

SOMMAIRE

	Page
LISTE DES FIGURES.....	I
LISTE DES TABLEAUX.....	II
LISTE DES ABREVIATIONS.....	III
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. LES CASEINES.....	4
1-1. Propriétés des différentes fractions caséiniques de la micelle.....	4
1-2. Structure de la micelle de caséine.....	6
1-3. La coagulation enzymatique du lait.....	8
2. LES PRINCIPAUX ENZYMES COAGULANTS LE LAIT.....	10
2-1. Protéases d'origine animale (protéases gastriques).....	10
2-1-1. La présure.....	12
2-1-2-La pepsine.....	13
2-1-2-1.La pepsine bovine.....	14
2-1-2-2. La pepsine porcine.....	14
2-1-2-3. La pepsine de poulet.....	15
2-2. Protéases d'origine	
végétale.....	16
2-3. Protéases d'origine microbienne.....	17
2-3-1. Protéases d'origine bactérienne.....	17
2-3-2. Protéases d'origine fongique.....	17
3.SPECIFICITE ET MECANISME REACTIONNEL DES ENZYMES COAGULANTS...	18
4. ACTION DES ENZYMES COAGULANTS SUR LES CASEINES.....	19
5. EXTRACTION DES PROTEASES GASTRIQUES PEPSINE ET CHYMOSINE.....	22
6. CONSERVATION DES ENZYMES COAGULANTS.....	23

CHAPITRE II. Matériel et méthodes.....	24
1. MATIERES PREMIERES ET PRODUITS BIOLOGIQUES.....	24
1-1. Les proventricules.....	24
1-2. Le lait.....	24
1-3. La présure.....	24
2. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES.....	25
2-1. Mesure du pH.....	25
2-1-1. Mesure du pH du lait.....	25
2-1-2. Mesure du pH des extraits de pepsine de poulet.....	25
2-2. Détermination de l'acidité du lait.....	25
2-3. Détermination de l'extrait sec total.....	25
2-4. Détermination des matières azotées totales du lait.....	26
2-5. Détermination de la teneur en protéine de l'extrait de pepsine.....	26
2-6. Dosage de la pepsine de poulet.....	27
3. EXTRACTION DE LA PEPSINE DE POULET.ET APPRECIATION DU DIAGRAMME PROPOSE.....	28
3-1. Présentation du diagramme appliqué.....	28
3-2. Etude de l'effet de la durée d'activation sur le taux de pepsine activé	29
3-3.Suivi de l'évolution de l'activité coagulante au cours la macération.....	30
3-4. Etude de l'influence de la clarification sur le taux de pepsine récupéré	30
4. ETUDE DES PROPRIETES COAGULANTES DE L'EXTRAIT DE PEPSINE.....	31
4-1. Estimation de l'activité coagulante	31
4-2. Appréciation de l'effet du pH du lait.....	33
4-3. Appréciation de l' effet de la température du lait	33
4-4. Détermination de l'effet de la concentration en enzyme.....	33
5. ETUDE DU MODE DE CONSERVATION DE L'EXTRAIT DE PEPSINE.....	34
5-1. Concentration.....	34
5-2. Conservation par réfrigération ou congélation	34
5-3. Conservation par déshydratation.....	35
5-3-1. Préparation de la pepsine déshydratée par séchage sous vide partiel.....	35
5-3-2. Préparation de la pepsine déshydratée par lyophilisation.....	36
5-3-3. Conservation de la pepsine déshydratée.....	36

6. ETUDE DE LA PROTEOLYSE DES CASEINS	37
---	----

CHAPITRE III.RESULTATS ET DISCUSSION.....38

1. CARACTERISTIQUES DU LAIT.....	38
----------------------------------	----

2. EXTRACTION DE LA PEPSINE DE POULET.....	38
--	----

2-1. Rendement de l'extraction	38
--------------------------------------	----

2-2. Effet de la durée d'activation sur le taux de pepsine activé.....	40
--	----

2-3. Evolution de l'activité coagulante durant la macération.....	41
---	----

2-4. Effet du mode de clarification de l'extrait brut sur le taux de pepsine récupéré....	42
---	----

3. PROPRIETES COAGULANTES DE LA PEPSINE DE POULET.....	43
---	-----------

3-1. Effet du pH.....	43
-----------------------	----

3-2. Effet de la température.....	45
-----------------------------------	----

3-3. Effet de la concentration en enzyme.....	47
---	----

4. ETUDE DU MODE DE CONSERVATION DE LA PEPSINE DE POULET.....	49
---	----

4-1.Effet de la concentration par précipitation au NaCl sur le taux de pepsine.....	49
---	----

4-2. Conservation de la pepsine de poulet par réfrigération et congélation.....	51
---	----

4-2-1. Congélation ou réfrigération de l'extrait clarifié (non concentré).....	51
--	----

4-2-2. Réfrigération ou congélation de l'extrait concentré.....	52
---	----

4-3. Conservation de la pepsine de poulet par séchage sous vide partielle.....	53
--	----

4-3-1. Taux de pepsine récupéré suite au séchage.....	53
---	----

4-3-2. Stabilité de la poudre séchée de pepsine au cours de la conservation.....	54
--	----

4-4. Conservation de la pepsine de poulet par lyophilisation.....	55
---	----

4-4-1. Taux de pepsine récupéré suite à la lyophilisation.....	55
--	----

4-4-2.Stabilité de la poudre lyophilisée de pepsine au cours de la conservation.....	56
--	----

5. ETUDE DE LA PROTEOLYSE DES CASEINES.....	57
---	----

CONCLUSION GENERALE.....	62
---------------------------------	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	65
---	-----------

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac. : Activité

B.S.A. : Albumine sérique bovine.

C.M.P. : Caséinomacropéptide

Con. : Concentration

°D : degré Dornic

Da : Dalton

D.O. : densité optique

E.C. : Extrait clarifié.

E.Co. : Extrait concentré

FAO : Food and agriculture organisation

FIL : Fédération internationale du lait

G.M.P. : Glycomacropéptide

Hb : Hémoglobine

NPN : Azote non protéique (non protein nitrogen)

P.C.C. : Phosphate de calcium colloïdal

Prot. : protéine

p/v : Poids par volume

TCA : Acide trichloroacétique.

T.N.: Azote total (total nitrogen)

U.A.C. : Unité d'activité coagulante.

U.P. : Unité peptique.

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 Composition moyenne de la micelle de caséine en g/100g	4
Tableau 2 Caractéristiques physico-chimiques des caséines	5
Tableau 3 Composition en acides aminés des enzymes gastriques et des pro-enzymes correspondants	11
Tableau 3 Caractéristiques des enzymes gastriques	13
Tableau 4 Perte en matière grasse et en protéines au cours de la phase de coagulation enzymatique du lait ; Comparaison entre enzymes coagulants.	20
Tableau 5 Activité coagulante retrouvée (exprimée en % de l'activité initiale ajoutée au lait) dans le coagulum après acidification à différentes valeurs du pH.	20
Tableau 6 Caractéristiques physico-chimiques de la poudre de lait écrémé et du lait écrémé reconstitué à raison de 120 g de poudre par litre	38
Tableau 7 Caractéristiques des extraits brut et clarifié de pepsine de poulet issus de 100g de proventricules par macération durant 3h à 25°C	39
Tableau 8 Taux de pepsine récupéré, exprimé en activité coagulante, en fonction du traitement de clarification réalisé	43
Tableau 9 Caractéristiques de l'extrait de pepsine obtenu par précipitation au NaCl : comparaison avec celles de l'extrait clarifié initial	50
Tableau 10 Effet de la concentration par précipitation au NaCl sur les caractéristiques de l'extrait de pepsine concentré 4 fois	51
Tableau 11 Caractéristiques de la poudre séchée de pepsine de poulet	53
Tableau 12 Caractéristiques de la poudre de pepsine lyophilisée obtenue avec et sans l'emploi du lactose	55
Tableau 13 NPN libéré, à différentes durées d'incubation, par la présure et la pepsine de poulet	59

LISTE DES FIGURES

	page
Figure 1 Représentation schématisée de la micelle selon le modèle submicellaire	7
Figure 2 Représentation schématique de la structure de la micelle de caséine selon le modèle de Horne.	8
Figure 3 Micrographe électronique d'une micelle de caséine individuelle	8
Figure 4 Appareil digestif du poulet	16
Figure 5 Courbe étalon pour le dosage des protéines selon la méthode de LOWRY	27
Figure 6 Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet selon BOHAK	29
Figure 7 Evolution de l'activité coagulante au cours de l'activation à pH 2,0	41
Figure 8 Evolution de l'activité coagulante en fonction du temps de macération	42
Figure 9 Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine de poulet et de la présure	44
Figure 10 Activité coagulante de la pepsine de poulet et la présure en fonction de la température du lait à pH 6,4.	46
Figure 11 Effet de la concentration en pepsine de poulet et en présure sur le temps de floculation du lait	48
Figure 12 Temps de floculation en fonction de l'inverse de la concentration en pepsine de poulet et de présure	49
Figure 13 Evolution de l'activité coagulante de l'extrait clarifié et concentré au cours de la conservation à l'état congelé et réfrigéré.	52
Figure 14 Stabilité de la poudre séchée de pepsine de poulet au cours de la conservation à 10 °C	54
Figure 15 Stabilité de la poudre lyophilisée de pepsine de poulet au cours de la conservation	57
Figure 16 Evolution de la teneur en NPN du lait au cours de la coagulation par la pepsine de poulet et la présure.	58

INTRODUCTION

Jusqu'à 1950, l'utilisation en fromagerie de la présure comme agent coagulant du lait était prédominante. Les décennies suivantes ont ensuite connu une pénurie mondiale en présure avec une fluctuation des prix en parallèle avec une production croissante en fromage. Cette situation a stimulé la recherche de succédanés de présure convenables. Ainsi, de nombreuses protéases d'origine végétale, microbienne et animale ont été étudiées.

La pepsine est l'une des protéases d'origine animale qui ont fait l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en industrie fromagère comme succédanés de la présure. En effet, les pepsines de quelques espèces tels que la pepsine bovine, caprine et de poulet sont déjà employées depuis des dizaines d'années.

La pepsine bovine est un des constituants mineurs normaux de la présure mais dont la sécrétion devient prépondérante après sevrage. L'emploi de la pepsine bovine extraite à partir d'animaux adultes est souvent réalisé en période de pénurie de caillette de veaux (ALAIS, 1974; RAMET, 1997). L'utilisation de la pepsine porcine a débuté pendant la seconde guerre mondiale, mais ne s'est développée réellement que depuis 1960.

Mélangée à la présure, la pepsine porcine apparaît être d'une utilisation plus large, notamment dans les pays anglo-saxons pour la fabrication de fromage acide (GREEN et FOSTER, 1974 ; ERNSTROM et WONGT, 1983). La pepsine extraite de proventricules de poulet a fait l'objet de plusieurs études en vue de son utilisation pour la coagulation du lait (GORDIN et ROSENTHAL, 1978; GREEN *et al.*, 1984; EMMONS *et al.*, 1990).

La pepsine de poulet est largement employée dans la fabrication des fromages locaux en Israël (GORDIN et ROSENTHAL, 1987 ; CUVELLIER, 1993).

La pepsine extraite d'estomac de poisson a également fait l'objet de plusieurs études (HAARD *et al.*, 1982 ; CUVELLIER, 1993). C'est le cas de la pepsine extraite à partir de la paroi interne de l'estomac de la morue de l'atlantique. A 15°C cette pepsine a coagulé le lait plus efficacement que la chymosine de veau et serait intéressante pour l'emprésurage à froid du lait dans la préparation du fromage cheddar (CUVELLIER, 1993).

Plusieurs protéases de différentes origines ont la capacité de coaguler le lait mais peu d'entre elles sont utilisées comme succédanés de la présure. Cela est dû à leur activité protéolytique élevée qui s'exprime par une action excessive et non spécifique sur les caséines. En effet, la coagulation enzymatique du lait nécessite l'hydrolyse d'une seule liaison peptidique (Phe₁₀₅-Met₁₀₆) au niveau de la caséine κ (DALGLEISH, 1982 ; LUCEY, 2002 ; CREAMER, 2002). Toute action non spécifique sur la caséine κ ou les autres types de caséine entraîne une perte dans le rendement fromager par libération de peptides dans le lactosérum (EMMONS *et al.*, 1990 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992). En outre, une action protéolytique due à la quantité d'enzyme retenue par le caillé se poursuit au cours de l'affinage et peut donner lieu à des défauts de goût et de texture (ERNSTROM et WONGT, 1983 ; KIM *et al.*, 2004).

Ainsi l'étude d'une enzyme en vue de son utilisation dans la coagulation du lait doit concerner, d'une part, son activité coagulante et, d'autre part, son activité protéolytique. L'étude de l'activité coagulante d'une protéase consiste, essentiellement, en la mesure de la vitesse avec laquelle cette enzyme provoque la coagulation du lait (BERRIDGE, 1955 ; ANDREN, 2002) et l'appréciation de la dépendance de cette opération vis-à-vis de certains facteurs tels que le pH et la température. Cela renseigne sur les conditions optimales d'utilisation de la protéase employée et situe l'effet de ces facteurs dans les conditions de coagulation du lait (FEDERICI, 1982 ; GREEN et LOHN KAY, 1984 ; NAJERA *et al.*, 2003). L'étude de l'activité protéolytique au cours de la phase de coagulation consiste principalement en la mise en évidence de l'action de la protéase sur les caséines (ALAIS, 1974 ; EMMONS et BECKETI, 1990 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992).

Vue l'évolution croissante durant ces dernières années, en Algérie, des productions aviaire et fromagère et en outre l'importation totale de la présure traditionnelle et / ou des succédanés de présure d'origines fongiques, la pepsine extraite de proventricules de poulet pourrait constituer une source intéressante de présure de remplacement. En effet, la consommation de lait est en évolution continue ; elle a augmenté de 199,841 mille tonne en 1990 à 355,258 mille tonnes en 2004 avec une moyenne de consommation de 289,91g /H/j en 2004. D'autre part, la production aviaire a également évolué; entre 1990 à 2004 la production en viande de poulet a augmenté de 194 à 253 mille tonne (FAO, 2006).

Ce succédané que nous envisageons d'étudier peut être obtenu à partir de matières premières locales et avec des prix convenables du fait que les abats de volailles sont disponibles et ne sont pas valorisés dans notre pays.

Notre travail porte sur :

- la valorisation des abats du poulet par la récupération des proventricules.
- l'évaluation de la possibilité d'extraction de pepsine à partir des proventricules.
- l'estimation des propriétés coagulantes et de l'activité protéolytique au cours de la coagulation de la pepsine en tant que succédané de présure.
- les possibilités d'assurer la conservation de la pepsine de poulet.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1-LES CASEINES

La matière azotée du lait est divisée en deux parties : la matière azotée protéique soit 95% de l'azote total et la matière azotée non protéique (NPN, 5 %). En fonction du pH, les protéines du lait peuvent être réparties en deux catégories ; les caséines (insolubles à pH 4,6) et les protéines du lactosérum (solubles à pH 4,6) (GUILLOU *et al.*, 1986). La caséine entière représente 80% des protéines du lait de vache et se présente sous une forme micellaire. La micelle est formée par l'association des caséines α_{s1} , α_{s2} , β , κ et de composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphate. Les proportions moyennes des différents constituants de la micelle sont données dans le tableau 1. Toutes les micelles n'ont pas les mêmes dimensions, ni la même composition. Les grosses micelles ont une charge minérale plus élevée et des proportions relatives de caséines β et κ plus faibles que les petites (BRULE *et al.*, 1997).

Le diamètre moyen généralement admis est voisin de 180 nm avec une distribution entre 100 et 500nm (CAYOT et LORIENT, 1998). On estime que la masse micellaire doit être comprise entre 0,5 et 1×10^9 Da. La forme est considérée comme sphérique mais avec une surface granuleuse la faisant ressembler à une framboise (SCHMIDT, 1982 ; WALSTRA, 1999).

Tableau 1 : Composition moyenne de la micelle de caséine en g/100g (BRULE *et al.*, 1997)

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

1-1. Propriétés des différentes fractions caséiniques de la micelle

Les caséines ont un certain nombre de caractères communs, la présence de phosphore sous la forme de groupements phosphoséryls, la forte proportion de résidus apolaires. Elles se distinguent les unes des autres par le nombre de groupements phosphoséryls, la présence ou

non de cystéine, la présence ou non de glucides, leur caractère plus ou moins hydrophobe (tableau 2). La présence des groupements phosphoséryls confère aux caséines une très grande affinité vis-à-vis du calcium, du magnésium et des oligoéléments. Dans le cas des caséines α_{s1} , α_{s2} , et β , qui sont hautement phosphorylées, les sites phosphorylés sont en majeure partie groupés, ce qui a pour conséquence de créer dans la chaîne peptidique des zones à caractère acide et hydrophile très marqué.

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des caséines (BRULE *et al.*, 1997 ; CAYOT et LORIENT, 1998 ; LEONIL *et al.*, 2001 ; CREAMER, 2002).

	Caséine- α_{s1}	Caséine- α_{s2}	Caséine- β	Caséine- κ
Poids Moléculaire (Da)	236172 \pm 1,3	25230,0 \pm 2.1	23984,8 \pm 0,7	19007,0 \pm 1,1
Conc. g/l de lait	10,25	2,75	9,62	3,5
Formes présentes	α_{s0} , α_{s1}	α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} , α_{s6}	/	κ_1 , κ_2 , κ_3 , κ_4 , κ_5 , κ_6 , κ_7
Variant génétique	A*, B, C, D, E,	A* et D	A ^{1*} , A ^{2*} , A ³ , B, C, D, E, F, G	A*, B*, B ² , C, E
Nombre d'acides aminés	199	207	209	169
Résidus cystéine	0	2	0	2
Groupements phosphoséryles (nbre/mole)	8-9	10-13	5	1-2
Présence de glucides	-	-	-	+
Charge à pH 6,6	-20,9	-14,8	-12,3	-3,0
Sensibilité au Ca ⁺⁺	++	+++	+	-
Hydrophobicité (kJ mol ⁻¹ / résidu)	4,9	4,64	5,59	5,12

* variants génétiques les plus répandus

Les différentes formes d'un type de caséine se distinguent par leur composition, en particulier, le nombre de groupements phosphate (MATIEU, 1998 ; CREAMER, 2002).

La caséine κ , bien que non majoritaire dans la micelle est la protéine laitière de loin la plus étudiée car elle détient le rôle clef dans la coagulation du lait par la présure. Le variant génétiques A est le plus fréquemment rencontrée dans le lait (75 à 85 % des cas). La liaison peptidique 105-106 entre le résidu phénylalaninyl et le résidu méthioninyl est la liaison

hydrolysée spécifiquement par la chymosine après emprésurage du lait. La partie qui correspond au glycomacropéptide (106-169) est de nature très hydrophile et donne un caractère très amphiphile à la protéine. La partie N-terminale (1-105) est légèrement cationique et très hydrophobe. Lors de l'hydrolyse par la chymosine, la para-caséine κ (1-105) reste accrochée à la micelle ; la micelle en perdant son pôle hydrophile stabilisant, précipite. De toutes les caséines, c'est la seule qui soit glycosylée. Les sites possibles de glycosylation ont été déterminés comme étant situés sur les résidus de thréonine 131, 133, 135, et 136 (LEONIL *et al.*, 2001 ; CREAMER, 2002). Le résidu d'ose qui constitue principalement la O-glycosylation de la caséine κ est un tétraoside (le N-acétyl-neuraminyl- α 2-3-galactosyl- β 1-3(N-acétylgalactosaminyl- α 2-6)-N-acétylgalactos-ami-nitol).

Le calcium et le phosphate sont les constituants inorganiques majeurs de la micelle. Le calcium est en partie (environ 1/3) directement fixé sur les caséines, essentiellement sur les groupements esters phosphoriques (BRULE *et al.*, 1997). Le phosphore lié aux résidus sérine, appelé phosphore organique, représente environ 40% du phosphore de la micelle. L'autre fraction du calcium est à l'état de phosphate de calcium colloïdal (P.C.C.) présent en petits amas sphériques d'un diamètre proche de 1nm et de composition $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ (SCHMIDT, 1982).

