mondal, S. Jain, S. Teotia, M.N. Gupta, Emerging options in protein bioseparation, in: M.R. El-Gewely (Ed.), *Biotechnology Annual Review*, Elsevier, 2006, pp. 1–29.
- [4] R.K. Wati, T. Theppakorn, S. Benjakul, S. Rawdkuen, Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds, *Process Biochem.* 44 (2009) 1307–1314.
- [5] N. Dogan, C. Tari, Characterization of three-phase partitioned exopolysaccharonase from *Aspergillus sojae* with unique properties, *Biochem. Eng. J.* 39 (2008) 43–50.
- [6] C. Dennison, Three-phase partitioning, in: H. Tschesche (Ed.), *Methods in Protein Biochemistry*, Walter de Gruyter, Berlin, Germany, 2011, pp. 1–5.
- [7] C. Dennison, R. Lovrien, Three phase partitioning: concentration and purification of proteins, *Protein Expr. Purif.* 11 (1997) 149–161.
- [8] L. Saxena, B.K. Iyer, L. Ananthanarayan, Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor, *Process Biochem.* 42 (2007) 491–495.
- [9] É. Kiss, J. Szamos, B. Tamás, R. Borbás, Interfacial behavior of proteins in three-phase partitioning using salt-containing water/*tert-butanol* systems, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 142 (1998) 295–302.
- [10] G.A. Sullivan, C.R. Calkins, Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue, *Meat Sci.* 85 (2010) 730–734.
- [11] A.A. Bekhit, D.L. Hopkins, G. Geesink, A.A. Bekhit, P. Franks, Exogenous proteases for meat tenderization, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54 (2014) 1012–1031.
- [12] A. Nouani, E. Dako, A. Morsli, N. Belhamiche, S. Belbraouet, M. Bellal, A. Dadie, Characterization of the purified coagulant extracts derived from Artichoke Flowers (*Cynara scolymus*) and from the Fig Tree Latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria, *J. Food Technol.* 7 (2009) 20–29.
- [13] G. Richter, H.P. Schwarz, F. Dorner, P.L. Turecek, Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from *Ficus carica*, *Brit. J. Haematol.* 119 (2002) 1042–1051.
- [14] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [15] M. Kunitz, Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties, *J. Gen. Physiol.* 30 (1947) 291–310.
- [16] K.B. Devaraj, P.R. Kumar, V. Prakash, Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 11417–11423.
- [17] S.R. Haider, H.J. Reid, B.L. Sharp, Tricine-SDS-PAGE, *Meth. Mol. Biol.* 869 (2012) 81–91.
- [18] S. Nitsawang, R. Hatti-Kaul, P. Kanasawud, Purification of papain from *Carica papaya* latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation, *Enz. Microb. Technol.* 39 (2006) 1103–1107.
- [19] L. Huang, H.-Z. Qu, L. Zhang, S.-S. Du, S. Yang, D.-Y. Hao, X.-P. Wang, Purification and characterization of a proteolytic enzyme from fig latex, *Chem. Res. Chin. Univ.* 24 (2008) 348–352.
- [20] M. Mariani, M. Camagna, L. Tarditi, E. Seccamani, A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab)<sub>2</sub> suitable for clinical use from mouse IgG1, *Mol. Immunol.* 28 (1991) 69–77.
- [21] I.E. Liener, B. Friedenson, Ficin, in: L.L. Gertrude, E. Perlmann (Eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1970, pp. 261–273.
- [22] A. Singleton, D.J. Buttle, Chapter 428 – Ficin, in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, 2013, pp. 1877–1879.
- [23] V.C. Sgarbieri, S.M. Gupte, D.E. Kramer, J.R. Whitaker, I. Ficus Enzymes, Separation of the proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* latices, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2170–2177.
- [24] A. Sharma, M.N. Gupta, Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional protease/amylase inhibitor, *Process Biochem.* 37 (2001) 193–196.
- [25] B. Özer, E. Akardere, E.B. Çelem, S. Önal, Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato, *Biochem. Eng. J.* 50 (2010) 110–115.
- [26] R.K. Singh, S. Gourinath, S. Sharma, I. Roy, M.N. Gupta, C. Betzel, A. Srinivasan, T.P. Singh, Enhancement of enzyme activity through three-phase partitioning: crystal structure of a modified serine proteinase at 1.5 Å resolution, *Protein Eng.* 14 (2001) 307–313.
- [27] I. Roy, M.N. Gupta,  $\alpha$ -Chymotrypsin shows higher activity in water as well as organic solvents after three phase partitioning, *Biocatal. Biotransform.* 22 (2004) 261–268.
- [28] H.H. Wang, C.L. Chen, T.L. Jeng, J.M. Sung, Comparisons of  $\alpha$ -amylase inhibitors from seeds of common bean mutants extracted through three phase partitioning, *Food Chem.* 128 (2011) 1066–1071.
- [29] G.M. Rather, M.N. Gupta, Three phase partitioning leads to subtle structural changes in proteins, *Int. J. Biol. Macromol.* 60 (2013) 134–140.
- [30] A.V. Narayan, M.C. Madhusudhan, K.S. Raghavarao, Extraction and purification of Ipomoea peroxidase employing three-phase partitioning, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151 (2008) 263–272.
- [31] V.V. Kumar, V. Sathyaselvabala, M.P. Premkumar, T. Vidyadevi, S. Sivanesan, Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes, *J. Mol. Catal. B – Enz.* 74 (2012) 63–72.
- [32] E.R.L. Gaughran, Ficin: history and present status, *Pharm. Biol.* 14 (1976) 1–21.
- [33] H. Zare, A.A. Moosavi-Movahedi, M. Salami, M. Mirzaei, A.A. Saboury, N. Sheibani, Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex, *Phytochemistry* 87 (2013) 16–22.
- [34] B. Turk, V. Turk, D. Turk, Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors, *Biol. Chem.* 378 (1997) 141–150.
- [35] P.T. Englund, T.P. King, L.C. Craig, A. Walti, I. Ficin, Its isolation and characterization, *Biochemistry* 7 (1968) 163–175.
- [36] D.C. Williams, J.R. Whitaker, Multiple molecular forms of *Ficus glabrata* ficin. Their separation and relative physical, chemical, and enzymatic properties, *Plant Physiol.* 44 (1969) 1574–1583.
- [37] I.K. Jones, A.N. Glazer, Comparative studies on four sulfhydryl endopeptidases (“ficins”) of *Ficus glabrata* latex, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 2765–2772.
- [38] H. Bayraktar, S. Önal, Concentration and purification of  $\alpha$ -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning, *Separ. Purif. Technol.* 118 (2013) 835–841.
- [39] M. Sugiura, M. Sasaki, Studies on proteinases from *Ficus carica* var. Horaishi, V. Purification and properties of a sugar-containing proteinase (ficin S), *Biochim. Biophys. Acta* 350 (1974) 38–47.
- [40] D.E. Kramer, J.R. Whitaker, Ii. Ficus Enzymes, Properties of the proteolytic enzymes from the latex of *Ficus Carica* variety kadota, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2178–2183.
- [41] A.A. Kortt, S. Hamilton, E.C. Webb, B. Zerner, Ficans (E.C. 3.4.22.3). Purification and characterization of the enzymic components of the latex of *Ficus glabrata*, *Biochemistry* 13 (1974) 2023–2028.
- [42] K.B. Devaraj, L.R. Gowda, V. Prakash, An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.), *Phytochemistry* 69 (2008) 647–655.



# Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification

Mohammed Gagaoua\* and Kahina Hafid

Equipe Maquav, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey, 25000, Constantine, Algeria

## Abstract

A rapid overview of the Three Phase Partitioning (TPP) system as an efficient non-chromatographic tool is given. This elegant non-chromatographic tool is able to purify numerous proteins and especially proteases in a one step protocol. TPP is able to do not only purify proteins, but also concentrate them into one of the phases and enhance their proteolytic activity. The application of TPP for the extraction and purification of plant milk-clotting enzymes and meat tenderizers agents are given. In addition, some proteases from other materials are summarized. This short communication stress showed that TPP is a simple, economical and quick method for proteases recovery from plant proteases. This elegant non-chromatographic tool may be performed in a purification process to be used successfully in food industries, namely to provide enzymes for cheese-making and meat tenderizing.

**Keywords:** Three phase partitioning; Purification; Proteases

## Introduction

Three-phase partitioning or TPP, a technique first described by Lovrien's group [1], was intensively used to purify several target macromolecules and has now become a versatile and a common bioseparation tool with a wide area of application. This short communication intends to describe the potential of TPP to extract and purify some industrial proteases from animal or plant materials since chromatographic techniques are too complicated to be used as simple and effective industrial methods. Also, separations by chromatographic techniques are expensive, time consuming, involving number of steps and furthermore the scale up is difficult. Thus, an alternative method, such as TPP, for proteases purification is required to solve the aforementioned drawbacks.

## Three Phase Partitioning Process

TPP is a simple, quick, and efficient and often a one-step process for the separation and purification of proteins from complex mixtures. This elegant non-chromatographic process employs collective operation of principles involved in numerous techniques like **i)** salting out, **ii)** isoionic precipitation, **iii)** co-solvent precipitation, **iv)** osmolytic, and **v)** kosmotropic precipitation of proteins. It is easily scalable and can be used directly with crude suspensions [2]. The principle of this fast-emerging tool consists in mixing the crude protein extract with solid salt (mostly ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) and an organic solvent, usually *tert*-butanol (*t*-BuOH) in order to obtain three phases (Figure 1). The desired enzymes or proteins are selectively partitioned after centrifugation at 4°C to one phase while contaminants such as pigments and lipids to the other one (Figure 1). The upper organic phase which is containing nonpolar compounds (pigments, lipids etc.) is separated from the lower aqueous phase that containing polar compounds (proteins, carbohydrates etc.) by an interfacial protein precipitate [3-7].

In TPP, *t*-butanol may be first added to the aqueous solution of protein to about 1 to 2 ration. It is believed that this results in the protein equilibrating with the solvent (water) and the co-solvent. The protein thus becomes partially hydrated and partially *t*-butanolated, in proportion to the relative abundance of the solvents in the mixture. Upon addition of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , water is abstracted by the salt ions (especially the  $\text{SO}_4^{2-}$  ions) as these become hydrated. The salt apparently has a higher affinity for water than for *t*-butanol, and thus preferentially sequesters the water. In the absence of protein, this results in the solution

dividing into two phases, as some of the water is made "unavailable" to the *t*-butanol. If protein is present, the protein equilibrates with the new proportions of solvent and co-solvent available to it. Thus the partitioning process is affected by the hydrophobicity, the molecular weight, the charge and isoelectric point (*pI*) of protein and also by the physical conditions of the phase system [8,9].

## Impact of Ammonium Sulfate

Ammonium sulfate,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , is the most popular salt used for protein salting-out as it is cheap, is readily available, is gentle on proteins, stabilizes some proteins, and because of its high solubility. Moreover,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  are at the ends of their respective Hofmeister series and have been shown to stabilize intermolecular interactions in macromolecules such as protein structures.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation is of critical importance and plays a major role in TPP as it is responsible for protein-protein interaction and precipitation. It causes protein precipitation by salting-out mechanism. The efficiency of the salting-out will first depend on the amount of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and second on the ionic strength of the solution. For example, at higher salt precipitation, water molecules are attracted by salt ions result in stronger protein-protein interactions and the protein molecules precipitate through hydrophobic interactions [3].