1-2- Structure de la micelle de caséine

L'organisation de la micelle, qui englobe, l'agencement, la répartition des composants, leur mode d'association, reste encore du domaine de l'hypothèse. De nombreux modèles ont été proposés les uns accordent à la micelle une structure globale avec une répartition non uniforme des constituants. D'autres retiennent l'idée d'une structure avec sous-unités ou submicelles. Les hypothèses les plus admises sont celles de Schmidt (1982) et de HORNE (1998).

Selon le modèle submicellaire de SCHMIDT (1982), la micelle serait constituée d'un ensemble de sous-unités, de nature exclusivement protéique et de composition variable, associées les unes aux autres par les éléments minéraux (calcium, magnésium et phosphate). Cette association est favorisée par la présence des sites phosphoséryles localisés à la surface des submicelles ; ceux-ci présentent une très grande affinité vis-à-vis du calcium et du phosphate de calcium colloïdal. La structure de ces submicelles n'est pas uniforme. Elle aurait

un cœur hydrophobe, formé par les parties apolaires des caséines, et une enveloppe de nature polaire, formée des segments de chaînes hautement chargés avec, d'une part, les résidus phosphoséryles des caséines α_{s1} , α_{s2} et β et, d'autre part, la partie C-terminale de la caséine κ . Celle-ci est projetée au sein de la phase aqueuse, créant au tour de la micelle un « chevelu » épais d'au moins 5nm. (SHMIDT, 1982 ; WALSTRA, 1999). Cependant, certains auteurs ont remis en cause le concept selon le quel les submicelles seraient liées entre elles par le phosphate de calcium colloïdal. En effet, ils ont démontré que les amas du phosphate du calcium se déposaient dans les submicelles durant de processus de synthèse du lait. Cela entraîne une réduction des charges nettes des submicelles qui s'agrègent ainsi pour former la micelle (VAN DIJK, 1992 cité par WALSTRA, 1999) (Figure 1).

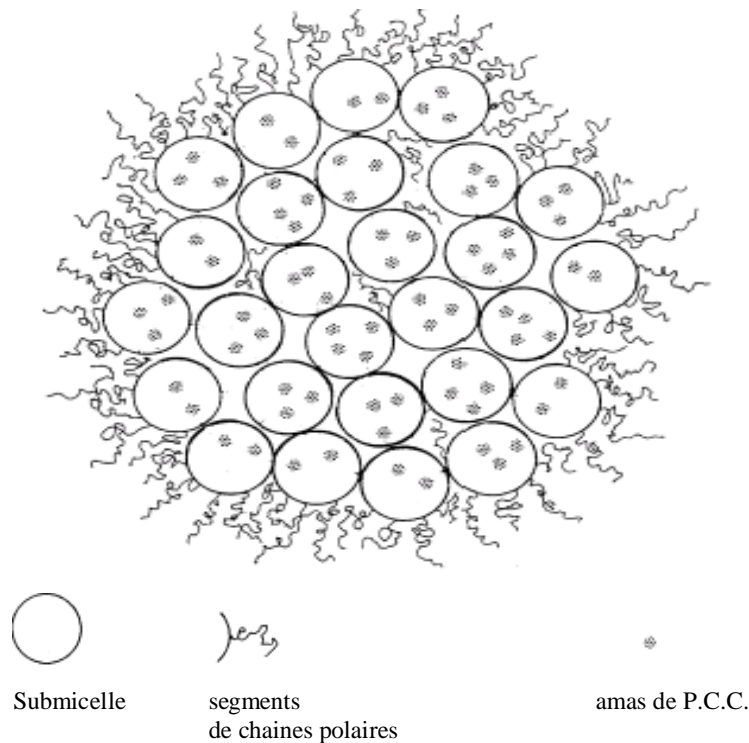


Figure 1 : Représentation schématisée de la micelle selon le modèle submicellaire (WALSTRA, 1999)

Selon le modèle de HORNE (1998, 2002), la formation de la micelle et sa croissance est réalisée suite à une polymérisation faisant intervenir deux formes distinctes d'interactions. D'une part, des interactions entre les zones hydrophobes des caséines et d'autre part des interactions entre les segments phosphorylés qui sont pontés par les ions calcium du phosphate de calcium colloïdal. En outre, le modèle de HORNE attribue au phosphate de

calcium colloïdal un rôle supplémentaire et fondamental qui est celui d'un agent neutralisant qui étant chargé positivement se fixe aux groupements phosphoséryles chargés négativement pour réduire la charge à un niveau où les interactions attractives entre les régions hydrophobes des caséines sont prépondérantes (figure 2).

La caséine κ est liée aux autres caséines grâce à son segment N-terminal hydrophobe et contribue, en grande partie, par son segment C-terminal, dans la formation de la couche externe «chevelue» qui s'étend dans la phase aqueuse et agit comme une « brosse » responsable de la stabilité stérique des micelles et prévient ainsi leur agrégation en empêchant la formation d'interactions entre régions hydrophobes. (DALGLEISH, 1997 ; KRUIF, 1999 ; HORNE, 2002).

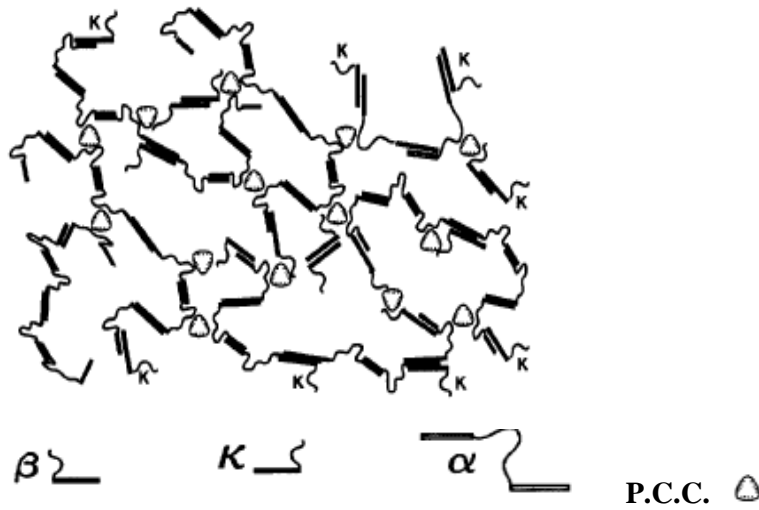


Figure 2 : Représentation schématique de la structure de la micelle de caséine selon le modèle de HORNE, 1998.

Toutefois, des études plus récentes sur la structure de la surface micellaire, obtenues par microscopie à émission d'électron, indiquent l'absence de submicelles et d'une couche chevelue bien nette. En effet, les différentes caséines sont apparues arrangées sous une forme tubulaire à l'intérieur de la micelle avec un espace interstitiel entre les substructures (DALGLEISH *et al.*, 2004). Ces derniers résultats montrent que la structure de la micelle est beaucoup plus compliquée pour qu'elle soit décrite par l'un des deux modèles cités ci-dessus.

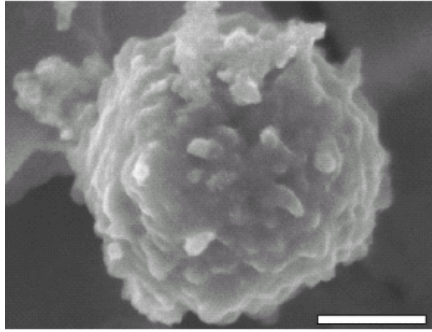


Figure 3 : Micrographie électronique d'une micelle de caséine individuelle
(Dalglish *et al.*, 2004)

1-3. La coagulation enzymatique du lait

La coagulation du lait par la présure se produit en deux étapes, une phase primaire, enzymatique et une phase secondaire, agrégation.

✓ Phase primaire, enzymatique

Selon les modèles les plus récents qui décrivent la structure de la micelle de caséine et la stabilité des micelles dans la phase aqueuse du lait, la couche externe de la micelle est principalement constituée de caséine κ avec son segment C- terminal hydrophile libre qui s'étend dans la phase aqueuse du lait assurant la stabilité stérique et agissant comme une barrière contre l'association des micelles. Au cours de la phase enzymatique, la présure hydrolyse la caséine κ au niveau de la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Cette action divise la molécule de la caséine κ en deux fragments peptidiques ; le caséinomacropéptide (CMP) ou s'il est fortement glycosylé, glycomacropéptide (GMP) et la para caséine κ . Cette hydrolyse entraîne une réduction de la charge négative et des répulsions stériques de telle sorte que les micelles de caséine deviennent susceptibles à l'agrégation (LUCY, 2002).

✓ Phase secondaire

La stabilité des micelles de caséine dans le lait sous forme de dispersion colloïdale est attribuée à leur charge négative nette induisant des forces électrostatiques répulsives et aux répulsions stériques entre les régions flexibles des macropéptides de caséine κ . En outre, les ponts calciques entre les molécules de caséine, les liaisons hydrogènes et les forces de Van

der Waals contribuent également dans cette stabilité (SCHMIDT, 1982). La libération du macropeptide de la caséine κ sous l'action de la protéase employée entraîne la réduction des répulsions électrostatiques entre les micelles de caséine hydrolysées. L'élimination de ces macropeptides entraîne également une réduction du diamètre hydrodynamique par environ 5 nm et une perte de la stabilité stérique (WALSTRA *et al.*, 1981). La nature des interactions intervenant durant la phase d'agrégation n'est pas encore bien connue, toutefois les ponts calciques et les forces de Van der Waals ainsi que les interactions hydrophobes semblent impliqués. Les micelles déstabilisées s'agrègent seulement en présence des ions calcium libres (Ca^{++}) et la coagulation se produit seulement en présence d'une quantité suffisante de calcium de phosphate colloïdal. Le processus d'agrégation est, d'autre part, fortement dépendant de la température et se produit uniquement à des températures supérieures à 15°C (DALGLEISH et HOLT, 1988). A basse température (inférieure à 15°C) l'agrégation est très faible, cela est souvent pris comme une indication de l'importance des interactions hydrophobes. En effet, la libération des macropeptides expose les régions hydrophobes à la surface des micelles et augmente l'opportunité aux interactions hydrophobes entre micelles (MC MAHON et BROWN, 1990). Lorsque le lait est coagulé sous les conditions normales de pH, de température et de composition en protéine, l'agrégation commence lorsque 87% des molécules de caséine κ sont hydrolysées (PAYENS, 1989) et qui correspond à 50 % du temps de coagulation relatif (MC MAHON et BROWN, 1990). En effet, il y a un certain chevauchement entre les deux phases enzymatique et d'agrégation qui se produit, à la fin de la phase enzymatique (PAYENS, 1989). Toutefois l'étendue de ce chevauchement dépend des conditions expérimentales : pH, température et contenu en protéine. Ainsi à pH 5,6 et 6,7 l'agrégation débute à 30 et 60% de l'hydrolyse de la caséine κ , respectivement (PAYENS, 1989). Au cours de la coagulation, il y a initialement la formation de chaînes linaires de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas et finalement il y a formation d'un gel protéique (LUCEY, 2002).

2- LES PRINCIPAUX ENZYMES COAGULANTS DU LAIT

2-1. Protéases d'origine animale (protéases gastriques)

Les enzymes coagulants d'origine animale sont des protéases gastriques. Les plus employés sont la présure (constitué principalement de chymosine), les pepsines; bovine,

porcine et de poulet. Ces protéases sont formées à partir d'un précurseur (zymogène), forme inactive, sécrété par la muqueuse gastrique. Le tableau 3 donne la composition en acide aminés des ces protéases et celle des zymogènes correspondants. Le zymogène de la pepsine est appelé pepsinogène alors que celui de la chymosine est appelé prochymosine. Comparé à l'enzyme actif, le zymogène possède un segment peptidique supplémentaire liée de la partie N-terminal de l'enzyme actif. Au niveau de la structure tridimensionnelle, cette chaîne peptidique, souvent nommée prosegment, occupe le site actif et sert à bloquer l'entrée du substrat. Ainsi l'activation du proenzyme nécessite la libération du prosegment et la dissociation de ce dernier du site actif (RICHTER *et al.*, 1998).

Les zymogènes gastriques, stables à pH neutre, sont convertis en enzyme actif sous l'effet de l'acidité naturelle du milieu stomacal. La conversion a lieu à des pH inférieur à 5. Cette dépendance du pH de l'activation est due à la présence d'interactions électrostatiques entre les résidus basiques dans le prosegment et les résidus acides de la portion correspondante à l'enzyme actif. Ces interactions jouent un rôle essentiel dans le maintien du zymogène sous une forme inactive en stabilisant la position du prosegment dans le site actif (SANNY, *et al.*, 1975 ; RICHTER *et al.*, 1998). Aux valeurs de pH inférieurs à 5,0 les résidus acides impliqués deviennent protoné ; ce qui entraîne la rupture des interactions électrostatiques entre le prosegment et l'enzyme actif. Dès qu'une très faible quantité d'enzyme est libérée du précurseur à la faveur de l'acidité stomacale, la réaction devient autocatalytique, l'enzyme produit provoque l'activation du zymogène par libération du prosegment. Cette opération est réalisée par voie directe ou séquentielle. Par voie directe, le prosegment est éliminé en une seule étape par clivage de la liaison peptidique entre la partie C-terminal du prosegment et la partie N-terminale de l'enzyme actif. Cette voie a été mise en évidence pour le pepsinogène de poulet et pour le pepsinogène de singe (BOHAK, 1969 ; GREEN et LLEWELLIN, 1973 ; KAYAGEMA et TAKAHASHI, 1976). Par voie séquentielle, plusieurs liaisons peptidiques sont préalablement attaquées dans le prosegment. Le pepsinogène bovin est activé selon cette voie (HORBOE et *a.l.*, 1974). Toutefois, l'activation du zymogène peut avoir lieu selon les deux voies simultanément, c'est le cas du pepsinogène de porc (KOGA et HAYASHI, 1976). Dans le cas du prochymosine bovin l'activation à pH 2,0 donne des produits intermédiaires hautement stables et dont la conversion en enzyme actif n'a lieu que lorsque le pH est élevé à 5,5 (FOLTMANN, 1971 ; RICHTER *et al.*, 1998).

Tableau 3 : Composition en acides aminés des enzymes gastriques et des pro-enzymes correspondants (CHOW et KASSELL, 1968 ; BOHAK, 1969 ; FOLTMAN, 1971 ; SEPULVEDA et *al.*, 1975 KAGEYAMA et TAKAHASHI, 1976).

Acide aminé	Nombre de résidu d'acides aminés par mole						
	Pro-enzyme				Enzyme		
	Chymosine	pepsine bovine	pepsine porcine	pepsine de poulet	Chymosine	pepsine porcine	pepsine de poulet
Lysine	13	8	10	18	8	1	8
Histidine	5	2	3	8	4	1	3
Arginine	7	6	4	7	5	2	4
acide Aspartique	33	40	44	43	30	42	35
Thréonine	20	27	26	28	18	27	24
Sérine	31	50	46	39	27	44	35
Acide Glutamique	36	32	28	30	29	26	23
Proline	14	15	19	19	12	15	14
Glycine	28	35	35	32	24	35	27
Alanine	15	16	19	18	13	16	15
Cystine	5	6	6	7	5	6	7
Valine	23	25	23	26	21	22	21
Méthionine	7	4	4	9	7	4	9
Isoleucine	19	32	25	23	15	25	20
Leucine	26	25	33	30	19	27	20
Tyrosine	18	18	17	24	15	15	20
Phénylalanine	16	15	15	21	14	14	18
Tryptophane	4	6	6	5	4	5	5
Total	320	362	363	387	270	327	308

2-1-1. La présure

La présure de veau est l'agent coagulant traditionnellement utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages ; de petites quantités sont produites à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau. Selon la fédération internationale du lait (FIL) la dénomination «présure» est donnée à l'extrait coagulant provenant de caillettes de jeunes ruminants abattus avant sevrage (ANDREN, 2002). Elle contient en réalité deux fractions actives, l'une, majeure, constituée par la chymosine, l'autre, mineure, par la pepsine. Au pH du lait (6,2-6,6), la chymosine représente plus de 80 % de l'activité coagulante (ANDREN,

2002). La sécrétion de chymosine s'arrête au moment du sevrage lorsque des aliments solides sont présents dans la ration alimentaire, la production de pepsine s'accroît alors très fortement et devient dominante.

L'obtention de présure à partir de veaux fistulés a fait l'objet de plusieurs expériences. La collecte de présure, deux fois par jour, jusqu'à ce que les veaux atteignent trois à quatre mois, a permis l'obtention d'une quantité de présure 30 à 40 fois plus importante que celle obtenue par veau après abattage (ALAIS, 1974 ; ERNESTROM et WONGT, 1983). Toutefois, le coût opératoire et les risques cliniques ont limité le développement de ce procédé.

L'obtention de chymosine par transgénèse connaît actuellement un grand développement, vu le rendement élevé et la qualité de produit obtenue qui est comparable à celle de la chymosine de veau (BARBANO et RASMUSSEN, 1992 ; YAMASHITA *et al.* 1994 ; BELDARRAIN *et al.*, 2002).

La chymosine est extraite des caillottes de veaux sous sa forme inactive. Le prochymosine est ensuite activé par une protéolyse limitée. Cette action est accompagnée par une réduction du poids moléculaire de 36000 à 31000 (FOLTMANN, 1971).

Les différentes fractions de la chymosine, désignées par A, B et C, sont toutes actives avec chacune une activité coagulante relative spécifique de 125, 100 et 55-60, respectivement. La chymosine B est la plus abondante. Aucune différence entre la chymosine A et B n'a été relevée ; cependant, la chymosine C représentait un mélange contenant des produits de dégradation (FOLTMANN, 1971). Il existe deux variants génétiques de la chymosine, A et B, qui se distinguent par la présence, dans la position 244, de l'acide aspartique pour le variant A et de la glycine pour le variant B. Les deux variants sont présents avec un taux de 50% dans la population bovine. Bien que la chymosine A possède une activité coagulante 25% supérieure à celle de la chymosine B, les deux variants possèdent des propriétés fromagères similaires (ANDREN, 2002).

Le pH optimum d'activité protéolytique de la chymosine est au environ de 4,0 (FOLTMANN, 1971). La chymosine possède une activité coagulante élevée (à pH 6,7) comparée à la pepsine. L'activité coagulante de 1 mg de chymosine correspond à celle de 5 mg de pepsine à pH 6,7 (ANDREN, 2002). L'activité maximale de la chymosine se situe à pH 5,5 et à la température de 42°C (RAMET, 1997) (tableau 4). La chymosine hydrolyse la

caséine en milieu de chaîne est possède une double activité, une sur la caséine κ qui conduit à la déstabilisation micellaire au cours de la phase de coagulation et une activité faible de protéolyse générale sur les différentes fractions caséiniques, qui intervient essentiellement pendant l'affinage du fromage (O'KEEFFE *et al*, 1976 ; DAVE *et al*, 2003).

Tableau 4 : Caractéristiques des enzymes gastriques (CHOW et KASSELL, 1968 ; BOHAK, 1969 ; FOLTMAN, 1971 ; ANTONINI et RIBADEAU-DUMAS, 1971 ; ERNSTROM et WONGT, 1983 ; CUVELLIER, 1993).

Principales Caractéristiques		Chymosine	pepsine bovine		pepsine porcine	pepsine de poulet
			I	II		
Masse molaire	Proenzyme	36.000	38.943		42000	43.000
	Enzyme	31.000	–	33.400	34.500	35.000
Fractions		A, B, C,	–		A, B, C, D,	–
pH d'activation		5,0 ; 2,0	2,0		2,0	2,0
N- terminal	Proenzyme	Glycine	Leucine	Sérine	Leucine	Lysine
	Enzyme	Alanine	–	Valine	–	Serine
C- terminal	Proenzyme	Isoleucine	Alanine		–	Serine
	Enzyme	Isoleucine	–	Alanine	–	Serine
pH optimum d'activité protéolytique sur l'hémoglobine		3,4	2,8	≤2	1,8	2,8
pH de stabilité (à 25°C)	Proenzyme	5,3-9,0 ^a	>7,0 ^b		≤10,5 ^b	≤10,5 ^b
	Enzyme	5,3-6,3 ^a	< 6,0 ^b		≤ 6,5 ^b	≤ 8,0 ^b
pH inhibition (enzyme)		> 6,3 ^a ; <3,5 ^a	>6,9 ^b		> 6,5 ^b	> 8,5 ^b

^a valeurs déterminées sur l'hémoglobine comme substrat, ^b valeurs déterminées sur le lait comme substrat

2-1-2. La pepsine

La pepsine est une protéase acide présente dans le suc gastrique de tous les mammifères et les oiseaux. L'une de ses remarquables caractéristiques est sa grande activité dans cet environnement acide ; elle est active même à pH 1 où plusieurs enzymes et protéines subissent une rapide dénaturation.

2-1-2-1. La pepsine bovine

La pepsine bovine est extraite à partir des caillottes d'animaux adultes et de veaux sevrés. 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 et KASSELL, 1968). ANTONINI et RIBADEAU-DUMAS (1971) ont pu révéler la présence d'une pepsine I et d'une pepsine II dans l'extrait activé de caillette de bœuf, issus de deux zymogènes différents. La pepsine I est un constituant mineur (ANTONINI et RIBADEAU-DUMAS, 1971). Les propriétés protéolytiques de la pepsine bovine sur les caséines sont plus semblables à celles de la chymosine (ERNSTROM et WONG, 1983 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992). En outre, son activité coagulante est moins dépendante du pH, contrairement à la pepsine porcine et elle provoque la coagulation du lait à pH 6,9 (ERNSTROM et WONG, 1983). Le Tableau 4 donne quelques caractéristiques de la pepsine bovine.

2-1-2-2. La pepsine porcine

La pepsine porcine est produite à partir de la muqueuse gastrique du porc sous sa forme inactive. L'extrait brut de la pepsine contient dans la majorité de la pepsine A et des composés mineurs correspondants aux pepsines B, C, D, et à la gastricsine (CUVELLIER, 1993). Les pepsines sont produites à partir de zymogènes différents. La pepsine B et C provoquent la coagulation du lait mais beaucoup moins rapidement que la pepsine A, majoritaire. Cependant, contrairement à la pepsine porcine A, elles sont relativement stables au pH 6,9. La pepsine D est très instable aux pH supérieurs à 6,0 et elle est deux fois plus active que la pepsine majoritaire dans la coagulation du lait (ERNSTROM et WONGT, 1983). La pepsine porcine est formée d'une seule chaîne polypeptidique composée de 321 résidus d'acides aminés est son poids moléculaire est de 35000 Da. (Tableau 4) (SEPULVEDA *et al.*, 1975 ; KAGEYAMA et TAKAHASHI, 1976). Son activité catalytique est la plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat (BOHAK, 1969 ; ANTONINI et RIBADEAU-DUMAS, 1971).

Le principal inconvénient de la pepsine porcine comme agent coagulant du lait est le fait que son activité coagulante est fortement dépendante du pH. Aux valeurs de pH voisin de 6,5 et de température voisine de 30 °C, utilisées en fromagerie, la pepsine porcine est

partiellement dénaturée et après 1 heure, seulement 50% de son activité coagulante est maintenue (ANDREN, 2002).

2-1-2-3. La pepsine de poulet

Le pepsinogène de poulet et la pepsine correspondante ont été partiellement purifiés par HERRIOT, BARTZ et NORTHOP (1938). Ces auteurs ont observé que la pepsine de poulet diffère de la pepsine bovine et porcine par sa stabilité dans les solutions à pH neutre et modérément alcalin. Alors que la pepsine porcine était rapidement inactivée à pH supérieur à 6,5. La pepsine de poulet est stable aux pH de 8 à 8,5 (Tableau 4). L'inactivation à pH 6,5 à 7 est une caractéristique particulière aux pepsines de la plupart des vertébrés.

DONTA et 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.

La composition en acides aminés montre que cette pepsine est moins acide que les autres pepsines étudiées. La pepsine de poulet contient 39 groupements carboxyles libres et 16 groupements basiques alors que la pepsine porcine contient 40 groupements carboxyles libres et seulement 6 groupements basiques (BOHAK, 1969).

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. A 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 (BOHAK, 1969).

Dans le tube digestif de poulet, la pepsine est sécrétée au niveau du proventricule qui est située légèrement à gauche dans la cavité abdominale entre le jabot et le gésier (Figure 4). C'est un ronflement fusiforme (de 3 cm de long en moyenne chez la poule) dont la muqueuse est très riche en glandes à mucus. La paroi interne, très épaisse, est formée de lobules dont chacun constitue une glande composée, disposée radialement à l'axe de l'organe (ALAMAREOT, 1982). Ces glandes en tube ont des orifices formant des rangées de mamelons visibles à l'œil nu. Les alvéoles de ces glandes sont bordées de cellules très spécialisées sécrétant à la fois de l'acide chlorhydrique et une proenzyme protéolytique : le

pepsinogène (LARBIER et LECLERCQ, 1992). Le système de canaux collecteurs, s'ouvrant sur des petites papilles, apporte le suc gastrique dans la lumière du proventricule. Le chyme, provenant du jabot, séjourne dans le proventricule relativement peu de temps (de quelques minutes à une heure) avant de passer dans le gésier. Le suc gastrique entre en action avec les aliments dans le gésier, dans la première portion du duodénum et éventuellement dans le jabot où il arrive par des mouvements de renvoi. Le volume du suc gastrique, qui varie de 5 à 20 ml/h en période de jeûne, atteint 40 ml après une stimulation à l'histamine.

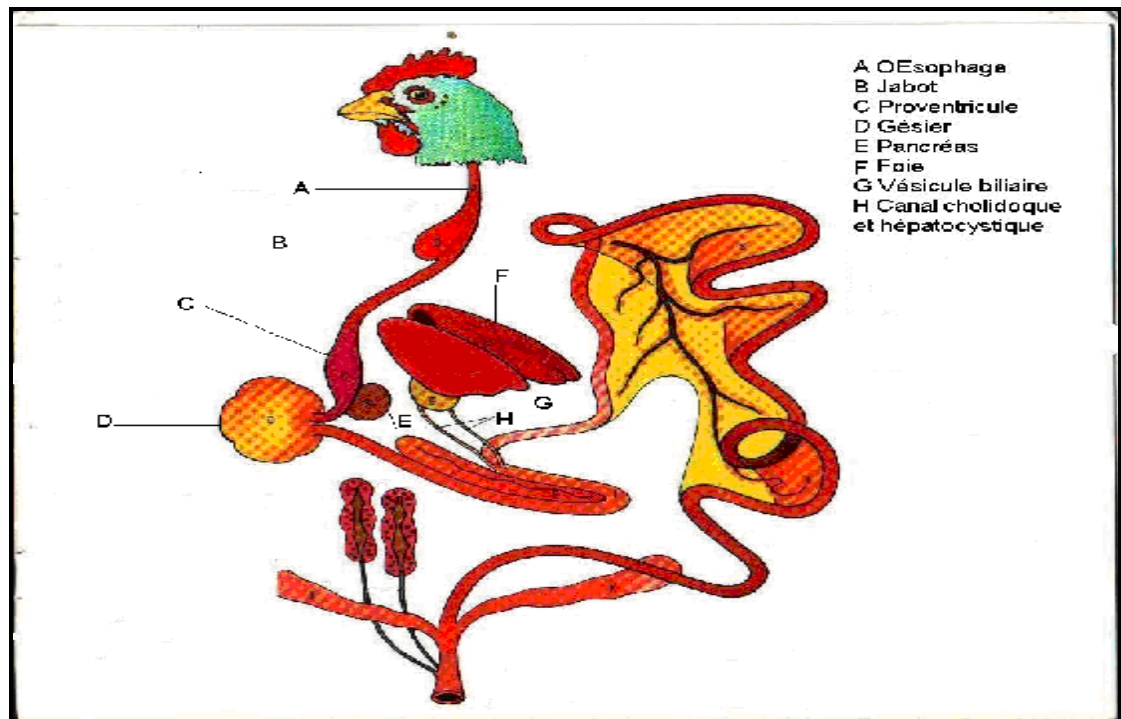


Figure 4 : Appareil digestif du poulet (ALAMAREOT, 1982).

2-2. Protéases d'origine végétale

Il existe plusieurs préparations coagulantes provenant du règne végétal. Elles sont extraites par macération de divers organes de plantes supérieures. Parmi les espèces connues on peut citer le gaillet, l'artichaut, le chardon qui ont été utilisés jadis dans des fabrications de fromages fermiers au Portugal et en Espagne (RAO *et al.*, 1998 ; SOUSA et MALCATA, 2001 ; SILVA et MALKATA, 2005). D'autres extraits coagulants ont été obtenus à partir de plantes tropicale ; les plus connus sont la ficine ; extraite du latex de figuier, la papaïne ;

extraite des feuilles de papayer, la bromélaïne ; extraite de l'ananas. Ces protéases contrairement aux autres enzymes coagulants appartiennent au groupe de protéases sulphydryls (RAO *et al.*, 1998 ; YAMAMOTO, 1975). D'une manière générale, ces diverses préparations végétales ont donné des résultats assez décevants en fromagerie car elles possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée qui induit des pertes dans le rendement fromager et le développement de goût amère au cours de l'affinage. Ces difficultés résultent de la composition particulière de ces extraits, qui renferment des enzymes à site actif peu spécifique et /ou des systèmes enzymatiques dont il est difficile de maîtriser l'activité. Toutefois, la purification des extraits de ficine a pu être réalisée et des fromages corrects ont été fabriqués à l'aide de ces préparations purifiées (RAMET, 1997). Cependant, le coût élevé de la collecte de la matière première et celui de la purification restent un facteur limitant à leur utilisation.

2-3. Protéases d'origine microbienne

2-3-1. Protéases d'origine bactérienne

De multiples espèces de bactéries ont été étudiées notamment dans les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* tels que *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans*. Les résultats ont été en général décevants en raison de l'activité protéolytique généralement très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure. La protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière. Du cheddar préparé par la protéase de *Bacillus subtilis* présentait une saveur acceptable ; cependant, le rendement était très faible suite à une protéolyse excessive (ERNSTROM et WONGT, 1983 ; RAMET, 1997).

2-3-2. Protéases d'origine fongique

Les enzymes d'origine fongique, contrairement à celles d'origine bactérienne, ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure; les préparations commerciales employées actuellement proviennent de trois genres de moisissures; *Cryphonectria parasitica*, *Rhizomucor pusillus* et *Rhizomucor Miehei*. (RAO *et al.*, 1998). La protéase de *Cryphonectria parasitica* a été étudiée et testée dans plusieurs types de fromage. Elle a donné des résultats variables. Elle paraît être plus protéolytique que la présure durant la phase de coagulation du cheddar (EMMONS *et al.*, 1990). En outre, de

l'amertume a caractérisé du cheddar préparé par cette protéase (KIM *et al.*, 2004). Toutefois, l'emploi de ces protéases dans certains types de fromage tels que l'emmental a donné un fromage d'excellente qualité. En effet, ce type de fromage subit une cuisson à des températures élevées (51,7-54,4 °C) (RICHARDSON, 1975). Ce traitement thermique provoque probablement la destruction de l'activité protéolytique de ces enzymes, ce qui supprime, ainsi, leur effet au cours de l'affinage.

La protéase de *Rhisomucor pusillus* possède une activité protéolytique sur les caséines la plus faible comparée aux autres protéases d'origine fongiques (BARBANO et RASMUSSEN, 1992 ; EMMONS *et al.*, 1990). Son emploi comme substitut de la présure, dans la fabrication de certaines variétés de fromage, a donné des résultats satisfaisants. Une légère amertume est relevée dans le cheddar fabriqué par cette protéase et seulement après 14 mois de stockage. Cependant, elle est plus protéolytique que la chymosine (RICHARDSON, 1975).

Comparée à la présure, la protéase de *Rhisomucor miehei* a donné un rendement et une qualité de fromage similaires, lors de la fabrication l'emmental. Aucun développement de l'amertume n'a été observé (RICHARDSON, 1975). Toutefois, comparé à la présure des pertes de matière grasse et de protéine, dans le lactosérum, plus importantes, sont relevées lors de la préparation du cheddar avec les protéases de *Cryphonectria parasitica* et de *Rhisomucro miehei* (EMMONS *et al.*, 1990 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992).

3. SPECIFICITE ET MECANISME REACTIONNEL DES ENZYMES COAGULANTS

Les enzymes coagulants du lait traités ci-dessus, à l'exception des protéases de plantes tropicales, appartiennent tous au groupe des protéases acides. La différence majeure entre les protéases gastriques et microbiennes est que les premières sont sécrétées sous forme de zymogènes inactifs. Les protéases microbiennes sont produites sous une forme active (DALGLEISH, 1997). Quoiqu'elles dérivent d'espèces différentes elles paraissent partager plusieurs caractéristiques telles que la structure primaire, la structure tridimensionnelle et l'activité catalytique (RAO *et al.*, 1998 ; ERSKINE *et al.*, 2003). Pour le lait, leur activité augmente lorsque le pH est abaissé au dessous du pH naturel du lait. Le pH optimum acide est dû à la présence de deux résidus catalytiques asparyls qui sont essentiels pour l'activité, Asp-

32 et Asp-215 (séquence dans la pepsine porcine) (SEPULVEDA *et al.*, 1975). L'un d'eux est protoné et l'autre est ionisé (ANDREEVA et RUMSH, 2001 ; ERSKINE *et al.*, 2003).

Les différentes protéases présentent une grande homologie dans la séquence en acides aminés. Les structures tridimensionnelles des protéases semblent être semblables. Les études par cristallographie des rayons X montrent que ces enzymes ont une structure composée de deux lobes séparés par une fente profonde, chaque lobe apporte l'un des résidus aspartiques essentiels. Les deux lobes montrent une grande homologie au niveau de la structure tridimensionnelle qui est préservée dans la plupart des protéases aspartiques, bien qu'ils présentent une séquence en acides aminés différentes (RAO *et al.*, 1998 ; ERSKINE *et al.*, 2003). Cette structure complexe assure l'approche étroite des deux résidus aspartyls, qui dans l'ordre de peptide sont séparés par environ 183 résidus (RAO *et al.*, 1998 ; ERSKINE *et al.*, 2003). Les deux résidus Aspartyls catalytiques sont contenus dans une séquence composée de Asp-Thr-Gly-Xaa. liée aux parties N-terminal et C-terminal des deux lobes de la protéase, avec X-aa ; Ser et Thr (RAO *et al.*, 1998 ; ANDREEVA et RUMSH, 2001). Ces protéases présentent la spécificité d'hydrolyser les peptides composées de moins six résidus d'acides aminés ; l'hydrolyse se produit préférentiellement entre deux résidus hydrophobes d'acide aminé du substrat (ERSKINE *et al.*, 2003).

4. ACTION DES ENZYMES COAGULANTS SUR LES CASEINES

Le site principal pour la réaction de coagulation est la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caséine κ . D'une manière générale, les principales protéases utilisées pour la coagulation du lait hydrolysent la même liaison peptidique, Phe₁₀₅-Met₁₀₆, à l'exception de la protéase de *Cryphonectria parasitica* qui hydrolyse la liaison Ser₁₀₄-Phe₁₀₅ (LUCEY, 2002). Toutefois, l'attaque d'autres sites dans la caséine κ , la caséine α_s et β se produit et elle est généralement indésirable. Cette action est souvent qualifiée d'action protéolytique générale ou non-spécifique. Les protéases acides utilisées en fromagerie bien qu'elles présentent généralement une grande spécificité dans leur action, exercent une activité protéolytique non spécifique. Cependant, l'extension de la protéolyse diffère d'une enzyme à une autre. La chymosine est la protéase qui donne le minimum de protéolyse, L'attaque de la caséine β et de la caséine α_{s1} par la chymosine est plus lent que l'attaque spécifique de la caséine κ par un facteur d'environ 100 (DALGLEISH, 1982). Ainsi de telle action se produit avec une vitesse minimale au cours de la coagulation.

Les substituts de la présure sont généralement choisis par rapport à leur activité coagulante élevée (l'attaque rapide de la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆) combinée à une activité protéolytique générale limitée. Une activité protéolytique non-spécifique élevée au cours de la coagulation peut donner naissance à des peptides qui seront perdus en solution provoquant la diminution du rendement fromager.

D'une manière générale la majorité des enzymes coagulants montre une activité protéolytique plus importante que la chymosine lorsque la caséine est prise comme substrat. Cependant les différences sont moins évidentes lorsqu'elles sont comparées dans le lait écrémé ou durant la fabrication du fromage. Toutefois, il a été démontré que la plupart des enzymes coagulants provoquent des pertes dans le rendement comparés à la présure (Tableau 4) (EMMONS et BINNS, 1990 ; EMMONS *et al.*, 1990 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992).

L'activité protéolytique durant l'affinage du fromage, due à la quantité d'enzyme retenue par le caillé, joue un rôle essentiel dans la dégradation des caséines (WILKINSON et KILCAWLEY, 2004 ; PARK, 2001).

Tableau 4: Perte en matière grasse et en protéines au cours de la phase de coagulation enzymatique du lait ; Comparaison entre enzymes coagulants.

protéases employée	Perte au cours de la coagulation	
	matière grasse	Protéine
Chymosine ^{d,c}	+	+
Pepsine bovine ^{d,c}	++	+
Pepsine porcine ^a	-	-
Pepsine de poulet ^b	/	++
<i>Rhizomucor pusillus</i> ^{d,c}	+++	+++
<i>Rhizomucor miehei</i> ^{d,c}	+++	++++
<i>Cryphonectria parasitica</i> ^{d,c}	/	+++++

(^a GREEN et FOSTER, 1974 ; ^b GREEN *et al.*, 1984b.; ^c EMMONS *et al.*, 1990 ; ^d BARBANO et RASMUSSEN, 1992).

La quantité d'enzyme retenue par le gel est influencée par la température de coupe du coagulum, et du pH au cours du drainage du lactosérum. En effet, l'abaissement du pH augmente le taux d'adsorption de la chymosine sur les micelle de caséine (LARSSON *et al.*,

1997). Toutefois, le taux retenu pour les protéases fongique ne semble pas influencé par l'abaissement du pH (RAMET, 1997) (Tableau 5). Cependant, lorsque la coupe est réalisée à des valeurs de pH plus élevées, les pepsines qui sont plus sensibles à la dénaturation par le pH que la chymosine se trouvent inhibées; c'est le cas de la pepsine porcine (GREEN et FOSTER, 1974 ; SOUSA *et al.*, 2001).

Tableau 5 : Activité coagulante retrouvée (exprimée en % de l'activité initiale ajoutée au lait) dans le coagulum après acidification à différentes valeurs du pH, (RAMET, 1997).

pH	Activité résiduelle (en % de l'activité initiale)		
	Présure	<i>Rhisomucor pusillus</i>	<i>Rhisomucor miehei</i>
5,2	83	11	19
6,0	70	12	19
6,4	47	13	18
6,6	30	14	19

L'activité résiduelle est également liée à la stabilité thermique de l'enzyme coagulant employé. L'activité résiduelle de la chymosine dans les fromages à pâte cuite, tel que l'emmental, est très réduite (HYNES *et al.*, 2001). La pepsine porcine tend à être la plus sensible au chauffage. La protéase de *Cryphonectria parasitica*, pepsine bovine, chymosine, *Rhisomucor pusillus* et *Rhisomucor miehei* montrent une stabilité meilleure dans l'ordre croissant de la stabilité thermique (SOUSA *et al.*, 2001).

D'autre part, le taux d'hydrolyse des fractions caséiniques, au cours de l'affinage, dépend fortement du taux d'enzyme coagulant employé (HYNES *et al.*, 2001 ; DAVE, *et al.*, 2003a).

La caséine β est hydrolysée par la chymosine au niveau de la liaison Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ (TRIJILLO *et al.*, 2000). Alors que La caséine α_{s1} est hydrolysée au niveau des liaisons Phe₂₃-Phe₂₄ ou bien Phe₂₄-Val₂₅ (HYNES, *et al.*, 2001 ; DAVE *et al.*, 2003b). L'hydrolyse de la caséine α_{s1} par la chymosine est beaucoup plus rapide que celle de la caséine β . Les produits d'hydrolyse de la caséine β par la chymosine sont très amers. Ce sont des peptides libérées de la partie C-terminal de la caséines β ; β (193-209) et β (193-207 ou bien 208). Cependant, les produits d'hydrolyse de la caséine α_{s1} ne produisent aucune amertume (ERNSTROM et WONGT, 1983 ; KIM *et al.*, 2004).