## Impact of *t*-Butanol

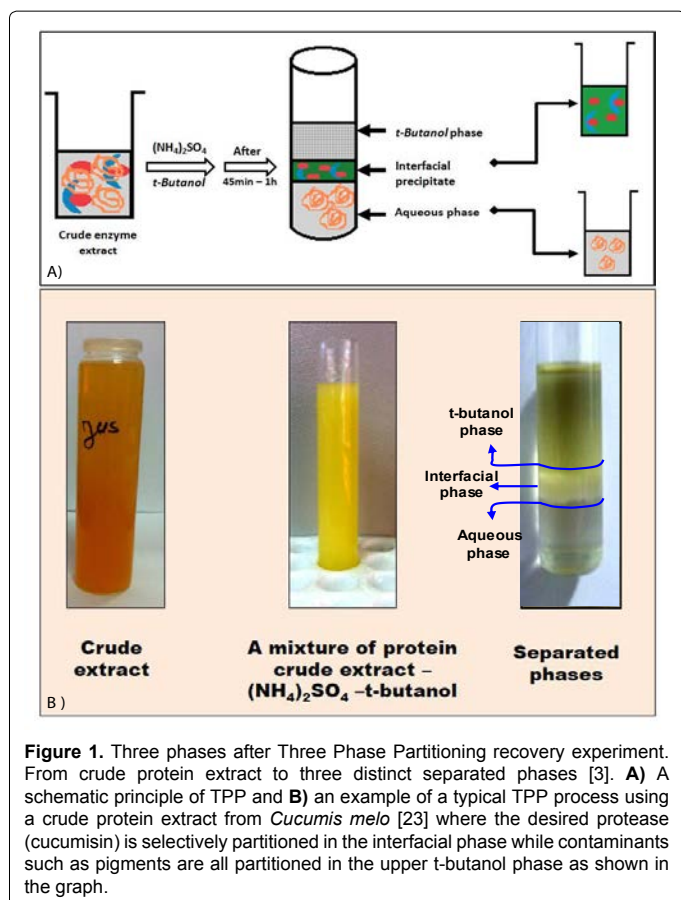
As presented above, the particularity of TPP is the use of *tert*-butanol. *t*-Butanol is a C4 non-ionic kosmotrope that is very soluble and miscible in water, but after the addition of solid salt, becomes hydrated and acts as a differentiating solvent. It does not cause denaturation of the partitioned enzyme as it is unable to permeate inside the folded

**\*Corresponding author:** Mohammed Gagaoua, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey 25000, Constantine, Algeria, Tel: +213 31 66 18 83; Fax: +213 31 66 18 84, E-mail: [gmb2001@yahoo.fr](mailto:gmb2001@yahoo.fr), [mgagaoua@inataa.org](mailto:mgagaoua@inataa.org)

**Received** October 31, 2015; **Accepted** January 09, 2016; **Published** February 08, 2016

**Citation:** Gagaoua M, Hafid K (2016) Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification. Biosens J 5: 135. doi:[10.4172/2090-4967.1000134](https://doi.org/10.4172/2090-4967.1000134)

**Copyright:** © 2016 Gagaoua M, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



**Figure 1.** Three phases after Three Phase Partitioning recovery experiment. From crude protein extract to three distinct separated phases [3]. **A)** A schematic principle of TPP and **B)** an example of a typical TPP process using a crude protein extract from *Cucumis melo* [23] where the desired protease (cucumisin) is selectively partitioned in the interfacial phase while contaminants such as pigments are all partitioned in the upper *t*-butanol phase as shown in the graph.

three dimensional structure of protein due to its larger molecular size. It also shows significant kosmotropic and crowding effects at 20-30°C temperature that enhances the partitioning of enzyme which may have implications in stabilizing the protein being isolated [9].

Overall, sulfate ion and *t*-butanol are known to be excellent protein structure markers or kosmotropes [8,9]. Kosmotropes, inversely to chaotropic agents, cause water molecules to favorably interact, which also stabilizes intramolecular interactions in the proteins [10].  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  is the traditional kosmotropic salt for the salting out of protein from an aqueous solution. The principle of  $\text{SO}_4^{2-}$  ion for salting out protein has been viewed in five different ways namely, 1) ionic strength effects, 2) cavity surface tension enhancement osmotic stressor (dehydration), 3) kosmotropy, 4) exclusion crowding agent and 5) the binding of  $\text{SO}_4^{2-}$  to cationic sites of protein [9].

### Advantages and Disadvantages of TPP

As stated above, TPP is a simple and fast purification technique and found to be very effective for concentrating a wide range of protein solutions, namely proteases. By this process, some enzymes are stabilized and others are inhibited with *t*-butanol, allowing preliminary fractionations of crude extract. TPP enhance the enzymatic activity of several proteins. Otherwise, it was reported to denature proteins with quaternary structure, for example hemoglobin, which is an advantage when isolating blood proteins.

In contrast, little quantities of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  may need to be removed by dialysis. Some enzymes may lose their activity in the presence of high amount of *t*-butanol. Few studies reported that protein structure

may be altered by *t*-butanol. TPP is not suitable for the isolation of IgG antibodies or proteins less present in the solution (<5 µg). Otherwise, a problem with tissue homogenization is the possible generation of artefacts, either by proteolysis or by other protein/protein interactions.

### TPP as an Emerging Technique for Proteases Purification

Otherwise, TPP has been used to purify a number of enzymes and proteins with high recovery and purity levels. For example, it was widely used to purify invertase [11], pectinase [12],  $\alpha$ -galactosidase [13], trypsin inhibitor [14], laccase [15], catalase [16] and many others. All these papers showed that, TPP is an attractive process for primary purification of enzymes compared to conventional chromatographic methods. On another hand, TPP system was used to purify numerous proteases. Proteases, which hold the first place in the world market of enzymes, play an important role in biotechnology. In food industries, proteases are frequently used in different production steps. The bulk of these enzymes come from microbial sources, but vegetable proteases, extracted from higher plant organs, have been extensively investigated in recent years as potential proteolytic enzymes in food industry. Most of them are cysteine proteinases, namely papain, bromelain, zingibain, and ficain. Among plant proteases, we found cysteine proteases, also known as thiol proteases. From the most frequently employed we found papain from *Carica papaya* [17], ficain from *Ficus carica* [3], bromelain from *Ananas comosus* [18], actinidin from *Actinidia chinensis* [19] and zingibain from *Zingiber officinale* [4]. All these cysteine proteases received a considerable commercial importance due to their activity properties over a wide range of temperature and pH. Considering their potential uses in food industry, it becomes desirable the developing of simple and efficient methods for their recovery and purification. TPP is quietly appropriate for this aim because it is economic, cheap and in one step the protease can be purified with high recovery.

Among various proteases which were separated by TPP (Table 1) we can found papain [20], zingibain [4,21,22], cucumisin from *Cucumis melo* var. *Cantalupensis* [23,24] and ficain [3]. For example, this later is already used to produce a traditional white cheese, known as "agugli" in the region of Kabylia in Algeria in [25-27]. Most of these proteases were purified or are currently process by our group.

In order to determine the best TPP system for the purification of above mentioned enzymes, various process parameters including the amount of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  for the precipitation, crude extract to *t*-butanol ratio and also pH were optimized to get highest purity fold and yield (Table 1). After the selection of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation, the ratio of the volume of crude extract to *t*-butanol which is also very important in TPP was optimized. *tert*-Butanol was chosen as the organic co-solvent for the partitioning of the studied proteases in TPP as it has been generally reported to give best results [28,29]. The optimum ratio presumably arises as a result of two factors. If the amount of *t*-butanol is lower, it does not adequately synergize with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . If it is higher, it is likely to cause protein denaturation [9].