La formation du goût amère est due à l'action successive des enzymes coagulants et des protéases microbiens des cultures employées dans l'affinage, sur les caséines. En effet, il y a formation de peptides de taille moyenne sous l'action des enzymes coagulants. Ces peptides sont ensuite hydrolysés à leur tour par les protéases microbiennes en peptides de bas

poids moléculaire, responsables d'amertume (O'KEEFFE *et al.*, 1978 ; SOUSA *et al.*, 2001). La majorité des enzymes coagulants employés présentent la même spécificité que la chymosine au niveau de la caséine α et la caséine β en attaquant les mêmes liaisons précédemment citées ; cependant, avec une vitesse d'action variable. La pepsine bovine et la protéase de *Rhizomucor miehei* hydrolysent la caséine β plus lentement que la chymosine, alors que la protéase de *Cryphonectria parasitica* et celle de *Cyanara cardunculus* montrent la plus grande activité protéolytique en attaquant plus rapidement la caséine β (BARBANO et RASMUSSEN, 1992, EMMONS *et al.*, 1990 ; TRUJILLO *et al.*, 2000,). La pepsine de poulet semble attaquer plus rapidement la caséine β comparée à la présure. Du cheddar préparé à l'aide de pepsine de poulet a montré un taux de protéolyse et d'amertume plus élevé que celui préparé par la présure (GREEN *et al.*, 1984). Cependant, l'utilisation de la pepsine de poulet dans la fabrication de certains fromages à pâte cuite tels que Emmental et Kashkaval a donné des résultats satisfaisants (GORDIN et ROSENTAL, 1978). En effet, ces fromages ont présenté une qualité comparable à celle de fromage de même type préparé avec la présure. Cela est due probablement au fait que la quantité d'enzyme résiduelle maintenue par le coagulum a été détruite par le chauffage au cours de l'étape de cuisson. Ceci indique la possibilité de l'emploi de la pepsine de poulet dans la fabrication de fromages à pâte cuite. Son emploi pour les fromages à pâte fraîche, qui ne subissent pas d'affinage, semble également possible du fait que la protéolyse au cours de cette étape est évitée. D'autre part, la dégradation de la caséine β par les enzymes coagulants dans le fromage est fortement affectée par le contenu en sel. L'hydrolyse de la caséine β est considérablement réduite à 5% de NaCl et complètement inhibée à 10% de NaCl. En effet, les fromages non salés contiennent moins de caséine β intacte. Les fragments C-terminal de la caséine β qui sont reconnus être amères ont été mis en évidence dans les fromages non salés préparés par la chymosine (SOUSA *et al.*, 2001).

5 EXTRACTION DES PROTEASES GASTRIQUES (PEPsINE ET CHYMOsINE)

Les différentes méthodes employées pour l'extraction d'enzymes gastriques sont comparables. Généralement, l'extraction se fait par macération dans une solution saline pendant une durée donnée ou bien par homogénéisation ; ce qui est plus rapide (ANTONINI et RIBADEAU DUMAS, 1971 ; TAGEYAMA et TAKAHASHI, 1976 ; BOHAK, 1970 ; HAARD *et al.*, 1982). L'extraction par digestion dans un milieu acide est également réalisée (ERNSTROM et WONGT, 1983 ; CUVELLIER, 1993).

A l'échelle industrielle, la présure était extraite par macération de fragments de caillettes, préalablement gonflées et séchées au soleil, dans une saumure à 10% de sel commun, additionné d'antiseptique en faible quantité (acide borique, thymol, acide benzoïque, etc.). La macération qui dure de plusieurs heures à quelques jours est réalisée à des températures allant de 25 à 38 °C, le pH est ajusté à 5,0-5,5 pour favoriser l'activation des proenzymes (ALAIS, 1974 ; ANIFANTAKIS et GREEN, 1980 ; RAMET, 1997). Le jus brut est filtré puis clarifié par addition d'alun de potasse. L'extrait obtenu est généralement jaune d'or. Actuellement, la présure est extraite, principalement à partir de caillettes congelées, qui sont broyées et macérées dans une solution saline (3-10% de NaCl). L'activation des proenzymes est réalisée par maintien du pH à 2,0 pendant 1h. Après ajustement du pH de 2,0 à 5,5, l'extrait brut est filtré et concentré par précipitation à l'NaCl (ANDEAN, 2002).

La pepsine porcine est extraite par autodigestion des muqueuses gastriques de porc, raclées et broyées, au moyen d'eau acidifiée par l'acide chlorhydrique en présence de chloroforme. Après filtration, la concentration est exécutée dans un lyophilisateur. La pepsine purifiée est une poudre blanchâtre soluble dans l'eau. (ERNSTROM et WONGT, 1983 ; CUVELLIER, 1993).

La pepsine de poulet a été extraite à partir de proventricules selon un procédé d'extraction assez simple qui consiste en une macération dans une solution saline. L'extrait obtenu est filtré, acidifié pour activer l'enzyme et centrifugé. Le surnageant est en suite concentré par saturation à l'NaCl. La pepsine brute précipitée est collectée par centrifugation et lyophilisée (BOHAK, 1970).

8- CONSERVATION DES ENZYMES COAGULANTS

Les différents enzymes coagulants du lait montrent une stabilité variable en solution et qui est fortement influencée par le pH et la température de conservation. La présure est très vulnérable en solution, à pH 7,3 son activité coagulante est réduite alors qu'à pH 8,0 la présure est inactivée irréversiblement (ALAIS, 1974). La perte d'activité de la chymosine est importante, en solution, aux pH supérieurs à 6,3. Une zone d'instabilité proche du pH 3,5 est, également, notée (FOLTMANN, 1971). Cela est peut être du à une autolyse du fait que cette zone de pH s'approche du pH optimum de l'activité protéolytique de la chymosine (ALAIS,

1974). La stabilité est bonne entre 5,3 et 6,3 ; elle décroît rapidement au-dessus de pH 6,5. La perte d'activité de la chymosine aux pH supérieurs à 7,0 est due à l'effet combiné de l'autolyse et du milieu basique. En effet, dans le milieu alcalin, la molécule de chymosine subit un dépliement, rendant la molécule facilement accessible à l'action d'une faible quantité d'activité protéolytique encore présente à pH 7,0 (FOLTMANN, 1971). A l'état sec, la présure présente une bonne stabilité. La présure en poudre commerciale est obtenue par relargage au sel de l'extrait de présure, suivi par un séchage dans une ambiance tiède (moins de 50 °C) (ALAIS, 1974 ; ENDREN, 2002). L'activité est réglée à une force de 1:100.000 ou au 1: 150.000 par addition d'une substance pulvérulente, sel commun, lactose, amidon. La perte d'activité est faible lorsque la déshydratation est réalisée par lyophilisation. Cependant, l'opération est très coûteuse pour ce genre de produit. Le séchage par atomisation est également réalisé. L'addition de sucre ordinaire réduit considérablement la perte en activité qui peut devenir nulle à 10-20% de sucre (ALAIS, 1974). L'effet stabilisateur des sucres (lactose, maltose, saccharose, tréhalose,...) au cours de la lyophilisation et du séchage résulte d'une protection de la structure native des protéines d'une manière générale (IZUTSU, AOYAGI et KOJIMA, 2004 ; VASILJEVIC et JELEN, 2003).

La stabilité de la pepsine de poulet aux valeurs de pH proches de 8,5 est fortement influencée par la température, la pepsine de poulet retient 93% de son activité à pH 8,2 pendant 20 min à température ambiante (24 ± 2 °C) et seulement 10% de son activité à 37 °C. Une solution de pepsine de poulet à pH 7,8 perd 10% de son activité après 24 heures à température ambiante et environ 10% par heure à 37 °C (BOHAK, 1969). L'inactivation de la pepsine de poulet à 40°C et à pH 8,5 est accompagnée par son autolyse. La lyophilisation d'un 'extrait clarifié de pepsine de poulet entraîne une perte d'activité d'environ 45% (BOHAK, 1969). A pH 6,9, conservée dans du tampon phosphate, la pepsine de poulet a montré une bonne stabilité que ce soit à l'état congelé ou bien réfrigéré. Les préparations de pepsinogène sont stables à pH 7,5, dans du tampon Tris, soit réfrigérées ou congelées (DONTA et VAN VINAKIS, 1970).

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIELS ET METHODES

1. MATIERES PREMIERES ET PRODUITS BIOLOGIQUES

1-1. Les proventricules

Les proventricules ont été prélevés, au niveau de "l'abattoir KHALED", Wilaya de Constantine, 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. La matière grasse couvrant le proventricule est complètement éliminée. Les proventricules sont ouverts par incision longitudinale et rincés à l'eau courante pour éliminer les particules d'aliments adhérentes. Les proventricules sont laissés s'égoutter puis transportés au laboratoire dans une glacière. Le temps nécessaire pour récupérer 1000g de proventricules est en moyenne de 1h alors que le temps suffisant pour l'élimination du gras et le rinçage est de 1h 30min pour la même quantité.

Une fois arrivés au laboratoire, les proventricules sont répartis, dans du papier aluminium, en lots de 100g (13 à 14 proventricules) et conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Le poids unitaire des proventricules varie entre 5,3 g à 12,7 g avec une moyenne de 7,7 g.

1-2. Le lait

Le lait employé dans notre travail est du lait écrémé en poudre, moyenne température (CLOVER ESTCOURT ; Afrique du sud). Le lait est reconstitué selon la méthode de Berridge par dissolution de 12g de poudre de lait écrémé dans 100ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M. Le lait écrémé ainsi reconstitué est appelé substrat de Berridge. Pour éviter le développement microbien, 0,04% (p/v) d'azide de sodium est ajouté au lait reconstitué. Le lait est stocké à 4°C pendant 12h avant utilisation.

1-3. La présure

L'enzyme coagulant de référence utilisé dans notre travail est de la présure en poudre, de force 1/100000 (MARSCHALLTM ; Rhodia food, France). Selon la fiche technique de

Rhodia food, elle présente les caractéristiques suivantes : niveau de chymosine > 75%, niveau de pepsine bovine < 25% et concentration en chymosine active $\geq 4000\text{mg/kg}$.

2. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

2-1. Mesure du pH

Le pH est mesuré par l'emploi d'un pH-mètre (Calimatic 766).

2-1-1. Mesure du pH du lait

Après chaque reconstitution du lait, et repos pendant 12h à 4°C, le pH du lait est mesuré avant utilisation.

2-1-2. Mesure du pH des extraits de pepsine de poulet

La mesure du pH des extraits enzymatiques et son ajustement lorsque c'est nécessaire sont réalisés durant toutes les étapes d'extraction, concentration, lyophilisation et séchage.

2-2. Détermination de l'acidité du lait

L'acidité du lait reconstitué employé est déterminée dans le but de le caractériser. L'acidité est mesurée par dosage de l'acide lactique à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N. La phénolphtaléine indique la limite de neutralisation par changement de couleur (de l'incolore au rose pale). L'acidité du lait est exprimée en degré Dornic (°D) où : 1°D représente 0,1g d'acide lactique dans un litre de lait (FAO, 1989).

2-3. Détermination de l'extrait sec total

L'extrait sec total est déterminé pour la poudre de lait écrémé employée, le substrat de Berridge, les différents extraits enzymatiques obtenus à partir du proventricule de poulet et finalement pour la poudre de pepsine obtenue par lyophilisation et séchage. L'extrait sec de

ces produits est déterminé dans le but d'une caractérisation. En outre, pour le substrat de Berridge, la mesure de l'extrait sec permet de vérifier si il y'a eu erreur de reconstitution.

L'extrait sec total est déterminé à l'aide d'un dessiccateur infrarouge (PRICISA HA60). Le principe consiste à éliminer l'humidité contenue dans l'échantillon par séchage grâce à l'émission de radiations infrarouges et à contrôler en continu le poids à l'aide d'une balance intégrée. Le pourcentage d'humidité ou de solide est calculé par la différence entre le poids initial et le poids sec final. La dessiccation est réalisée à 105°C pour les différents échantillons traités. Le taux d'extrait sec des différents échantillons traités est donné par la moyenne de quatre déterminations suivie par l'écart type. L'extrait sec total est exprimé en gramme de matière sèche pour cent gramme d'une base humide. La valeur est lue directement sur l'humidimètre.

2-4. Détermination des matières azotées totales du lait

Dans le but de caractériser la poudre de lait écrémé employée, sa teneur en matières azotées totales est déterminée. En outre le taux des matières azotées totales du lait est utilisé dans l'expression des résultats de la protéolyse comme indiqué ci-dessous.

La teneur en protéines du lait est déterminée par dosage de l'azote selon la méthode kjeldahl. Le principe est basé sur la transformation de l'azote organique en azote minéral par destruction de la matière organique sous l'effet de l'acide sulfurique concentré. L'azote minéral présent sous forme de sulfate d'ammonium est déplacé sous forme d'ammoniac par une solution d'hydroxyde de sodium puis entraîné par la vapeur d'eau. L'ammoniac est piégé dans une solution d'acide borique et finalement titré par une solution d'acide sulfurique de normalité connue. Le coefficient de 6,38 permet la transformation de la quantité d'azote déterminée en poids de protéine (GUILLOU *et al.*, 1986 ; EMMONS et BECKETT, 1990 ; BARBANO et RASMISSEN, 1992). La digestion et l'entraînement à la vapeur ont été réalisés dans un digesteur et un distillateur de marque BUCHI (Digesteur K424, distillateur d'azote automatique 339).

La teneur en matière azotées totales est déterminée à partir de 0,5g de poudre de lait écrémé et sur 5 ml de lait reconstitué. Le taux déterminé est donné par la moyenne de trois déterminations. La teneur en matières azotés totales du lait est exprimée en gramme de

matière azotées totales pour cent grammes de poudre de lait écrémé et en gramme de matière azotées totales pour 100 ml de lait reconstitué.

2-5. Détermination de la teneur en protéines de l'extrait de pepsine

La teneur en protéines des extraits enzymatiques est mesurée afin de déterminer le taux de protéines récupérées durant les différentes étapes d'extraction et aussi après concentration. La comparaison du taux de protéines obtenu avec l'activité enzymatique permet d'étudier l'effet des différentes opérations réalisées. Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de LOWRY (LOWRY *et al*, 1951). Le principe repose sur le développement d'une coloration bleue foncée suite à l'addition à la solution protéique d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungstomolybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine. Les espèces réduites absorbent la lumière à 750nm. Le dosage des protéines est réalisé par l'emploi d'un spectrophotomètre visible (PRIM, SECOMAM). La concentration en protéines de l'échantillon analysé est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en employant de l'albumine sérique bovine (BSA) (SIGMA, Allemagne) (Figure 5). Le taux de protéines mesuré pour chaque échantillon traité est la moyenne de quatre déterminations. La teneur en protéines est exprimée en milligramme de protéines par millilitre d'extrait enzymatique.

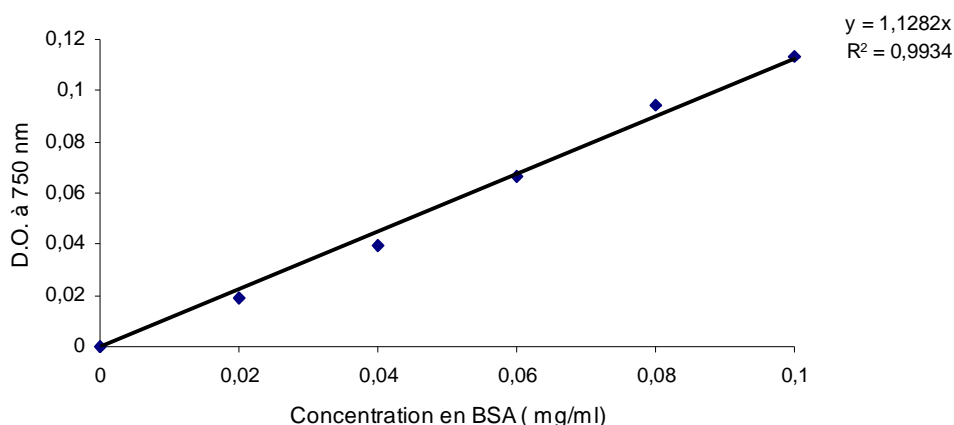


Figure 5 : courbe étalon pour le dosage des protéines selon la méthode de LOWRY

2-6. Dosage de la pepsine de poulet

Dans le but de mesurer la quantité de pepsine de poulet contenue dans les extraits enzymatiques nous avons appliqué une méthode dans laquelle l'hémoglobine est employée comme substrat. Le principe de la méthode repose sur le fait que la pepsine de poulet hydrolyse l'hémoglobine dénaturée par acidification et le degré d'hydrolyse sous des conditions déterminées est une mesure de la quantité d'enzyme présent. La digestion de l'hémoglobine est effectuée à 37°C pendant 10 min dans un volume total du mélange réactionnel de 6 ml contenant 0,1g d'hémoglobine (SIGMA, Allemagne). La réaction est suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm des produits d'hydrolyse solubles dans l'acide trichloracétique. Une unité pepsine est définie comme étant la quantité d'enzyme qui provoque, dans les conditions de l'essai, une augmentation de l'absorbance à 280 nm de 0,001 par minute, contre un échantillon à blanc (BOHAK, 1969). Ce dernier est préparé en introduisant avec la solution d'hémoglobine l'acide trichloracétique avant l'addition de l'extrait enzymatique pour stopper la réaction d'hydrolyse. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à 280 nm (ULTROSPEC PLUS 4054, BIOCROM)

La teneur en pepsine d'un extrait enzymatique donnée est exprimée en unité pepsine par millilitre d'extrait et calculée comme :

$$UP / ml = \frac{A_{280E} - A_{280\text{ blanc}}}{(0.001 \times 10 \times V)}$$

où

UP = Unité pepsine

A_{280E} et $A_{280\text{ blanc}}$ = absorbances mesurées de l'échantillon et du blanc respectivement.

Le facteur 10 correspond à la durée de l'hydrolyse et qui est de 10 min.

V ; volume en millilitre de l'extrait enzymatique utilisé dans l'essai

L'activité spécifique de l'extrait enzymatique est également calculée. Elle est définie comme étant le nombre d'unités pepsine par mg de protéines (UP/mg prot.). Le taux de protéines des extraits de pepsine est mesuré par la méthode de LOWRY comme décrit ci-dessus.

Le dosage de la pepsine est réalisé pour les différents échantillons d'extrait brut, d'extrait clarifié et d'extrait concentré. La valeur obtenue par échantillon est la moyenne de trois essais répétés dans les mêmes conditions suivie de son écart type

3. EXTRACTION DE LA PEPSINE DE POULET ET APPRECIATION DU DIAGRAMME PROPOSE

3-1. Présentation du diagramme appliqué

L'extraction a été faite selon la méthode de Bohak (1970) qui se compose des étapes montrées sur le diagramme présenté en figure 6.

Une solution de macération à 30g/l de NaCl et 7g/l de NaHCO₃ est employée à raison de 300l/100g de proventricules broyés (broyeur à couteaux de marque Grindomix Retsch GM 100). Après macération pendant trois heures, le pepsinogène contenu dans l'extrait brut (filtrat) est converti en enzyme actif en abaissant le pH à 2,0 par addition d'HCl 3N. L'extrait est maintenu pendant 15 min à 25°C. Cette opération provoque, en outre, la floculation du mucilage ; ce qui facilite par la suite, la clarification.

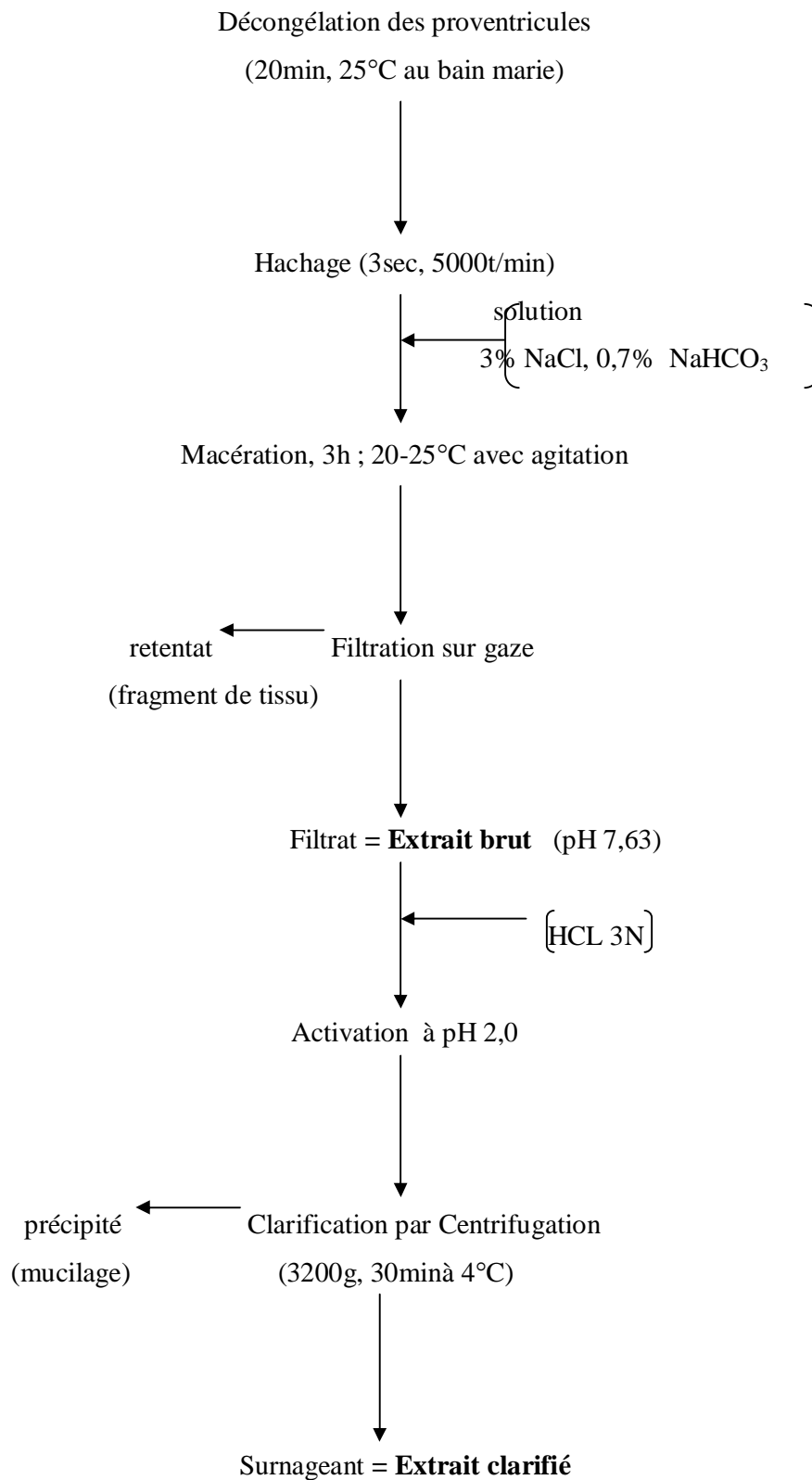


Figure n 6 : Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet selon BOHAK, 1970

L'extrait brut maintenu à pH 2,0 est finalement centrifugé à 3200g pendant 30min à 4 °C dans une centrifugeuse réfrigérée (Centrikon T42K) afin d'éliminer le mucilage et les fragments de tissus. Le surnageant contenant la pepsine est rapidement récupéré; il constitue l'extrait clarifié alors que le précipité est éliminé.

Le rendement d'extraction est exprimé en unité d'activité coagulante et en unité d'activité peptique par gramme de proventricule.

3-2. Etude de l'Effet de la durée d'activation sur le taux de pepsine activé

Le temps d'activation du pepsinogène et du prochymosine varie, selon les auteurs, entre 10 min à 60min à température ambiante lorsque l'activation est effectuée à pH 2,0 (FOLTMANN, 1971 ; GREEN *et al.*, 1984 ; ANIFANTAQUIS et GREEN, 1981 , ANDREN, 2002). Ainsi afin de fixer la durée optimale d'activation du pepsinogène, l'extrait brut obtenu à la fin de la macération est maintenu à pH 2,0 pendant 60min. Durant l'activation, une partie aliquote est prélevée tous les 15 min et la quantité de pepsine activée est déterminée par mesure de l'activité coagulante. La valeur déterminée pour chaque intervalle est la moyenne de quatre essais. Il faut souligner que le temps d'activation indiqué dans le protocole de base est de 15min.

3-3. Suivre de l'activité coagulante au cours de la macération

En vue de déterminer l'évolution du taux de pepsine extrait au cours de la macération un échantillon d'extrait brut est prélevé tous les 30min pendant 5 h de macération et la quantité de pepsine présente est évaluée par mesure de l'activité coagulante. Le pepsinogène est préalablement activé en enzyme actif comme décrit ci-dessus. La durée de la macération est prolongée jusqu'à 5h afin de déterminer si le temps indiqué dans le protocole adopté était suffisant pour extraire le maximum de pepsine présent dans les fragments de proventricules. L'activité coagulante déterminée pour chaque intervalle est la moyenne de quatre essais.

3-4. Etude de l'influence de la clarification sur le taux de pepsine récupéré

La clarification de l'extrait brut, suivant le protocole de base est réalisée par centrifugation à 3200 g de l'extrait brut pendant 30 min et à 4 °C. Durant cette opération l'extrait est maintenu à pH 2,0 pour l'activation. La quantité de pepsine que nous avons récupérée après clarification, sous ces conditions, semble ne représenter qu'environ 50 % de celle de l'extrait initial. Cette perte est peut être du à l'effet de la centrifugation au bien à l'effet de la rétention d'une quantité d'enzyme dans les flocons de mucilage formé suite à l'abaissement du pH au cours de l'activation. Ainsi afin d'étudier l'effet de ces deux facteurs sur le taux d'enzyme récupéré nous avons effectué les essais suivants :

1. centrifugation de l'extrait brut activé à pH 2,0 avec ou sans ajustement du pH à 6,3 afin de mettre en évidence l'effet de l'abaissement du pH sur la perte en enzyme ;
2. filtration de l'extrait brut activé à pH 2,0, sur papier filtre (papier filtre blanc, standard) avec ou sans ajustement du pH à 6,3 afin de mettre en évidence l'effet de la centrifugation sur la perte d'activité. Cela permet, en outre, de tester la possibilité de remplacer la centrifugation par la filtration.

L'effet de ces facteurs est estimé par mesure de l'activité coagulante présente dans le surnageant récupéré après centrifugation et celle présente dans le filtrat pour chaque essai.

4. ETUDE DES PROPRIETES COAGULANTES DE L'EXTRAIT DE PEPSINE

4-1. Estimation 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 employé 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 de Berridge (1955). 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 (BERRIDGE, 1955 ; GORDIN et ROSENTHAL, 1978 ; FOLTMANN, 1971 ; FEDERICI, 1982).

Les extraits enzymatiques utilisées sont dilués de telles sorte que la floculation visible à l'œil apparaît entre 7 à 8min. Le pH des extraits étudiés est préalablement ajusté à 6,3.

L' "unité d'activité coagulante" (U.A.C.) ou "unité présure" (U.P.) est définie comme étant la quantité d'enzyme par millilitre d'extrait enzymatique qui provoque la floculation de 10 ml de substrat en 100 sec à 30 °C (BERRIDGE, 1955 ; ALLAIS, 1974 ; RAMET, 1997) et elle est calculée comme :

$$\text{U.A.C. /ml} = \frac{100 \times V}{10 \times T \times V'}$$

Où

V : Volume du lait en ml

T : temps de floculation en secondes

V' : volume de la solution enzymatique en ml.

100 : 100 sec

10 : 10ml du substrat

Les différents extraits enzymatiques obtenus ainsi que la poudre de pepsine lyophilisée et séchée sont caractérisés par mesure de leur activité coagulante.

L'activité coagulante, donnée en U.A.C/ml, pour un même échantillon est exprimée par la moyenne arithmétique de quatre essais répétés.

L'activité coagulante est également exprimée par la force qui est déterminée par mesure du temps de floculation sur le même substrat à 35 °C, l'extrait enzymatique testé est dilué pour donner un temps de floculation entre 1 et 3 minutes (ALAIS, 1974 ; AMOURACHE et VAYAI AKSHMI, 1984). La force ou l'unité soxhlet correspond au nombre d'unités de poids ou de volumes de lait coagulable en 40 min par une unité de poids ou de volume de préparation enzymatique à 35 °C et elle est calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Force} = \frac{2400 \times V}{T \times V'}$$

Où

2400 = 40min × 60sec

V = volume du lait en ml

V' = volume de l'extrait enzymatique en ml

T = temps de floculation en secondes

En pratique, la force est exprimée par le rapport du volume en litre de l'extrait enzymatique à celui du lait coagulé. Ainsi, un extrait de force 1/10 000 signifie qu'un litre de l'extrait enzymatique provoque la coagulation de 10 000 litres de lait à 35 °C pendant 40 min (ALAIS, 1974). Pour les enzymes en poudre, la force est exprimée en kg de poudre par le volume de lait coagulé en litre.

La force est déterminée pour les extraits bruts, clarifiés, concentrés et pour la poudre de pepsine lyophilisée et séchée. La force mesurée pour un même échantillon est la moyenne issue de quatre essais répétés.

4-2. Appréciation de l'effet du pH du lait

Afin d'étudier l'effet du pH sur l'activité coagulante de la pepsine de poulet, le pH du lait (substrat de Berridge) est ajusté aux valeurs suivantes: 5,8 ; 6,0 ; 6,2 ; 6,4 ; 6,6 ; 6,8 ; 7,0 (FEDERICI, 1982 ; GREEN *et al.*, 1984) Le pH est ajusté par addition d'une solution d'HCl ou de NaOH 1N. Le choix de cet intervalle de pH est basé sur le fait qu'à des valeurs de pH inférieur à 5,8 la coagulation peut devenir une coagulation acide. L'augmentation du pH à des valeurs supérieures à 7,0 peut provoquer l'inactivation de la protéase employée, en outre, la coagulation du lait, en fromagerie, est réalisée est des pH inférieurs à 7,0.

L'activité coagulante est mesurée pour chaque valeur de pH (en U.A.C/ml). La valeur de chaque activité coagulante correspond à la moyenne de trois essais. L'effet du pH sur l'activité coagulante du lait est étudié pour la pepsine de poulet en comparaison avec la présure.

4-3. Appréciation de l'effet de la température du lait

L'influence de la température d'incubation du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de pepsine de poulet est déterminé dans un intervalle de température allant de 30 à 70 °C en fixant la température aux valeurs suivantes : 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65 ; 70 (FEDERICI, 1982).

L'activité coagulante (U.A.C/ml) mesurée pour chaque valeur de température est donnée par la moyenne de trois essais répétés. L'effet de la température sur l'activité coagulante du lait est étudié pour la pepsine de poulet en comparaison avec la présure.

4-4. Etude de l'effet de la concentration en enzyme

La variation du temps de floculation en fonction de la concentration en enzyme est déterminée en ajoutant au lait reconstitué des quantités d'extraits à une concentration finale variant entre 4,0 et 0,010 mg de pepsine par millilitre de lait. Le temps de floculation correspondant à chaque concentration en enzyme est noté. Les différentes concentrations en pepsine sont préparées à partir d'extrait lyophilisé de pepsine que nous avons préparé et conservés pendant 30 jours.

L'effet de la concentration en présure sur l'activité coagulante est également étudié.

5. ETUDE DU MODE DE CONSERVATION DE LA PEPSINE EXTRAITE

Les modes de conservations étudiés sont la concentration, la réfrigération, la congélation, la déshydratation par séchage sous vide partiel et par lyophilisation.

5-1. Concentration

La concentration est réalisée en vue de l'étude de la stabilité de l'extrait de pepsine à l'état concentré. D'autre part une concentration des extraits avant lyophilisation et séchage sous vide partiel est réalisée afin de réduire les volumes des extraits traités. La concentration est effectuée par précipitation, au NaCl d'extrait clarifié maintenu à pH 2,0, à raison de 28g d'NaCl (cristaux) pour chaque 100ml d'extrait, selon la méthode de BOHAK (1970). La concentration de sel utilisée permet la précipitation des fractions protéiques renfermant la pepsine. Cette précipitation est favorisée par le maintien de l'extrait traité à pH bas. Le mélange est agité pendant 30min à température ambiante pour favoriser les interactions hydrophobes. La pepsine brute précipitée est collectée par centrifugation à 11000 g pendant 15 min.

Afin de déterminer le taux de pepsine récupéré après précipitation nous avons traité 100 ml d'extrait clarifié avec du NaCl est le précipité obtenu après centrifugation à été repris dans un volume d'eau distillée égal au volume initial (100ml). L'activité coagulante, exprimée en U.A.C./ml de la solution enzymatique obtenue est mesurée. L'activité obtenue est comparée à celle de l'extrait clarifié initial. Le taux de protéines et d'extrait sec sont également mesurés et comparés à ceux de l'extrait clarifié initial. La précipitation est répétée trois fois ; Les valeurs de l'activité coagulante et des taux de protéines et d'extrait sec seront exprimés par les moyennes de trois déterminations.

L'obtention d'un extrait de pepsine plus concentré est réalisée par remise en solution du précipité dans un volume d'eau distillé selon la concentration désirée. L'extrait enzymatique est préalablement ajusté à pH 6,3 avant de compléter au volume final.

Deux extraits de concentrations différentes sont préparés :

- une solution enzymatique de concentration quatre fois plus élevée est préparée par remise en solution du précipité obtenu dans un volume d'eau distillée quatre fois plus faible que le volume de l'extrait clarifié de départ. L'extrait concentré ainsi préparé est conservé par réfrigération et congélation comme décrit ci-dessous.

- une solution de concentration 4,5 plus élevée est préparée pour être lyophilisée. Les conditions de concentration et lyophilisation sont décrite ci-dessous.

5-2.Conservation par réfrigération ou congélation

En vue d'étudier la stabilité de la pepsine de poulet en solution, l'extrait clarifié ainsi que l'extrait concentré sont répartis en volumes de 8 ml chacun dans des tubes en plastique et conservés par réfrigération à 7 ± 3 °C ou par congélation à -18 °C. Les extraits conservés sont préalablement ajustés à pH 6,3 ce qui assure une meilleure stabilité de la pepsine. Durant 28 jours de conservation, des échantillons sont prélevés tous les 7 jours et leur stabilité est

contrôlée par mesure de l'activité coagulante selon la méthode de BERRIDGE (1955). L'activité coagulante résiduelle est exprimée en pour cent de l'activité initiale.

5-3. Conservation par déshydratation

5-3-1. Préparation de la pepsine déshydratée par séchage sous vide partiel

La présure en poudre commerciale est généralement préparée par précipitation au NaCl et séchage dans une ambiance tiède (moins de 50 °C) (ALAIS, 1974). La déshydratation permet, évidemment, une meilleure conservation.

La préparation enzymatique séchée est obtenue par précipitation au NaCl de l'extrait clarifié (maintenu à pH 2,0) de pepsine de poulet. Le précipité obtenu est repris dans un volume très réduit d'eau distillée afin de pouvoir ajuster son pH à 6,3. A cet extrait (24 % E.S.) est additionné d'une quantité de lactose pour augmenter son extrait sec total jusqu'à 35 %. L'augmentation de l'extrait sec est dans le but de réduire la durée de séchage.

Le mélange est réparti dans des boîtes de Pétri en verre de 10 cm de diamètre à raison de 4 ml de solution par boîte (soit une épaisseur de 2 mm). Le séchage est réalisé à 45 °C et 200 mbar pendant 7 heures dans une étuve sous vide (GALLENKAMP, Vacuum oven).

5-3-2. Préparation de la pepsine déshydratée par lyophilisation

La déshydratation par lyophilisation est l'un de meilleurs modes de conservation des produits biologiques.

L'extrait de pepsine à lyophiliser est sous forme d'une solution concentrée 4,5 fois, par précipitation au NaCl. Ce facteur de concentration a été fixé suite à des essais préliminaires dans lesquels des concentrations plus élevées ont été lyophilisées. A des facteurs de concentration supérieurs à 4,5 nous avons obtenu une poudre lyophilisée présentant une dissolution incomplète durant la remise en solution.

Du lactose est additionnée à la solution concentrée, comme agent protecteur (CARPENTE et CROWE, 1987 ; IZUTSU, AOYAGI et KOJIMA, 2004), à une concentration finale de 5% (p/v). Une solution de pepsine sans addition de lactose est également lyophilisée. L'activité coagulante de ces préparations est mesurée et permet de vérifier l'effet du lactose.

La solution à lyophiliser est répartie à raison de 8 ml dans des boîtes de Pétri de 7 cm de diamètre (soit une épaisseur de 3mm). Les boîtes sont placées à -25°C ensuite lyophilisée à -68°C et 0,035 mbar pendant 8 h dans un lyophilisateur à plateaux (CHRIST, ALPHA 1-2 LD).

La stabilité de la pepsine de poulet après séchage sous vide partiel et lyophilisation est étudiée par mesure de l'activité coagulante de la pepsine avant et après déshydratation. Pour reproduire les extraits concentrés de départ (avant déshydratation), une quantité de poudre séchée ou lyophilisée est dissoute dans un volume d'eau distillée égale au volume de l'extrait concentré initial. La solution ainsi préparée doit avoir un taux d'extrait sec égal à celui de l'extrait concentré de départ.

L'activité coagulante est mesurée après dissolution de la poudre obtenue dans un volume d'eau distillée égale au volume de l'extrait concentré de départ (avec et sans lactose). L'activité résiduelle est exprimée en pour cent de l'activité initiale.

5-3-3-Conservation de la pepsine déshydratée

La poudre lyophilisée et séchée de pepsine est répartie dans des tubes hermétiques et conservée par réfrigération à $7 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Durant 56 jours de conservation des échantillons de poudre séchée et lyophilisée sont prélevés tous les 7 jours et leurs activités coagulantes sont mesurées. L'activité résiduelle est exprimée en pour cent de l'activité initiale.

6. ETUDE DE LA PROTEOLYSE DES CASEINES

Le but de cette expérience est de mettre en évidence l'action de l'enzyme coagulant sur les caséines au cours de la phase enzymatique de coagulation. Parmi les méthodes employées, pour cet effet, celle basée sur le suivi de la libération de l'azote non protéique (NPN) dans le temps. Cette augmentation de NPN représente les produits d'hydrolyse issus des caséines et qui sont solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12% de concentration finale. En effet, lorsque la protéase employée présente une action protéolytique spécifique et limitée au cours de la phase de coagulation cela se traduit par une augmentation du taux de NPN pour atteindre une valeur déterminée et stable dans le temps. Cependant, une action moins spécifique se traduit par une libération en continu du NPN soluble dans 12% de TCA.

La mesure de NPN est réalisée à partir de la teneur en azote, dosée selon la méthode Kjeldahl. La teneur en NPN est donnée en g d'azote soluble à 12 % de TCA par 100ml de lait. Le taux de NPN en pour cent de l'azote total est également calculé.

Une cinétique de protéolyse est tracée par mesure du taux d'NPN formé à différents temps d'incubation. La réaction enzymatique est inhibée par ajout de l'acide trichloracétique au temps désiré. Les intervalles de temps pris sont les suivants : 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 35, 45, 55, 60 minutes.

L'activité protéolytique est déterminée pour l'extrait clarifié de pepsine de poulet et pour la présure commerciale. Les deux extraits enzymatiques testés sont dilués pour donner un temps de floculation de 15min.

La stabilité du taux de NPN est testée par étude de la variance à un facteur en employant le logiciel de statistique (MINITAB, version 13.31).

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. CARACTERISTIQUES DU LAIT

Les caractéristiques physico-chimiques de la poudre de lait écrémé utilisé dans notre travail ainsi que celles du lait écrémé reconstitué selon la méthode de Berridge sont données par le tableau 6 . Le lait est reconstitué par dissolution de 12g de poudre de lait écrémé dans 100ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M. Le lait ainsi préparé présente une teneur en matières azotées totales de 0,626g /100ml et un taux d'azote non protéique (exprimé en pourcent de l'azote total) de 5,89%. Le pH du lait est conforme à celui donnée par différents auteurs (FEDERICI, 1982 ; SILVA et MALKATA, 2005).

Tableau 6: Caractéristiques physico-chimiques de la poudre de lait écrémé et du lait écrémé reconstitué à raison de 120 g de poudre par litre.