Optimal purification parameters were: 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation with 1.0:0.75 ratio of crude extract:*t*-butanol at pH 6.5 for ficain, 50%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation with 1.0:1.0 ratio of crude extract:*t*-butanol at pH 7.0 for zingibain, 50%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation with 1.0:1.5 ratio of crude extract:*t*-butanol at pH 6.5 for calotropain, and 60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation with 1.0:1.25 ratio of crude extract:*t*-butanol at pH 8.0 for cucumisin. From these data, it can be seen that ficain, calotropain and cucumisin have a tendency to concentrate in the interfacial phase of

Proteases	Sources	Crude extract: t-butanol ratio	Ammonium sulfate (%)	Optimum pH	Phase location <sup>1</sup>	Purification fold	Yield (%)	References
Plant milk-clotting enzymes purified using <i>Three Phase Partitioning</i> by our group								
Ficin	<i>Ficus carica latex</i>	1.0:0.75	40	6.5	IP	6.04	167	[3]
Zingibain	<i>Zingiber officinale roscoe rhizomes</i>	1.0:1.0	50	7.0	AP	14.9	215	[4]
Cucumisin	<i>Cucumis melo var. cantalupensis</i>	1.0:1.25	60	8.0	IP	4.61	156	[23]
Calotropain	<i>Calotropis procera</i>	1.0:1.50	50	6.5	IP	8.40	124	(personal communication)
Proteases purified using <i>Three Phase Partitioning</i> by other groups								
Papain	<i>Dried papaya leaves</i>	1.0:0.5	20	7.0	AP	15.8	253	[20]
Protease	<i>Calotropis procera</i>	1.0:0.5	65	-	AP	6.92	132	[5]
Protease	Pacific white shrimp	1.0:1.0	30	8.0	IP	2.60	76	[31]
Proteases	Giant catfish viscera	1.0:0.5	50	8.0	IP	5.0	163	[6]
Alkaline Proteases	Fish viscera	1.0:0.5	50	8.0	IP	4.60	154	[32]

<sup>1</sup>interfacial phase (IP) or aqueous phase (AP).

**Table 1:** Some proteolytic enzymes and their optimum parameters recovered using Three Phase Partitioning.

the TPP system whereas zingibain in the aqueous phase. This is related to the structure of each enzyme and also to their *pI*. Furthermore, TPP is known as a concentrating or dewatering step and some enzymes have enhanced their catalytic activities, as clearly shown in these experiments. The optimum temperature of the partitioned zingibain, ficain and cucumisin were found to be from 60°C to 70°C, respectively. Table 1 summarizes results of the purification of some proteases using TPP. The enzymes show different behaviour in TPP systems, depending upon their molecular weight and *pI*.

It may be interesting to compare this TPP-based separation method with the conventional purification techniques. TPP extraction is much less expensive than chromatographic methods. The number of unit operation involved in the chromatographic protocols is also reduced. Beside of these, TPP via t-butanol can be practically used either at room temperature or even at high temperature and t-butanol phase (upper phase) obtained from TPP may be reused [30].

All the proteases purified using TPP system by our group and summarized in the first part of the Table 1 have effective milk-clotting activities and now we are trying to use them as tenderizing agents of tough meat from camel and aged spent hens. All these proteases were characterized by very high purity and activity compared to those purified using the chromatographic purification protocols.

## Conclusion

In spite of various methods which have been developed for separation and purification of proteases, most of them involved a number of steps, furthermore the scale up of these methods is difficult and also very expensive to produce in large scale. In order to overcome the mentioned drawbacks and explore its benefits, TPP was used as an alternative extraction process for the recovery and purification of numerous proteases. This knowledge may lead to develop new TPP strategies for the purification of other proteases which would be used by food industry. Also, the availability of this simple partial purification strategy should be employed in the production of several proteases in a more efficient and economic way.

## References

- Tan KH, Lovrien R (1972) Enzymology in aqueous-organic cosolvent binary mixtures. *J Biol Chem* 247: 3278-3285.
- Saxena L, BK Iyer, L Ananthanarayan (2007) Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor. *Process Biochemistry* 42: 491-495.
- Gagaoua M (2014) Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica L.*) latex. *Separation and Purification Technology* 132: 461-467.
- Gagaoua M, Hoggas N, Hafid K (2015) Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale Roscoe* rhizomes. *Int J Biol Macromol* 73: 245-252.
- Rawdkuen S (2010) Three-phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex. *Biochemical Engineering Journal* 50: 145-149.
- Rawdkuen S, Vanabun A, Benjakul S (2012) Recovery of proteases from the viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning. *Process Biochemistry* 47: 2566-2569.
- Li Z (2013) Simultaneously concentrating and pretreating of microalgae *Chlorella* spp. by three-phase partitioning. *Bioresour Technol* 149: 286-291.
- Dennison C, Lovrien R (1997) Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expr Purif* 11: 149-161.
- Dennison C (2011) Three-phase partitioning, in *Methods in protein biochemistry*. Walter de Gruyter: Berlin, Germany 1-5.
- Moelbert S, Normand B, De Los Rios P (2004) Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. *Biophys Chem* 112: 45-57.
- Akardere E (2010) Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast. *Separation and Purification Technology* 72: 335-339.
- Sharma A, MN Gupta (2001) Purification of pectinases by three-phase partitioning. *Biotechnology Letters* 23: 1625-1627.
- Dhananjay SK, VH Mulimani (2009) Three-phase partitioning of  $\alpha$ -galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36: 123-128.
- Wati RK (2009) Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds. *Process Biochemistry* 44: 1307-1314.
- Rajeeva S, SS Lele (2011) Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma* sp. WR-1. *Biochemical Engineering Journal* 54: 103-110.
- Duman YA, E Kaya (2013) Three-phase partitioning as a rapid and easy method for the purification and recovery of catalase from sweet potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Appl Biochem Biotechnol* 170: 1119-1126.
- Nitsawang S, R Hatti-Kaul, P Kanasawud (2006) Purification of papain from *Carica papaya latex*: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1103-1107.
- Arshad ZI, Amid A, Yusof F, Jaswir I, Ahmad K, et al. (2014) Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 7283-7297.
- Katsaros GI, Tavantzis G, Taoukis PS (2010) Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11: 47-51.