Caractéristiques	Lait reconstitué (120g/l)	Lait en poudre
Humidité (%)	88,38 ± 0,09	4,67 ± 0,26
Extrait sec total (%)	11,62 ± 0,09	95,13 ± 0,26
Acidité	18,83 ± 0,29	/
pH	6,42 ± 0,02	/
Azote non protéique, NPN(%)	0,0370 ± 0,0002	/
Matière azotées totales (M.A.T.) (%)	0,6268 ± 0,0092	5,26 ± 0,67

2. EXTRACTION DE LA PEPSINE DE POULET

2-1. Rendement de l'extraction

Le diagramme de base appliqué pour l'extraction de la pepsine de poulet consiste, essentiellement, à une macération de fragments de proventricules de poulet dans une solution saline. L'extrait brut obtenu après filtration sur gaze du macéras est clarifié par centrifugation. Le pepsinogène contenu dans l'extrait brut est préalablement activé en pepsine. Le tableau 7 donne les caractéristiques des extraits bruts et clarifiés obtenus à partir de 100 g de proventricules.

L'activité peptique de l'extrait brut obtenu est égale à 9034.17 UP^{HB}/ml avec une activité spécifique de 635,68UP/mg de protéine. Celle de l'extrait brut obtenue par BOHAK

(1970), à partir de 100g de proventricules, est de 10000 UP^{HB}/ml, selon le même protocole d'extraction.

Le rendement d'extraction exprimé en unité d'activité coagulante et en unité peptique par 100g de proventricules est égale à 4524 U.A.C. et de $27,106 \times 10^5$ UP^{HB} respectivement. Ce rendement correspond à l'activité enzymatique du volume total de l'extrait obtenu de l'extraction de 100g de proventricule dans 300ml de solution d'extraction. L'extrait brut ainsi obtenu renferme 15,08 U.A.C./ml (Tableau 7).

Tableau 7 : Caractéristiques des extraits brut et clarifié de pepsine de poulet issus de 100g de proventricules par macération durant 3h à 25°C.

Caractéristiques	Extraits enzymatiques		Taux récupéré en pourcent du brut
	Extrait brut	Extrait clarifié	
Volume de l'extrait (ml)	274,67 ± 6,43	256,67 ± 7,64	93,45
Extrait sec (g/100g)	6,09 ± 0,50	4,28 ± 0,39	70,23
Protéine (mg/ml)	14,22 ± 0,02	8,77 ± 0,41	61,69
Activité coagulante en U.A.C./ml	15,08 ± 0,86	8,36 ± 1,02	55,43
Activité coagulante en Force (I/l)	4559 ± 330	2579 ± 169	56,56
Activité peptique UP ^{HB} /ml	9034,17 ± 1321,72	3701,11 ± 1054,97	40,97
Activité spécifique UP ^{HB} /mg prot.	635,68 ± 93,69	419,89 ± 106,22	66,05

L'extrait clarifié de pepsine de poulet, obtenu selon le protocole appliqué, est une solution jaunâtre comparable dans son aspect aux extraits de présure obtenus par macération de fragments de caillettes dans une saumure additionnée d'antiseptiques. L'extrait brut de présure est clarifié par addition d'alun de potasse suivie d'addition de phosphate di- ou trisodique (ALAIS, 1974 ; FAO, 1988). L'extrait ainsi obtenu est généralement jaune d'or. Le ratio de caillettes à la solution d'extraction indiqué pour l'extraction de la présure est 80g de caillettes par 1000 à 1600 ml de solution (VEISSEYRE, 1979 ; ANIFANTAKIS et GREEN, 1980 ; FAO, 1988 ; WANGOH *et al.*, 1993) alors que le ratio indiqué dans le diagramme que

nous avons appliqué est de 100g de proventricules pour 300 ml de solution. Il faut en moyenne 1,5 à 2 caillettes de veau de 60 g pour obtenir 1 litre d'extrait clarifié de force 10000 (ALAIS, 1974). Cependant, à partir de 100g de proventricules nous avons obtenu un extrait clarifié de pepsine de poulet de force 2579 (Tableau 7). Il semble que la quantité d'activité coagulante apportée par gramme de caillette est supérieure à celle apportée par la même quantité de proventricules de poulet. Il faut noter, toutefois, que la chymosine comparé aux autres enzymes coagulants est celle qui possède l'activité coagulante la plus élevée; l'activité coagulante de 1 mg de chymosine correspond à celle de 5 mg de pepsine à pH 6,7 (ANDREN, 2002).

Cependant, il serait plus juste de comparer l'activité coagulante de l'extrait de pepsine de poulets à celle d'un extrait de présure préparé dans les mêmes conditions. En effet, l'extraction de présure d'agneau à partir d'un ratio de caillette à la solution de macération de 1:3, pendant 24 h de macération, à donné un extrait brut de force 3340 (MOSCHOPOULOU, 2004) alors que l'extrait brut que nous avons obtenu à partir du même ratio est de 4559, après 3 h de macération. Cet auteur a obtenu un rendement plus faible en appliquant des ratios de caillette à la solution de macération de 1:5 et 1:7, pour lesquels ils ont obtenu un extrait brut de force 2260 et 1540, respectivement.

D'autre part, pour la pepsine de poulet, il serait intéressant de tester d'autres solutions de macération tout en modifiant les paramètres temps et température d'extraction afin d'optimiser le rendement d'extraction.

2-2. Effet de la durée d'activation sur le taux de pepsine activé

Afin d'étudier l'effet du temps d'activation du pepsinogène sur le taux de pepsine récupéré, l'extrait brut obtenu à la fin de la macération a été maintenu à pH 2,0 pendant 60min à 25 °C. Durant l'activation, une partie aliquote est prélevée tous les 15 min et la quantité de pepsine activée est déterminée par mesure de l'activité coagulante. Selon le diagramme appliqué, l'activation de la pepsine à pH 2,0 est réalisée pendant 15min. Les résultats obtenus sont montrés par la figure 7.

En exprimant l'activité coagulante, obtenue aux différents intervalles d'activation, en pourcent de celle atteinte après 60min, nous avons noté que 78,16% de l'activité est atteinte à

15 min d'activation, elle augmente à 82,17 % pour 30min d'activation pour atteindre ensuite 94,77 % à 45 min. Ainsi, l'activité coagulante mesurée à 60 min augmente de 21,84 % par rapport à celle obtenue avec 15 min d'activation. En effet, différents auteurs rapportent que la durée d'activation à pH 2,0 et à température ambiante, pour la chymosine ou bien pour la pepsine, varie généralement entre 10 min à 60min (FOLTMANN, 1971 ; GREEN *et al.*, 1984 ; ANIFANTAQUIS et GREEN, 1981 ; ANDREN, 2002). Une faible activité enzymatique est mesurée dans l'extrait brut avant activation (pH 7,64) ; elle correspond à 1,34 % de l'activité coagulante atteinte à 60 min d'activation. Alors que la conversion du pepsinogène en pepsine nécessite un abaissement du pH.

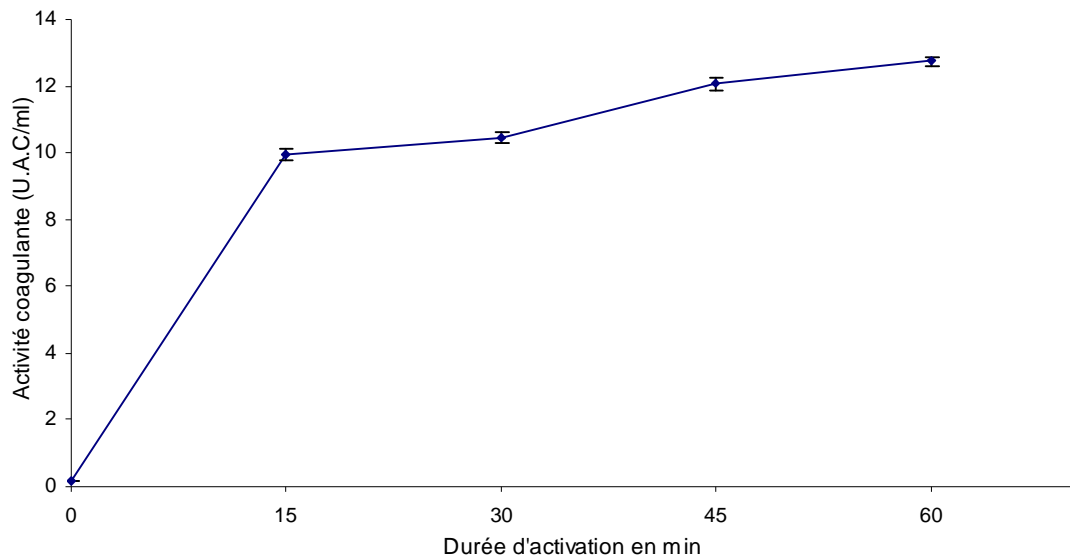


Figure 7 : Evolution de l'activité coagulante au cours de l'activation à pH 2,0

(Extrait brut : macération à 25 °C pendant 3 h ; activation à 25 °C)

Toutefois, bien que le taux de pepsine activé augmente au-delà de 15min, il reste que cette durée est celle qui a donné l'augmentation dans le taux d'activation la plus élevée comparée aux autres intervalles étudiés. FOLTMANN (1971) a obtenu un taux maximal de chymosine après 15 min d'activation à pH 2,0 et à 25°C. Cet auteur recommande de neutraliser rapidement l'extrait activé afin d'assurer une meilleure stabilité de l'enzyme. Ainsi, il est nécessaire de vérifier la stabilité de la pepsine obtenue après une durée d'activation prolongée avant d'envisager l'application d'une telle durée d'activation.

2-3. Evolution de l'activité coagulante durant la macération

Le suivi de l'évolution de l'activité coagulante de l'extrait brut en fonction du temps de macération montre que l'activité coagulante atteint son maximum à partir de 3h de macération (figure 8). Dès le mélange des fragments de proventricules avec la solution d'extraction, une quantité d'enzyme passe en solution et semble assurer près de 21 % de l'activité coagulante atteinte au bout de 5 h de macération. L'activité coagulante obtenue après 3h d'extraction correspond à 95,74 % de celle obtenue à 5h d'extraction. Ainsi, la prolongation de la durée de macération jusqu'à 5 h, n'entraîne qu'une faible augmentation du taux d'extraction, soit près de 4%.

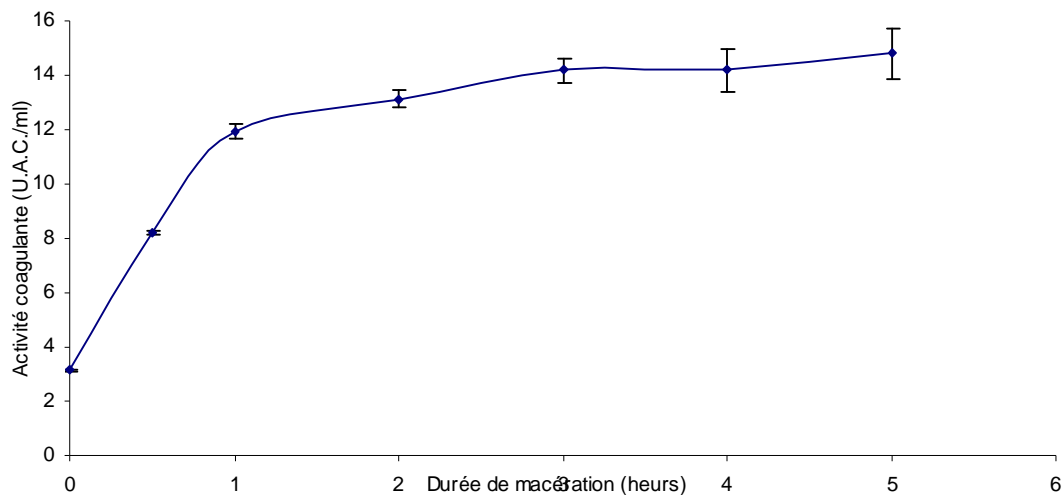


Figure 8 : Evolution de l'activité coagulante en fonction du temps de macération (Extrait brut : temps d'activation 15min à pH 2,0)

Il semble que l'augmentation du temps macération au-delà de 3h, avec le ratio de proventricules à la solution d'extraction appliqué (1:3), n'apporte pas une amélioration dans le rendement d'extraction. Cependant cela ne signifie pas que les fragments de proventricules traités sont épuisés de pepsine. La stabilisation du taux de pepsine extraite peut être due à l'installation d'un état d'équilibre de diffusion entre les fragments de proventricules et la solution de macération. En effet, lors de la préparation de présure, à l'échelle traditionnelle, la solution d'extraction est renouvelée 3 à 4 fois afin d'épuiser complètement les caillettes. Les solutions plus diluées serviront à la standardisation de la force de la présure obtenue avec la

solution la plus concentré, celle du premier passage. En outre, le déplacement de l'état d'équilibre pour favoriser la diffusion est souvent réalisé dans les procédés d'extraction.

Il semble que l'optimisation de la durée d'extraction nécessite l'étude en parallèle d'autres paramètres d'extraction notamment le ratio de proventricules au volume de solution d'extraction.

2-4- Effet du mode de clarification de l'extrait brut sur le taux de pepsine récupéré

L'extrait clarifié de pepsine de poulet, obtenu selon le diagramme appliqué, par centrifugation à 3200g de l'extrait brut (maintenu à pH 2,0), renferme en moyenne 55,43 % de l'activité coagulante initiale.

Pour étudier l'effet du traitement de clarification appliqué sur le taux de pepsine récupéré nous avons procédé à la clarification d'un extrait brut, par centrifugation à 3200 et par filtration sur papier filtre. L'extrait brut traité contient 15,58 U.A.C./ml (Tableau 8).

Tableau 8: Taux de pepsine récupéré, exprimé en activité coagulante, en fonction du traitement de clarification réalisé.

Traitement de clarification réalisé	Extrait brut activé et maintenu à pH 2			Extrait brut activé à pH 2 et ajusté à pH 6,3		
	Activité coagulante (UAC/ml)			Activité coagulante (UAC/ml)		
	Ac. initiale	Ac. finale	Taux récupéré %	Ac. initiale	Ac. finale	Taux récupéré %
Clarification par centrifugation	15,6 ± 0,11	9,1 ± 0,08	58,13	15,6 ± 0,11	15,5 ± 0,12	99,75
Clarification par filtration	15,6 ± 0,11	9,5 ± 0,08	60,89	15,6 ± 0,11	/	/

Ac.: Activité

Les résultats obtenus montrent que la perte en enzyme est due essentiellement à la floculation du mucilage qui se produit suite à l'abaissement du pH à 2,0 au cours de l'activation. En effet, la clarification de cet extrait maintenu à pH 2,0 par centrifugation (3200 g) entraîne une perte en pepsine, exprimé en U.A.C./ml, de 41.87 %. Alors que, la perte est

non significative lorsque le même extrait est centrifugé après activation et réajustement du pH à 6,3 (Tableau 8). Cependant, l'extrait ainsi récupéré est trouble ce qui indique la remise en solution du mucilage à pH 6,3 et la clarification n'est pas atteinte. La clarification de l'extrait brut (maintenu à pH 2,0) par filtration sur papier filtre donne un extrait (filtrat) comparable dans son aspect à celui obtenu par centrifugation avec un taux de perte en activité coagulante relativement plus faible (39.11%). Cela indique que la perte due à la force centrifuge seule est faible. D'autre part, selon ces résultats, la clarification par centrifugation pourrait être réalisée par simple filtration sur papier filtre. Aucun filtrat n'est récupéré lors de la filtration sur papier filtre de l'extrait brut activé à pH 2,0 et ajusté à pH 6,3. Il faut noter finalement, que le maintien de l'extrait brut à pH 2,0 est nécessaire pour la clarification par filtration ou centrifugation car cette abaissement du pH provoque la floculation du mucilage ce qui permet son élimination. Toutefois, vue le taux de perte en enzyme noté l'étude d'autres méthodes de clarification doit être envisagée.

3. PROPRIETES COAGULANTES DE LA PEPSINE DE POULET

3-1. Effet du pH du lait sur l'activité coagulante

L'effet du pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine du poulet et de la présure à été étudié en ajustant le pH du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 7,0 à 5,8. La température d'incubation est fixée à 30 °C. La figure 9 montre l'effet du pH sur l'activité coagulante de la pepsine et celle de la présure.

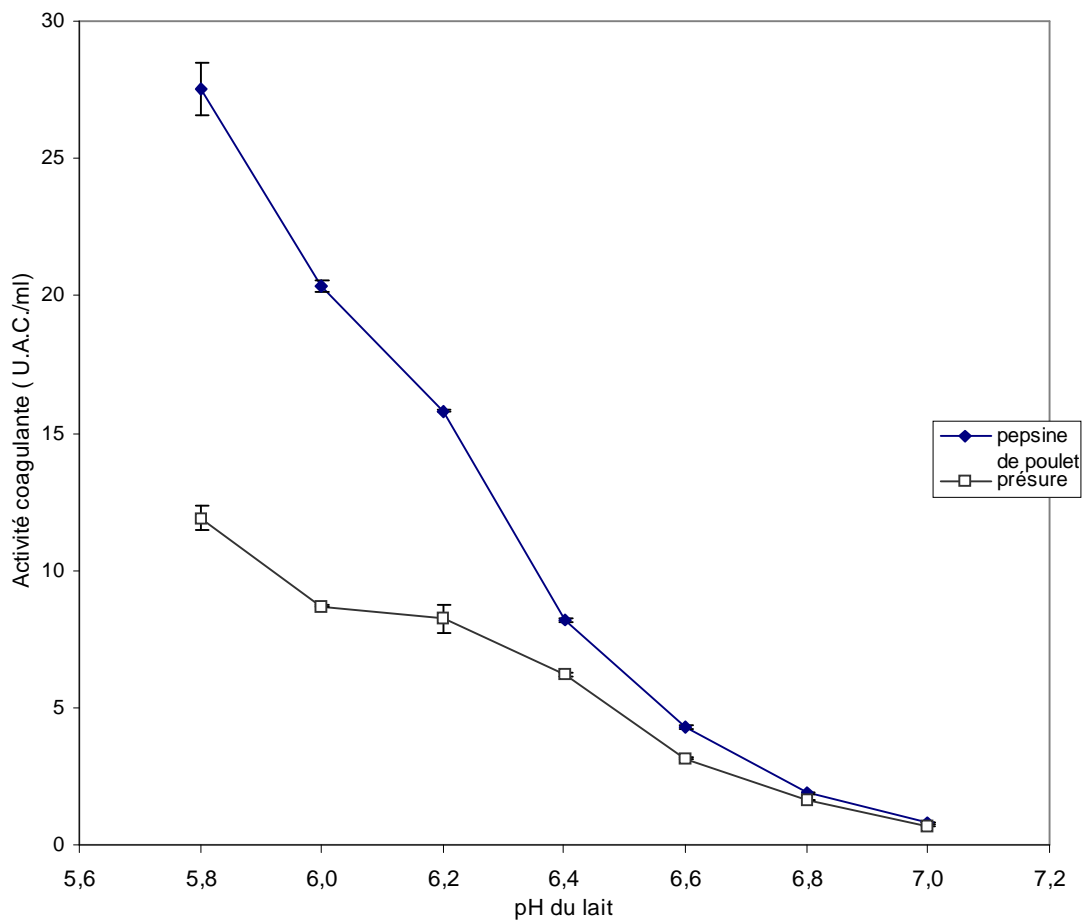


Figure 9 : Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine de poulet et de la présure
(température d'incubation : 30 °C)

L'activité coagulante de la pepsine de poulet augmente au fur et à mesure de l'abaissement du pH du lait dans l'intervalle de pH étudiée.

L'évolution de l'activité coagulante de la présure en fonction du pH suit une allure comparable à celle de la pepsine.

A pH 7,0, l'activité coagulante des deux enzymes n'est pas inhibée ils montrent encore une faible activité coagulante à ce pH. Aux valeurs de pH de 7,0 à 6,4, l'activité coagulante de la pepsine de poulet et de la présure augmente d'une manière identique. Il faut noter que la capacité d'une protéase à coaguler le lait aux valeurs de pH proches de son pH naturel (environ 6,7) est un critère de choix pour les enzymes coagulants. La pepsine bovine est capable de coaguler le lait à pH 6,9 (RICHARDSON, 1975). Cependant, la pepsine porcine

est très sensible à l'augmentation du pH et son activité diminue considérablement à partir du pH 6.5 comparée à celle de la présure (RICHARDSON, 1975 ; ERNSTROM et WONGT, 1983). C'est la raison pour laquelle la pepsine porcine est employée en mélange avec la présure.