20. Chaiwuta P, Pintathonga P, Rawdkuen S (2010) Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. *Process Biochemistry* 45: 1172-1175.
21. Hoggas N, Hafid K, Mordjane A, Dalli M, Gagaoua M (2014) Extraction, purification partielle et caractérisation de la zingibaine du rhizome du gingembre (*Zingiber officinale*) par le système TPP. In: Séminaires International sur les Sciences Alimentaires SISA. 14-16 Octobre, INATAA Constantine, UC1, Algérie, P189. Pp. 143
22. Hafid K, Ziane F, Nait Rabah S, Hoggas N, Gagaoua M (2015) Purification, caractérisation et propriétés coagulante de la zingibaine du rhizome du gingembre (*zingiber officinale*). In: Séminaire international des biotechnologies, 19, 20 et 21 October 2015, Constantine.
23. Nait Rabah S, Hafid K, Ziane F, Gagaoua M (2015) La cucumisine, enzyme coagulante du lait: extraction, purification partielle et caractérisation par le système de répartition triphasique. In: Séminaire international des biotechnologies, 19,20 et 21 Octobre 2015. Constantine. PBI39.
24. Nait Rabah S, Ziane F, Gagaoua M (2014) Utilisation de l'extrait de figue de barbarie et de cucumisine comme agents coagulants. In: Séminaires International sur les Sciences Alimentaires, SISA, 14-16 Octobre, INATAA Constantine, UC1, Algérie, P199. Pp. 148.
25. Ziane F, Gagaoua M, Rabah Nait S (2014) Some endemic Algerian plant proteases as milk-clotting enzymes and meat tenderizers: an overview. In *Second scientific days of food JSAA* 159.
26. Ziane F, Nait Rabah S, Gagaoua M (2014) Characterization of some plant proteases as milk-clotting enzymes and meat tenderizers : a new purification tool. In: Séminaires International sur les Sciences Alimentaires, SISA, 14-16 Octobre, INATAA Constantine, UC1, Algérie, P218. Pp. 156.
27. Ziane F, Hafid K, Nait Rabah S, Gagaoua M (2015) Vers une nouvelle stratégie de purification d'enzymes coagulantes par le système three phase partitioning : Le cas de la ficaine du latex du *Ficus carica* L. In: Séminaire international des biotechnologies, p. PBI47, 19,20 et 21 octobre 2015. Constantine.
28. Mondal K, Jain S, Teotia S, Gupta MN (2006) Emerging options in protein bioseparation. *Biotechnol Annu Rev* 12: 1-29.
29. Kiss E (1998) Interfacial behavior of proteins in three-phase partitioning using salt-containing water/tert-butanol systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 142: 295-302.
30. Çalci E (2009) Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*)  $\alpha$ -galactosidase by three-phase partitioning and its characterization. *Separation and Purification Technology* 70: 123-127.
31. Senphan T, Benjakul S (2014) Use of the combined phase partitioning systems for recovery of proteases from hepatopancreas of Pacific white shrimp. *Separation and Purification Technology* 129: 57-63.
32. Ketnawa S (2014) Three-phase partitioning and proteins hydrolysis patterns of alkaline proteases derived from fish viscera. *Separation and Purification Technology* 132: 174-181.

**Citation:** Gagaoua M, Hafid K (2016) Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification. *Biosens J* 5: 135. doi:[10.4172/2090-4967.1000134](https://doi.org/10.4172/2090-4967.1000134)

#### OMICS International: Publication Benefits & Features

##### Unique features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

##### Special features:

- 700 Open Access Journals
- 50,000 Editorial team
- Rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus, Google Scholar etc.
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.editorialmanager.com/lifesciences/default.aspx>





République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

**LE DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ORGANISE**

## Le Premier Séminaire International sur L'Agroalimentaire « SIA 2018 » **Attestation de participation**

Le président du **Premier Séminaire International sur L'Agroalimentaire « SIA 2018 »**  
organisé le **16 - 17 Octobre 2018**, atteste que Mlle/Mm/Mr. : **HAFID Kahina** a présenté une  
communication Orale intitulée : **Extraction, purification partielle et caractérisation de la pepsine de proventricules de poulet**  
par le système de répartition en trois phases en vue de son application en industrie agro-alimentaire

**Co-auteurs:** Taha Mansour SAYAH, Mounir AYAD, Lamia SENANI, Katar-Ennada SINACER, Samira BECILA, Mohammed GAGAOUA

**PRÉSIDENT DU SÉMINAIRE**  
El Yamine MEGROUA  
Président du SIA 2018



# Extraction, purification partielle et caractérisation de la pepsine de proventricules de poulet par le système de répartition en trois phases en vue de son application en industrie agro-alimentaire

**Kahina HAFID**<sup>1\*</sup>, Taha Mansour SAYAH<sup>1</sup>, Mounir AYAD<sup>2</sup>, Lamia SENANI<sup>2</sup>, Katar-Ennada SINACER<sup>2</sup>, Samira BECILA<sup>1</sup>, Mohammed GAGAOUA<sup>3\*\*</sup>

<sup>1</sup> Equipe Maquav, Laboratoire BIOQUAL, INATAA, Université des Frères Mentouri Constantine 1, route de Ain EL-Bey 25000 Constantine, Algérie

<sup>2</sup> INATAA, Université des Frères Mentouri Constantine 1, route de Ain EL-Bey 25000 Constantine, Algérie.

<sup>3</sup> Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

Correspondance : \*[hafidkahina@hotmail.com](mailto:hafidkahina@hotmail.com) ; \*\* [gamber2001@yahoo.fr](mailto:gamber2001@yahoo.fr)

La pepsine de poulet est une enzyme extraite à partir de proventricules considérés comme un sous-produit de l'industrie de volaille. Cette étude avait comme objectifs **i)** l'extraction et la purification partielle de la pepsine issues des proventricules de poulet par le système de répartition en trois phases « *Three Phase Partitioning*, TPP » ainsi que **ii)** sa caractérisation physico-chimique. Le système TPP a été mis en place comme un protocole d'extraction et de purification simple et rapide de la pepsine de poulet. Ce système, contrairement aux autres techniques de purification impliquant un nombre d'étapes onéreuses et qui utilisent des produits coûteux et requièrent plusieurs étapes chromatographiques difficiles à reprendre à grande échelle, consiste en une simple série d'extraction, de précipitation par le sulfate d'ammonium, et un fractionnement par l'addition d'un alcool quaternaire. Dans cette étude, la pepsine a été récupérée dans la phase intermédiaire avec un facteur de purification de 3,26 et un rendement de purification de 86%. Elle est caractérisée par deux pH optimaux à 3,0 et à 7,0 ainsi qu'une température d'activité de 60°C. L'enzyme était stable contre de nombreux ions métalliques et son activité est diminuée légèrement par le CaCl<sub>2</sub> et le MgCl<sub>2</sub>. Les constantes *K<sub>m</sub>* et *V<sub>max</sub>* étaient de 2,683 mg ml<sup>-1</sup> et 243,9 μM min<sup>-1</sup>, respectivement. Les résultats obtenus montrent que le système TPP est une méthode économique et efficace qui permet d'obtenir rapidement une pepsine de poulet partiellement purifiée prête pour une éventuelle application en industrie alimentaire comme par exemple agent coagulant du lait.

**Mots clés :** Activité protéolytique, pepsine, proventricule de poulet, extraction et purification, *Three Phase Partitioning*.



Republique Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université des frères Mentouri - Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



**ATTESTATION DE PARTICIPATION**  
Séminaire International des Biotechnologies (SIBC)  
Constantine le 19, 20 et 21 Octobre 2015

Je soussigné Pr Dehimat Laid, Président du Séminaire International des Biotechnologies.

Atteste que Mademoiselle : K. Hafid.

CO-AUTEURS: M. Gagaoua, S. Becila, A. Boudjellal.

A présenté une Communication

Affichée

intitulée :

Vers une nouvelle approche par traitement d'image pour la mesure de la capacité de rétention d'eau de la viande.

Thématique : Biotechnologies et industries

Président du SIBC / Doyen de la Faculté  
Pr Laid Dehimat

دھیمات لاید  
عميد كلية علوم الطبيعة و الحياة



La présente attestation est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.





République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

## Séminaire International sur les Sciences Alimentaires 14-16 octobre 2014, Constantine, Algérie

Université Constantine 1 (UC1)

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



# ATTESTATION DE PARTICIPATION

**Madame HAFID Kahina**

a présenté une communication affichée intitulée :

«ANALYSE SENSORIELLE VS MESURE INSTRUMENTALE (PENETROMETRIE) DE LA TENDRETE/DURETE DE LA  
VIANDE : EFFET DE L'ESPECE BOUCHERE, L'AGE DE L'ANIMAL ET LE TYPE DU MUSCLE»

Co-auteurs : GAGAOUA M., BECILA S., BOUDJELLAL A.

Président(e) de la Session

Pr. BEKHROUCHE F.



Directeur de l'INATAA et Président du  
Comité Scientifique

Pr. BOUDJELLAL Abdelghani

مدير المعهد  
ع. بوجلال



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université des frères Mentouri - Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



## ATTESTATION DE PARTICIPATION

Séminaire International des Biotechnologies (SIBC)  
Constantine le 19, 20 et 21 Octobre 2015

Je soussigné Pr Dehimat Laid, Président du Séminaire International des Biotechnologies.

Atteste que Monsieur : F. Ziane.

CO-AUTEURS: K. Hafid, S. Nait Rabah, M. Gagaoua.

A présenté une Communication

Affichée

intitulée :

Vers une nouvelle stratégie de purification d'enzymes coagulantes par le système three phase partitioning :  
le cas de la ficaine du latex du *Ficus carica*.

Thématique : Biotechnologies et industries

Président du SIBC / Doyen de la Faculté  
Pr Laid Dehimat

DEHIMAT Laid  
DOYEN  
Faculté des Sciences  
de la Nature et de la Vie



La présente attestation est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

# Annexes



Print the whole page

EnCor Biotechnology Inc.  
540, 4949 SW 41st Blvd.  
Gainesville  
Florida 32608  
Tel (352) 372 7022  
Fax (352) 372 7066



### Ammonium Sulfate Calculator:

Ammonium Sulfate Precipitation is a simple and effective means of fractionating proteins. It is based on the fact that at high salt concentrations the natural tendency of proteins not to aggregate is overcome, since the surface charges are neutralized. Charge neutralization means that proteins will tend to bind together, form large complexes and hence are easy to precipitate out by mild centrifugation. Since each protein will start to aggregate at a characteristic salt concentration, this approach provides a simple way of enriching for particular proteins in a mixture, and is used, for example, to isolate immunoglobulins from sera. It is quite easy to bring a preparation to 50% saturation by simply adding an equal volume of saturated Ammonium Sulfate. It is more of a problem to make solutions of higher percentage saturation as you may have to add very large volumes of saturated Ammonium Sulfate. It is usually easier to add solid Ammonium Sulfate to your sample, but calculating how much to add is rather time consuming. The program below calculates how much solid Ammonium Sulfate you need to add to a specific volume of a solution to get a specific percentage saturation at a specific temperature;

Select temperature at which you are working (25°C is default):  0°C  4°C  10°C  20°C  25°C

Enter starting volume of solution in mls:

Desired percentage saturation

Ammonium Sulfate:

Enter starting percentage saturation of Ammonium Sulfate:

Press to Calculate

### Tableau d'England et Seifter, (1990) pour les calculs des quantités de sulfate d'ammonium

Initial concentration of ammonium sulfate (percentage saturation at 0 °C)	Percentage saturation at 0 °C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (g) to be added to 1 l of solution																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

\* Reprinted from England and Seifter (1990), which was adapted from Dawson et al. (1968).

### Préparation des gels pour électrophorèse de type Tricine SDS-PAGE

- Monter les plaques avec toutes les précautions d'usage en utilisant les espaceurs adéquats. Vérifier la propreté des plaques.