Pour les valeurs de pH de 6,4 à 5,8, l'activité coagulante de la pepsine de poulet est plus favorisée par l'abaissement du pH du lait comparé à la présure. L'activité coagulante de la pepsine mesurée à pH 5,8 est 3,35 fois celle obtenue à pH 6,4 contre une augmentation au double pour la présure. GREEN *et al.*, (1984) indiquent une augmentation de l'activité coagulante de la pepsine de poulet au double lorsque le pH du lait est abaissé de 6,65 à 6,5. D'autres auteurs indiquent un effet comparable de l'abaissement du pH du lait sur l'activité de la pepsine de poulet (GORDIN et ROSRNTAL (1978) ; EL-ABBASSY et WAHBA, (1988). Cela paraît évident vu que la pepsine présente un caractère acide plus prononcé comparée à la chymosine. Selon BOHAK, 1969 et ALAIS, 1974, lors de l'emploi de l'hémoglobine comme substrat, la pepsine de poulet et la chymosine montrent un pH optimum de 2,8 et 3,4 respectivement. Il faut noter également que le pH optimum d'hydrolyse de la caséine κ par la présure étant 5,1-5,3 (NAGERA *et al.*, 2003).

L'influence de l'acidification sur le temps de floculation résulte pour une part d'un effet sur l'activité de l'enzyme et d'autre part sur la réaction d'agrégation par suite de la diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges négatives, et la libération d'ions calcium à partir des complexes dissous et colloïdaux (RAMET, 1997).

L'effet du pH sur l'activité coagulante est mis à profit en fromagerie. En effet, l'emploi de lait légèrement acidifié, lorsque le type de fromage le permet, est recommandé par les fabricants de préparations de pepsine de poulet afin de réduire la quantité d'enzyme utilisée (GRENN *et al.*, 1984). L'effet de l'acidification du lait sur les propriétés du gel formé doit être pris en considération.

Cependant si l'abaissement du pH augmente l'activité coagulante de ces protéases acides il aura un effet comparable sur leur activité protéolytique au cours de la maturation et de l'affinage du fromage notamment pour certains types de fromage pour lesquels les valeurs du pH sont relativement abaissées au cours de ces étapes de fabrication (GRENN *et al.*, 1984). En outre, l'étude de la stabilité de la pepsine bovine porcine et de la chymosine montre que ces enzymes présentent une bonne stabilité aux valeurs de pH inférieurs à 5,5 (ANDREN et KONING, 1982). Ainsi, bien que l'abaissement du pH du lait permet de réduire la quantité de pepsine employée, une étude de son activité protéolytique à ces pH relativement acides est nécessaire.

3-2. Effet de la température du lait sur l'activité coagulante

L'effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la pepsine du poulet et de la présure est déterminé par la mesure de l'activité coagulante à différentes températures d'incubation

(de 30 à 65 °C) (pH 6,4).

Au dessus de 30 °C, l'activité coagulante de la pepsine augmente progressivement jusqu'à 55 °C pour la quelle l'activité est maximale, elle diminue ensuite et au dessus de 65°C, il n'y'a plus de floculation (Figure 10). La présure a montré un maximum d'activité à 50 °C (pH 6,4) (Figure 10). La température optimale pour la coagulation du lait par la présure à pH 6,6 est d'environ 45 °C (LUCÉY, 2002).

L'augmentation de la température du lait entraîne une amélioration très nette de l'activité coagulante des deux enzymes étudiés. Toutefois, cette amélioration est plus importante dans le cas de la pepsine de poulet. De 30 à 55 °C, une hausse de la température de 5 °C entraîne une augmentation de l'activité coagulante en moyenne de 3,87 UAC/ml pour la pepsine contre 1,68 UAC/ml pour la présure (de 30 à 50 °C).

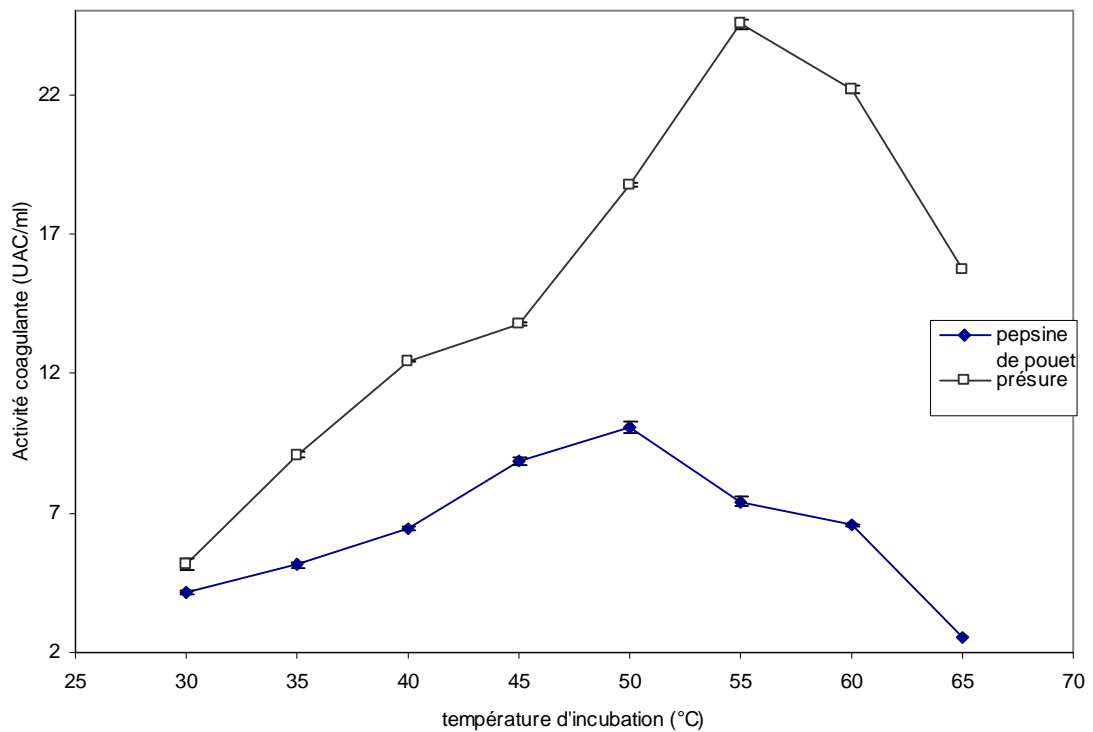


Figure 10 : Activité coagulante de la pepsine de poulet et la présure en fonction de la température du lait à pH 6,4.

La pepsine bovine et porcine montrent également une sensibilité à l'augmentation de la température entre 30 et 50°C (HAARD *et al.*, 1982).

Toutefois, il faut noter que l'effet de la température résulte de la conjugaison de deux effets, l'un sur la réaction enzymatique, l'autre sur la phase secondaire de la coagulation et qui correspond à l'étape d'agrégation. En effet, la coagulation du lait ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures ou égales à 18 °C. Cela est due à l'importance des interactions hydrophobes dans l'agrégation des micelles hydrolysées (BRINKHUIS et PAYENS, 1984, LUCEY, 2002). En fromagerie, l'effet favorable de la température sur l'activité coagulante de la pepsine de poulet peut être mis à profit lorsque les conditions de coagulation le permettent. Ce qui permet de réduire la quantité d'enzyme ajoutée et par conséquent de réduire toute activité protéolytique ultérieure. Cependant l'étude des propriétés du coagulum formé doit être envisagée.

3-3. Effet de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante

Afin d'étudier l'effet de la concentration en pepsine sur l'activité coagulante, des solutions de pepsine de poulet préparées à partir de poudre lyophilisée sont additionnées au lait reconstitué (substrat de Berridge) à des concentrations finales comprises entre 0,011 et 4,000 mg d'extrait lyophilisé par millilitre de lait. Cela donne une diminution du temps de floculation de 1563 à 20 sec. La poudre lyophilisée de pepsine employée a une activité coagulante de 587,5 UAC/g (la force coagulante est de 183302 l/kg).

L'effet de la concentration en présure est étudié pour le même intervalle de concentration. Ce qui donne une diminution du temps de floculation de 1997 sec à 21 sec. La poudre de présure employée a une activité coagulante de 419,28 UAC/g (de force coagulante égale à 128227 l/kg). La figure 11 montre l'évolution du temps de floculation en fonction de la concentration en pepsine de poulet et de présure.

Le temps de floculation est inversement proportionnel à la concentration en pepsine est cela pour les valeurs de concentration comprises entre 0,011 à 0,200 mg/ml de lait. Pour les concentrations en pepsine entre 0,200 à 4,000 mg/ml de lait, le temps de floculation est de plus en plus court et tend vers une valeur constante.

La variation du temps de floculation en fonction de la concentration en présure suit la même tendance (Figure 5), pour la même marge de concentration. En effet, l'évolution du temps de floculation en fonction de la concentration en présure est représentée par une courbe présentant une allure comparable à celle obtenue avec la pepsine de poulet. L'effet de la concentration en enzyme sur le temps de floculation semble commun à toutes les protéases acides. En effet, les résultats obtenus par SILVA et MALCATA (2005) montrent une allure comparable. Ces auteurs ont étudié l'effet de la concentration en protéases acides d'origine végétale (*Cynara cardunculus*) sur le temps de floculation du lait.

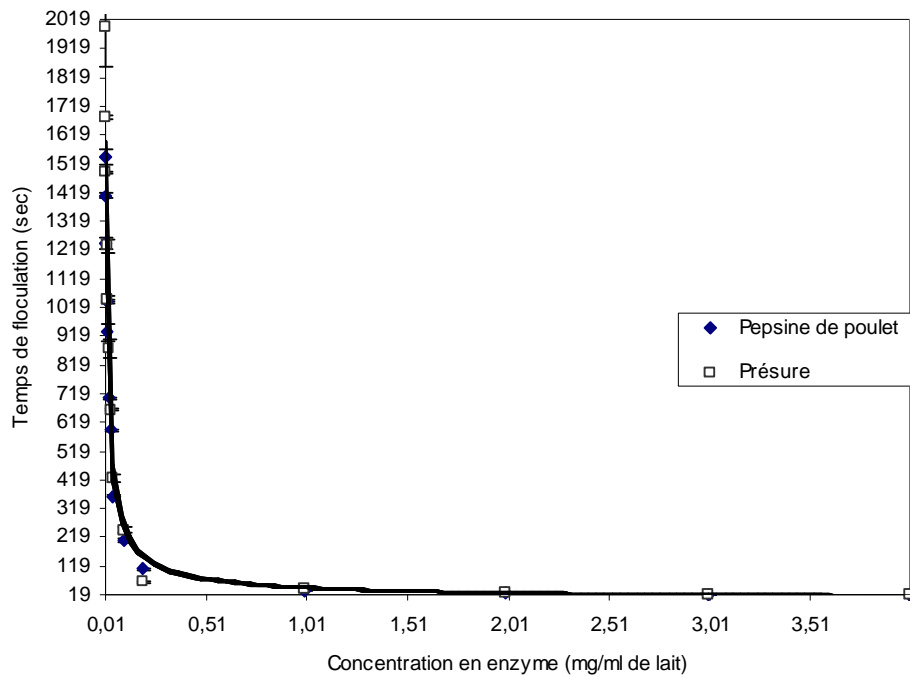


Figure 11 : Effet de la concentration en pepsine de poulet et en présure sur le temps de floculation du lait (à pH 6,4 et 30°C)

Plusieurs équations ont été proposées pour décrire l'influence de la concentration en enzyme sur le temps de coagulation du lait. L'équation d'Holter est l'une des plus largement utilisées (FOLTMANN, 1970 ; Mc MAHON et BROWN, 1990 ; RAMET, 1997 ; LECEY 2002). Cette dernière décrit une relation inverse entre le temps de coagulation et la concentration en enzyme :

$$CT = K \times \frac{1}{C} + A$$

[E]

Où CT est le temps de coagulation, K et A sont des constantes et [E] la concentration en enzyme.

Le temps de floculation correspond à celui de la réaction enzymatique et d'agrégation réunis. La Constante A, dans l'équation d'Holter, correspond au temps nécessaire à la phase non enzymatique de la coagulation du lait. Cependant, les expériences ont montré que la phase secondaire de coagulation ne peut être représentée par une constante, car elle est fortement influencée par la variation de pH et de la température (FOLTMANN, 1970 ; LUCEY, 2002). En effet, ce temps diminue considérablement lorsque la température du lait est élevée de 25 à 42 °C ; à cette dernière valeur, le temps de floculation coïncide avec la fin de la phase enzymatique (pH du lait 6,7). A température constante, le temps de la phase secondaire diminue lorsque le pH du lait est abaissé A pH 6,0 et à 25 °C, les deux phases se produisent simultanément (FOLTMANN, 1970). Toutefois l'expérience montre que cette équation est valide pour une marge de concentration en enzyme assez grande.

En exprimant le temps de floculation en fonction de l'inverse de la concentration en enzyme nous avons obtenu, pour chacun des deux enzymes, une droite d'équation $y = a \times (1/x) + b$ (figure 12). Pour la marge de concentration que nous avons étudiée, le temps de floculation est une fonction linéaire de l'inverse de la concentration en enzyme.

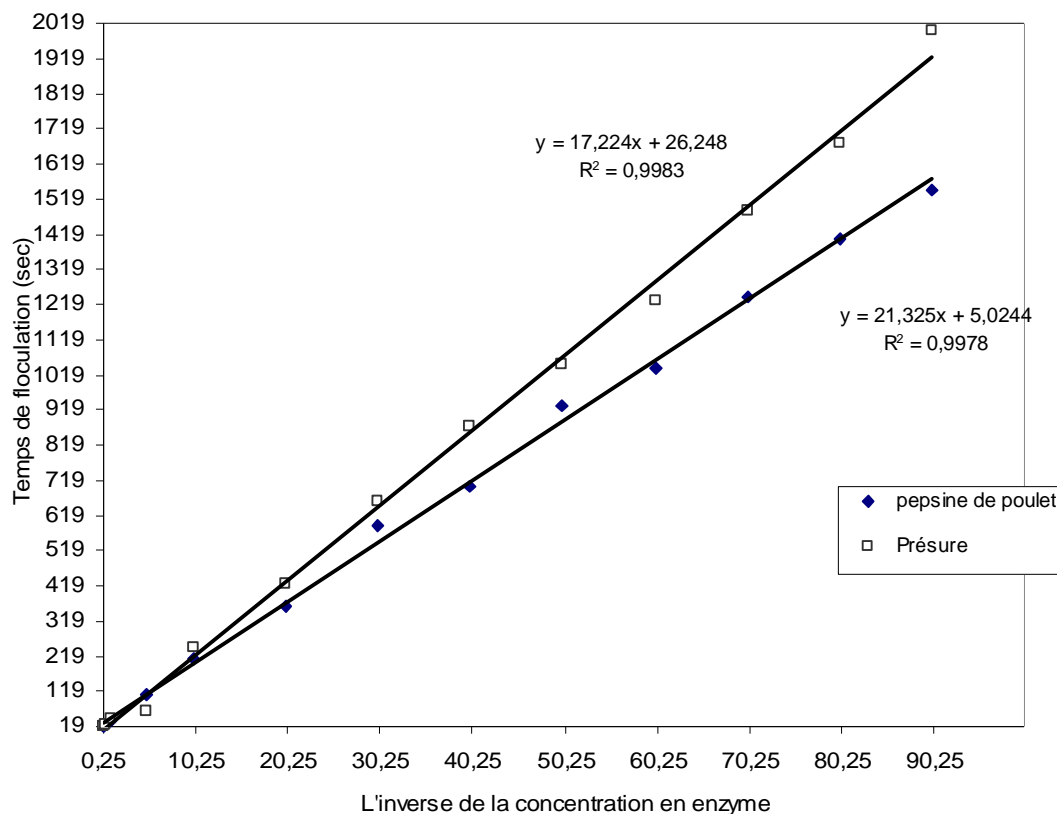


Figure 12 : Temps de floculation en fonction de l'inverse de la concentration en pepsine de poulet et de présure

4. ETUDE DU MODE DE CONSERVATION DE LA PEPSINE DE POULET

4-1. Effet de la concentration par précipitation au NaCl sur le taux de pepsine

L'obtention d'un extrait plus concentré en pepsine de poulet à partir de l'extrait clarifié a été réalisée par précipitation au NaCl à raison de 28g pour chaque 100ml d'extrait clarifié. Cependant, avant de procéder à la concentration il était nécessaire de déterminer le taux de pepsine récupéré après précipitation. Pour cela, le précipité obtenu est repris dans un volume d'eau distillée égal au volume initial. L'activité coagulante avant et après précipitation est mesurée ainsi que le taux de protéines et l'extrait sec. Le tableau 9 compare les caractéristiques de l'extrait clarifié initial et de l'extrait obtenu après précipitation et remise en solution du précipité.

Tableau 9 : Caractéristiques de l'extrait de pepsine obtenu par précipitation au NaCl : comparaison avec celles de l'extrait clarifié initial.

Caractéristiques	Extrait clarifié	Extrait après précipitation et remise à la concentration de départ	Taux récupéré(%)	Taux de perte (%)
Extrait sec (g/100g)	4,423 ± 0,127	0,960 ± 0,028	21,70	78,3
Taux de protéines (mg/ml)	8,9 ± 0,18	4,542 ± 0,208	50,49	59,50
Activité coagulante UAC/ml	9,06 ± 0,25	8,2 ± 0,36	90,94	9,9

La quantité de NaCl employée entraîne la précipitation de 50,49 % des protéines de l'extrait clarifié traité. Par contre 90 % l'activité coagulante initiale est récupérée après précipitation. Cela signifie que la concentration en NaCl employée permet de précipiter la fraction protéique renfermant la pepsine et 10 % seulement de la quantité initiale de pepsine reste en solution. Il semble que le taux d'activité enzymatique récupéré est plus important lorsque la précipitation est effectuée à pH bas. En effet FOLTMANN (1970) indique un taux de perte de 45% lorsque la précipitation d'un extrait de présure est réalisée à pH 6,3.

Dans le but d'étudier la stabilité de la pepsine en solution, un extrait quatre fois plus concentré en pepsine que l'extrait clarifié initial a été préparé par précipitation au NaCl. Le précipité obtenu a été repris dans un volume d'eau distillée quatre fois plus faible. Cependant, la quantité de sel employé ne permet pas la récupération de la quantité totale de pepsine contenue dans l'extrait clarifié traité comme c'est indiqué ci-dessus. Ainsi, l'activité coagulante obtenue après concentration est 3,5 fois l'activité initiale (tableau 10).

Toutefois, l'activité coagulante de l'extrait concentré, exprimée par la force est égale à 10465. Ainsi, il était intéressant d'étudier la stabilité au cours de la conservation de cet extrait du fait que la présure liquide commerciale est généralement de force 10000 (ALAIS, 1974).

Tableau 10 : Effet de la concentration par précipitation au NaCl sur les caractéristiques de l'extrait de pepsine concentré 4 fois

	Extrait clarifié	Extrait concentré	Facteur de concentration d'activité enzymatique
Activité coagulante en U.A.C /ml	9,06 ± 0,25	31,52 ± 1,46	3,5
Activité coagulante en Force (I/l)	2920 ± 10	10465 ± 252	3,6
Activité peptique UP ^{HB} /ml	3226,67 ± 197,32	13010,00 ± 600,44	4,0

4-2. Conservation de la pepsine de poulet par réfrigération ou congélation

En vue d'étudier la stabilité de la pepsine de poulet en solution, l'extrait clarifié, ainsi que l'extrait concentré 4 fois, sont conservés à l'état réfrigéré et congelé pendant 30 jours. L'activité coagulante résiduelle de chaque extrait est vérifiée tous les 7 jours.

4-2-1- Congélation ou réfrigération de l'extrait clarifié (non concentré)

La conservation de l'activité coagulante de l'extrait clarifié est meilleure à l'état congelé qu'à l'état réfrigéré. L'extrait congelé a conservé 72,3 % de son activité initiale, après 30 jours de conservation, contre 4,3 % seulement pour l'extrait réfrigéré. La perte d'activité de l'extrait réfrigéré est notable durant les deux premières semaines de conservation. Le taux de perte le plus élevé est noté au cours des 7 premiers jours durant lesquels 38,19 % seulement de l'activité initiale est maintenue (figure 13).