- Préparer le gel de séparation ou Résolving gel (10 %) dans 1 tube plastique (ou en verre) de 25mL avec un barreau magnétique selon le tableau ci-dessous :

	Volumes pour 2 gels (mL)	Volumes pour 4 gels (mL)
Acrylamide/ Bisacrylamide 29 :1	333	6.66
Tris 2.5 M pli 8.8	5.6	11.2
Eau bi-distillée	0.90	1.80
Agiter avant d'ajouter le TEMED et APS en $\mu$ L		
TEMED	6.0	12.0
APS 30 mg/mL	150	300
Volume final (mL)	~10	~20

- Couler 5000  $\mu$ l de cette solution pour un gel ;

- En fin de coulage recouvrir le gel avec 400  $\mu$ l d'éthanol à 70 % ;

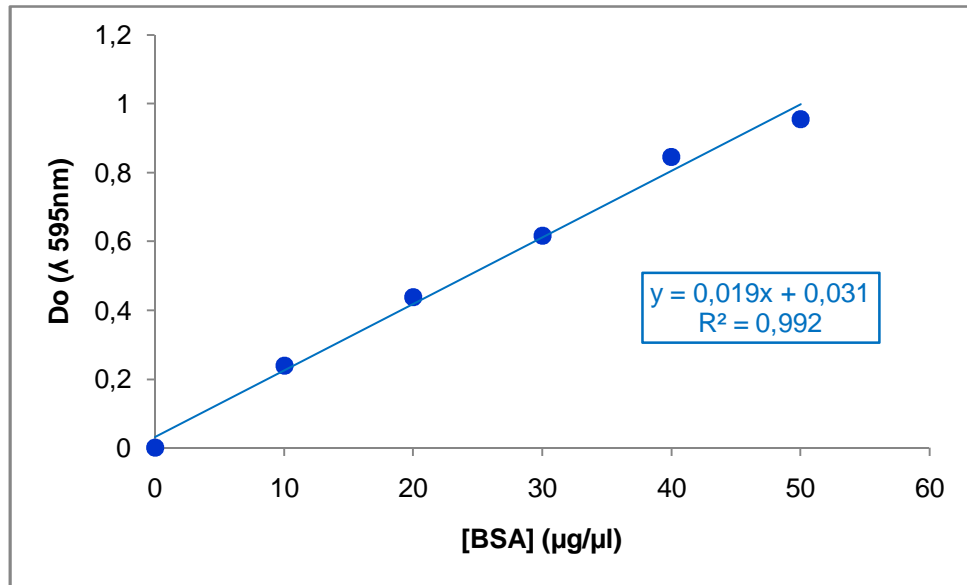
- Laisser polymériser environ 25-30 minutes ;

- Préparer le gel de concentration ou Stacking gel (4 %) dans 1 tube plastique (ou en verre) de 25ml avec un barreau magnétique selon le tableau ci-dessous :

	Volumes pour 2 gels (mL)	Volumes pour 4 gels (mL)
Acrylamide / Bisacrylamide 29 :1	0.66	1.32
Tris 2.5 M pH 8.8	0.76	1.52
Eau bi-distillée	3.42	6.84
Agiter avant d'ajouter le TEMED et l'APS en $\mu$ L		
TEMED	5.0	10.0
APS 30 mg/mL	150	300
Volume final (mL)	-5	-10

- Puis couler le stacking

- Insérer immédiatement les peignes appropriés et laisser polymériser au moins 15 à 20 minutes.



**Figure :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford(1976) avec le sérum albumine bovine (BSA) comme standard.

### Préparation des solutions pour dosage de l'activité protéolytique de la pepsine

#### 1. 0.3M Acide chlorhydrique (Solution A)

Ajouter délicatement **2.6ml** HCl concentré à approximativement 90ml d'eau distillé et compléter jusqu'à **100ml**. La solution est stable **1 mois à température ambiante**.

#### 2. 0.01M Acide Chlorhydrique (Solution B)

Ajouter **10ml** de la solution à 0.3M d'HCl (Solution A) à approximativement 250ml d'eau distillée puis compléter jusqu'à **300ml**. La solution est stable **1 mois à température ambiante**.

#### 3. Solution d'hémoglobine 2.5% (Solution C)

Dissoudre lentement **2.5g** d'hémoglobine à **100ml** d'eau distillée. Mettre sous agitation jusqu'à formation d'un vortex pendant 10min à 37°C. Filtrer la solution avec du papier Wattman. **Stocker à 4°C**.

#### 4. Solution d'hémoglobine acide dénaturée 2% (Solution D)

Prendre **80ml** de la solution filtrée d'hémoglobine 2.5% (Solution C) et ajouter **20ml** de la solution à 0.3M d'HCl (solution A). Doit être **fraichement préparée**

#### 5. Solution d'Acide Trichloracétique (TCA) 5% (Solution E)

Dissoudre **12.5g** d'acide trichloracétique dans approximativement 200ml d'eau distillée puis compléter jusqu'à **250ml**. La solution est stable **1 mois à 4°C**.

#### 6. Solution enzymatique commerciale

Dissoudre 10mg de pepsin dans 20ml de solution d'HCl 0.01M (Solution B). Juste avant la mesure, diluer en ajoutant 0.1ml de l'échantillon à 4.9ml de la solution d'HCl 0.01M



## Résumé

L'objectif principal de ce travail est d'étudier l'effet attendrisseur de protéases d'origine végétale, la papaine (papaye) et la ficine (figuier) et d'origine animale la pepsine (proventricules de poulet), purifiées par le système de répartition en trois phases sur la viande dure de réforme et de comparer l'impact des différents traitements d'attendrissement artificiel enzymatique, sur la texture de la viande.

Ce travail décrit le système de répartition en trois phases (TPP) appliqué, pour la purification de ces protéases. Des protocoles ont été mis en place et les enzymes purifiées ont été caractérisées, avant leurs applications sur notre matrice. Suite à ce travail, nous avons étudié l'effet attendrisseur de ces enzymes sur la viande déclassée, de plusieurs espèces, à savoir : la viande de dromadaire âgé, la poule pondeuse et les vaches de réforme.

Nos résultats montrent que la pepsine a une tendance à se concentrer dans la phase intermédiaire du système TPP, avec un rendement de purification, de l'ordre de 86 % et un facteur de purification de 3.26. Les paramètres optimisés du système sont l'ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 40%, un rapport de (1.0 :0.75) (v:v) d'extrait brut/t-butanol et pH 4. En parallèle, la papaine a été récupérée, dans la phase aqueuse avec un facteur de purification de 11,45 et un rendement de 134%, par les paramètres optimisés du système TPP: 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , rapports 1,0: 0,75 de l'extrait brut au t-BuOH, pH 6,0 et 25°C. Quand à la ficine, elle était exclusivement répartie, dans la phase intermédiaire, après saturation en sulfate d'ammonium à 40% (p / v), avec un rapport de 1,0: 0,75 (v / v) d'extrait brut: t-butanol à pH 7,0, donnant ainsi, un taux de purification de 6,04 et un rendement de 167%.

Après application des protéases purifiées sur la viande, les résultats obtenus démontrent que la papaine et la ficine ont un effet considérable sur la texture de la viande. En effet, ces deux protéases ont dégradé la structure musculaire au contact de l'enzyme, principalement la myosine et la laminine, mais n'ayant pas d'effet sur le collagène. L'analyse électrophorétique par Glycine-SDS PAGE a révélé la dégradation de différentes protéines musculaires, ce qui indique fortement le considérable potentiel d'utilisation de la pepsine de poulet, pour l'attendrissement de la viande. A travers nos résultats, nous pouvons affirmer que les trois enzymes purifiées présentent un grand potentiel, dans leurs applications, sur des viandes dures. Cette enzyme pourra être facilement appliquée sur ces viandes, pour améliorer sa tendreté, tant à l'échelle industrielle.

**Mots clés :** Viande, Attendrissement artificiel, protéases, ficine, papaine, pepsine, dureté, système TPP.

## Abstract

The main objective of this work is to study the tenderizing effect of plant proteases; papain (papaya) and ficin (tree fig) and animal proteases; pepsin (chicken proventriculi), purified by three phase partitioning system on hard spent meat and compare the impact of the different enzymatic artificial tenderizing treatments on the meat texture.

This work describes the applied three phase partitioning system (TPP) for the purification of these proteases. Protocols were set up and the purified enzymes were characterized, before their applications on meat. Then we studied the tenderizing effect of these enzymes on down-graded meat, of several species, namely: the meat of aged camels, spent hens and cull cows.

Our results show that pepsin has a tendency to concentrate in the middle phase of the TPP system, with a purification yield and purification fold of 86% and 3.26, respectively. The optimized parameters of the system are 40% ammonium sulfate ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (1.0: 0.75) (v: v) a ratio of crude extract / t-butanol and pH 4. In parallel, papain was recovered, in the aqueous phase with a purification fold of 11.45 and a recovery of 134%, by the optimized parameters of the TPP system: 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , the crude extract to t-BuOH ratios of (1.0: 0.75) (v:v), pH 6.0 and 25°C. while ficin was exclusively distributed, in the intermediate phase, after saturation with 40% (w / v) ammonium sulfate, and 1.0: 0.75 (v / v) of extract crude: t-butanol ratio at pH 7.0, thus giving a purification fold of 6.04 and a yield of 167%.

After application of the purified proteases on the meat, the results obtained demonstrate that papain and ficin have a considerable effect on the texture of the meat, in fact, these two proteases have degraded the muscle structure in contact with the enzyme, mainly the myosin and laminin, but having no effect on collagen. Electrophoretic analysis by Glycine-SDS PAGE revealed the degradation of various muscle proteins, which strongly indicates the considerable potential of using chicken pepsin, for tenderizing meat. From our results, we can affirm that the three purified enzymes show great potential, in their applications, on tough meats. This enzyme can be easily applied to these meats, to improve its tenderness, both on an industrial or domestic scale.

**Key words:** Meat, Artificial tenderization, proteases, ficin, papain, pepsin, hardness, TPP system.

## المخلص

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو دراسة تأثير البروتياز من أصل نباتي ، البابين (البابايا) والفيسين (شجرة النين) ومن أصل حيواني ، البيسين (معدة الدجاج) ، المنقى عن طريق التوزيع النظامي على ثلاث مراحل على اللحم القاسية. ومقارنة تأثير طرق التطرية الأنزيمية المختلفة على نسيج اللحم.

يصف هذا العمل نظام التوزيع ثلاثي المراحل (TPP) لتنقية هذه البروتياز ، حيث تم إعداد البروتوكولات ودراسة خصائص الإنزيمات المنقاة قبل تطبيقها على اللحم. بعد ذلك، درسنا تأثير هذه الإنزيمات على اللحم منخفضة الرتب ، لعدة أنواع ، وهي: لحوم الإبل المسنة ، والدجاج البياض ، والأبقار المسنة.

تظهر نتائجنا أن البيسين يميل إلى التركيز في المرحلة المتوسطة من نظام TPP ، مع عائد تنقية يبلغ حوالي 86% وعامل تنقية 3.26. المعلمات المثلى للنظام هي 40% كبريتات الأمونيوم  $(NH_4)_2SO_4$  ، ونسبة (0.75 : 1.0) (v) : مستخلص خام/ ت بيوتانول ودرجة الحموضة 4. بالتوازي ، تم استرداد بابيين في المرحلة مائة مع عامل تنقية 11.45 وعائد 134% ، من خلال المعلمات المثلى لنظام TPP 40% كبريتات الأمونيوم ، النسب 0.75 : 1.0 من المستخلص الخام إلى t-BuOH ، ودرجة الحموضة 6.0 و 25 درجة مئوية. أما بالنسبة للفيسين ، فقد تم توزيعه حصرياً ، في المرحلة المتوسطة ، بعد التشبع بكبريتات الأمونيوم بنسبة 40% (و / ح) ، بنسبة 0.75 : 1.0 (ح / ح) من الخام المستخلص t- بيوتانول عند درجة حموضة 7.0. مما يعطي معدل تنقية يبلغ 6.04 وعائد 167%.

بعد تطبيق البروتياز المنقاة على اللحم ، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن بابيين و فيسين لهما تأثير كبير على نسيج اللحم ، في الواقع ، أدى هذان البروتياز إلى تدهور بنية العضلات عند ملامسة الإنزيم ، وخاصة الميوسين و لامينين ، لكن ليس له تأثير على الكولاجين. كشف التحليل الكهربائي بواسطة Glycine-SDS PAGE عن تدهور بروتينات العضلات المختلفة ، مما يشير بقوة إلى الإمكانيات الكبيرة لاستخدام بيسين الدجاج لتطرية اللحم. من نتائجنا ، يمكننا أن نؤكد أن الإنزيمات الثلاثة المنقاة تظهر إمكانيات كبيرة ، في تطبيقاتها ، على اللحم القاسية. يمكن تطبيق هذا الإنزيم بسهولة على هذه اللحم لتحسين نضارتها ، سواء على المستوى الصناعي أو المحلي.

**الكلمات المفتاحية:** اللحم ، التطرية الاصطناعية ، فيسين ، بابيين ، بيسين ، صلابة ، نظام TPP.