La perte d'activité d'extrait de pepsine de poulet au cours du stockage à 5-10°C a été reportée dans le travail réalisé par ELABASSY et WAHBA (1988). La perte d'activité était entre 14 à 100 % au cours de la conservation pendant 7 jours à pH 5,5-6,5.

La composition du milieu ainsi que la présence d'impuretés semblent influencer la stabilité de la pepsine. En effet, la pepsine de poulet purifiée conservée dans du tampon phosphate à pH 6,9 est stable à l'état réfrigéré et congelé (DONTA et VAN VUNAKIS, 1970). Toutefois, des extraits de présures préparés par simple clarification et filtration de

macéra sont conservés jusqu'à 3 mois par réfrigération (entre 5 à 7°C), sans perte considérable d'activité, Le benzoate de sodium est additionné à raison de 1% au cours de la macération (FAO, 1988). L'extrait brut de présure d'agneau (pH 5,3) stocké à 4°C pendant 120 jours conserve 84% de son activité coagulante initiale.

4-2-2. Réfrigération ou congélation de l'extrait concentré

L'extrait concentré de pepsine de poulet conserve mieux son activité coagulante au cours de la conservation comparé à l'extrait clarifié non concentré. L'activité coagulante résiduelle est de 79,61% après 30 jours de congélation, pour l'extrait concentré, contre 72,3 % pour l'extrait clarifié non concentré. Par réfrigération, l'activité résiduelle est de 25.72% et de 4,3 % pour l'extrait concentré et clarifié respectivement.

Ainsi la concentration apporte une légère amélioration de la conservation de l'extrait de pepsine conservé par réfrigération et congélation. L'évolution de l'activité coagulante des deux extraits est illustrée dans la figure 13.

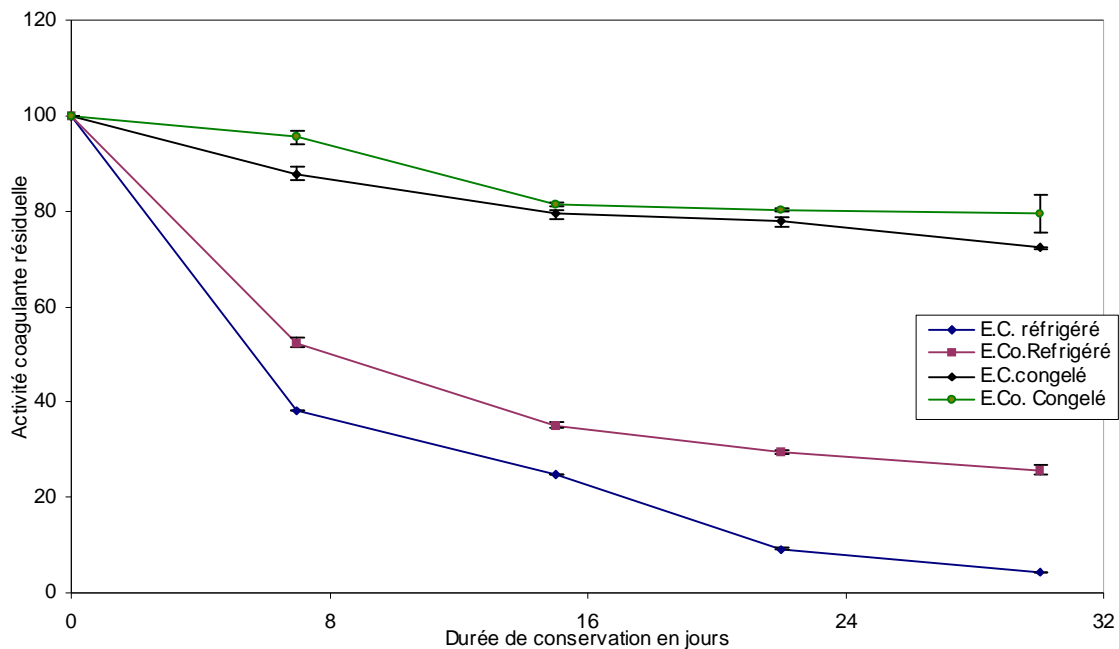


Figure 13 : Evolution de l'activité coagulante de l'extrait clarifié et concentré au cours de la conservation à l'état congelé et réfrigéré. (E.C. : extrait clarifié non concentré, E.Co. : extrait concentré)

4-3- Conservation de la pepsine de poulet par séchage sous vide partiel

4-3-1. Taux de pepsine récupéré suite au séchage

La déshydratation de la pepsine de poulet a été réalisée par séchage sous un vide partiel. L'extrait concentré de pepsine de poulet a été additionné de poudre de lactose afin d'augmenter le taux d'extrait sec ce qui permet par conséquent de réduire le temps de séchage.

Le séchage à 45°C et 200mbar qui a duré pendant 7h a donné une poudre dont les caractéristiques sont données dans le tableau 6. La poudre obtenue est peu soluble dans l'eau distillée et elle a tendance à précipiter au repos. Toutefois, la pepsine de poulet séchée retient une activité coagulante égale à 93.3% de celle de l'extrait concentré initial (Tableau 11).

Tableau 11 : Caractéristiques de la poudre séchée de pepsine de poulet

Caractéristiques	Poudre de pepsine obtenue par séchage sous vide partiel
Extrait sec (g/100g)	92.46 ± 0.85
taux de protéine (mg/g)	276.04 ± 2.07
U.A.C./g	428,55 ± 3.14
Force (l/kg)	105671 ± 6008
Activité coagulante du concentra initial (UAC/ml)	246,16 ± 1,66
Activité coagulante du concentra préparé à partir de la poudre séché (UAC/ml)	229,79 ± 4,7
Activité Coagulante résiduelle (%)	93.30 ± 1.54

La préservation de l'activité enzymatique au cours du séchage est peut être due à l'effet protecteur du lactose. En effet, l'addition de sucre ordinaire réduit considérablement ; la perte en activité au cours du séchage par atomisation des extraits de présure. La perte

d'activité peut devenir nulle à 10-20% de sucre (ALAIS, 1974). Le séchage d'une manière générale peut altérer la structure secondaire des protéines du fait que l'hydratation de la protéine est partiellement perdue. En remplaçant les molécules d'eau éliminées par les molécules de sucres (lactose, sucrose...), qui sont capable de former des liaisons hydrogènes avec les protéines, l'effet du séchage peu être largement compensé (IZUTSU, *et al*, 2004 ; VASILJEVIC et JELEN, 2003). Le séchage de la trypsine par le procédé spray en présence de lactose permet de récupérer environ 94% de l'activité enzymatique initiale. Le taux récupéré par lyophilisation (avec les mêmes taux de lactose et de trypsine) est de 81% (MILLQVIST *et al.*, 1999).

4-3-2. Stabilité de la poudre séchée de pepsine au cours de la conservation.

La poudre de pepsine de poulet obtenue par séchage a été conservée pendant 56 jours à 7 °C. La stabilité de la pepsine a été suivie par mesure de l'activité coagulante tous les 7 jours. Pour mesurer l'activité coagulante de la poudre séchée une solution à 2g de poudre sèche par 100ml d'eau distillé est préparée. Les valeurs de l'activité coagulante données sont celles d'une solution à 2% de poudre séchée. L'activité coagulante mesurée est exprimée en pour cent de l'activité initiale. La figure 14 montre l'évolution de l'activité de la poudre de pepsine séchée au cours de la conservation.

Au cours de cette période de conservation, la poudre de pepsine séchée à conservé 75,74% de son activité coagulante. Au cours des 7 premiers jours de conservation la perte d'activité a atteint les 9 %. Du 7^{ème} aux 49^{ème} jours, la pepsine en poudre a montré plus de stabilité avec une moyenne de taux de perte de 0.15% tous les 7jours. Du 49^{ème} aux 56^{ème} jours le taux de perte à augmenté à nouveau jusqu'à 9,71% (Figure14). Toutefois, un taux de perte d'environ 25% au cours de 56 jours de conservation est assez important.

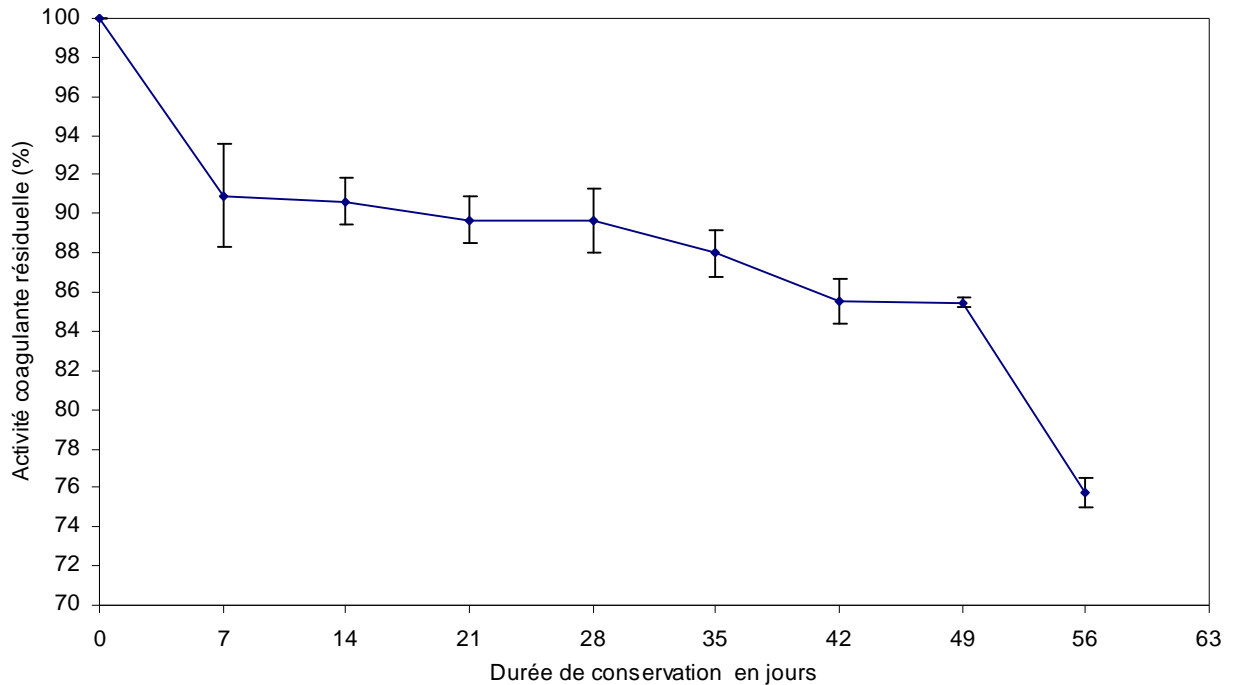


Figure 14 : Stabilité de la poudre séchée de pepsine de poulet au cours de la conservation à 7 °C

4-4. Conservation de la pepsine de poulet par lyophilisation

4-4-1. Taux de pepsine récupéré suite à la lyophilisation

La pepsine de poulet a été lyophilisée par le traitement d'un extrait concentré 4,5 fois avec et sans l'emploi de lactose comme agent protecteur. La concentration nous a permis de traiter au cours de la lyophilisation d'un volume d'extrait enzymatique plus faible. Le lactose est additionné à l'extrait concentré à raison de 5% (p/v).

Après lyophilisation de 8h à -68°C et 0,035 mbar, nous avons obtenu une poudre de pepsine de poulet dont les caractéristiques sont données dans le tableau 12.

Les caractéristiques de la poudre lyophilisée données dans le tableau 12 ne peuvent pas être directement comparées du faite que les deux produits ont été préparés à partir de deux extraits clarifiés de pepsine de poulet différents. En effet la capacité du lyophilisateur employé ne permettait pas de réaliser l'expérimentation avec et sans l'emploi de lactose en même temps et sur le même extrait de pepsine.

Tableau 12: Caractéristiques de la poudre de pepsine lyophilisée obtenue avec et sans l'emploi du lactose (lyophilisation à - 68°C, 0,035 mbar pendant 8h)

Caractéristiques/ gramme de poudre lyophilisé	Poudre lyophilisée 1 (sans lactose)	Poudre lyophilisée 2 (avec du lactose)
Extrait sec (g/100g)	83.00 ± 1.30	93.82 ± 0.23
Taux de protéine (mg/g)	329.07 ± 10.48	293.94 ± 5.57
Activité coagulante en Force (l /kg)	183302 ± 5937	155110 ± 7904
Activité coagulante (U.A.C./g)	587.5 ± 29.14	534.1 ± 7.90
Activité de l'extrait clarifié initial (UAC)/ml	7,19 ± 0,01	9,43 ± 0,12
Activité coagulante du concentra initial (UAC/ml)	28,79 ± 1,32	40,79 ± 0.39
Activité coagulante du concentra après lyophilisation (UAC/ml)	26,15 ± 1,41	38,07 ± 0,56
Activité coagulante résiduelle (%)	90.82 ± 4.92	93.34 ± 1.38

Comparé à l'extrait concentré de départ la pepsine de poulet a retenu, après lyophilisation, 90.82% de son activité coagulante initiale. L'addition du lactose à raison de 5% (p/v) de l'extrait concentré traité n'apporte qu'une légère amélioration de la stabilité de la pepsine au cours de la lyophilisation avec 93,25 % l'activité coagulante initiale récupérée. Il faut noter que l'effet protecteur des sucres vis à vis des protéines en générale est fortement lié à la concentration en sucre utilisée. La concentration optimale en saccharides permettant le maximum de protection des protéines est généralement entre 100 à 200 mM. A des concentrations plus élevées les sucre tends à cristalliser (CARPENTER *et al.* 1993) Le lactose est parmi les disaccharides les plus utilisés comme agent protecteur toutefois l'emploi d'autre disaccharides (maltose, glucose, maltotriose....) mérite d'être étudié. En effet, le choix d'utiliser le lactose été basé, en plus de son pouvoir protecteur, sur le fait qu'il soit le sucre naturel du lait.

Toutefois, avec ou sans l'emploi d'agent protecteur, le taux de perte en pepsine au cours de la lyophilisation est faible (10%) contrairement à ce qu'il a été précisé par certains travaux. En effet, BOHAK (1970) indique un taux de perte d'activité enzymatique de 55 %.

Les conditions de lyophilisation appliquées et les caractéristiques de l'extrait de pepsine traité ne sont données. D'autres auteurs recommandent de ne pas lyophiliser la pepsine de poulet vu la perte considérable en activité sans préciser le taux de perte obtenu (DONTA et VAN VINAKIS, 1970).

4-4-2. Stabilité de la poudre lyophilisée de pepsine au cours de la conservation.

La poudre de pepsine de poulet obtenue par lyophilisation a été conservée pendant 56 jours (7 °C). La stabilité de la pepsine a été suivie par mesure de l'activité coagulante tout les 7 jours. Les valeurs de l'activité coagulantes données sont celles d'une solution de pepsine à 1,6 % de poudre lyophilisée. L'activité mesurée est exprimée en pour cent de l'activité initiale. La figure 15 montre l'évolution de l'activité de la poudre de pepsine lyophilisée au cours de la conservation.

A cours d'une durée de conservation de 56 jours la poudre lyophilisée de pepsine de poulet a conservé 80,25%. Durant les 7 premiers jours le taux de perte atteint 6% ensuite la perte d'activité coagulante diminue pour atteindre un taux moyen de 1,13% tous les 7 jours, durant 49 jours d'entreposage. Le taux de perte augmente à nouveau du 49^{ème} jour au 56^{ème} jour pour atteindre 6,86%.

Cependant, il est nécessaire de souligner qu'une durée de conservation de 60 jours n'est pas suffisante pour apprécier la stabilité d'une enzyme conservée à l'état déshydraté. Toutefois, la poudre de pepsine lyophilisée a montré une stabilité meilleure que celle de la poudre séchée. Cela est peut être due au fait que cette dernière a une teneur en lactose plus élevée. Ce qui peut influencer la stabilité de la pepsine due à son pouvoir hygroscopique.

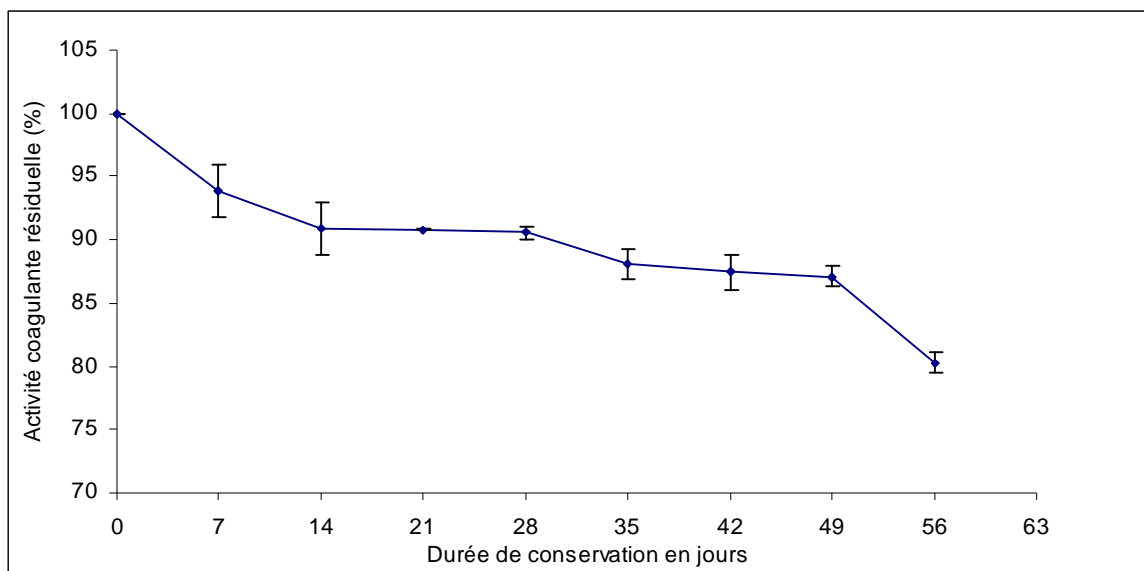


Figure 15 : Stabilité de la poudre lyophilisée de pepsine de poulet au cours de la conservation

5. ETUDE DE LA PROTEOLYSE DES CASEINES

L'étude de l'activité protéolytique d'une enzyme coagulante au cours de la phase de coagulation consiste à déterminer si la protéase employée présente une action spécifique et limitée durant cette phase, ou bien une action moins spécifique. Cela a été réalisé par le suivi de l'augmentation du taux d'NPN et qui constitue l'une des méthodes employées pour cette fin. En effet, au cours de la coagulation enzymatique du lait, l'hydrolyse de la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caséine κ entraîne la libération de macropeptides, de poids moléculaire d'environ 6700 (PAYENS *et al.*, 1977 ; ERNSTROM et WONG, 1983, SHAMMET *et al.*, 1992). La libération de ces fragments peptidiques entraîne l'augmentation du taux de NPN dans le lait.

La production de NPN dans le cas de la chymosine qui présente une spécificité à cette liaison se traduit par une courbe d'allure caractéristique ; la vitesse est maximale au commencement ; elle va en suite en diminuant et devient pratiquement nulle. Une valeur finale de NPN est atteinte lorsque toutes les molécules de caséine κ sont hydrolysées (ALAIS, 1974). Cette valeur finale correspond à 4% des caséines ; le pourcentage que représente les macropeptides dans la caséine. Elle correspond à une augmentation du taux de NPN(en pourcent de l'azote total) de 2,99% (GARNIER *et al.*, 1962 ; Cité par EMMONS *et al.*, 1990)

Cependant, lorsque la protéase employée n'est pas spécifique dans son action, cela se traduit par la production d'un taux d'NPN variable reflétant l'attaque d'autres liaisons peptidiques au niveau de la caséine κ ou bien au niveau des autres fractions caséiniques.

L'étude de l'activité protéolytique de la pepsine de poulet a été réalisée par mesure du taux de NPN dans le lait à différents intervalles du temps d'incubation. Une étude comparative pour une présure commerciale a été réalisée en maintenant les mêmes intervalles du temps d'incubation. L'extrait clarifié de pepsine de poulet ainsi qu'une solution de présure à 1% (p) ont été dilués pour donner un temps de floculation de 15 ± 1 min. L'évolution de la teneur en NPN du lait pour la pepsine de poulet et la présure est donnée par la figure 16.

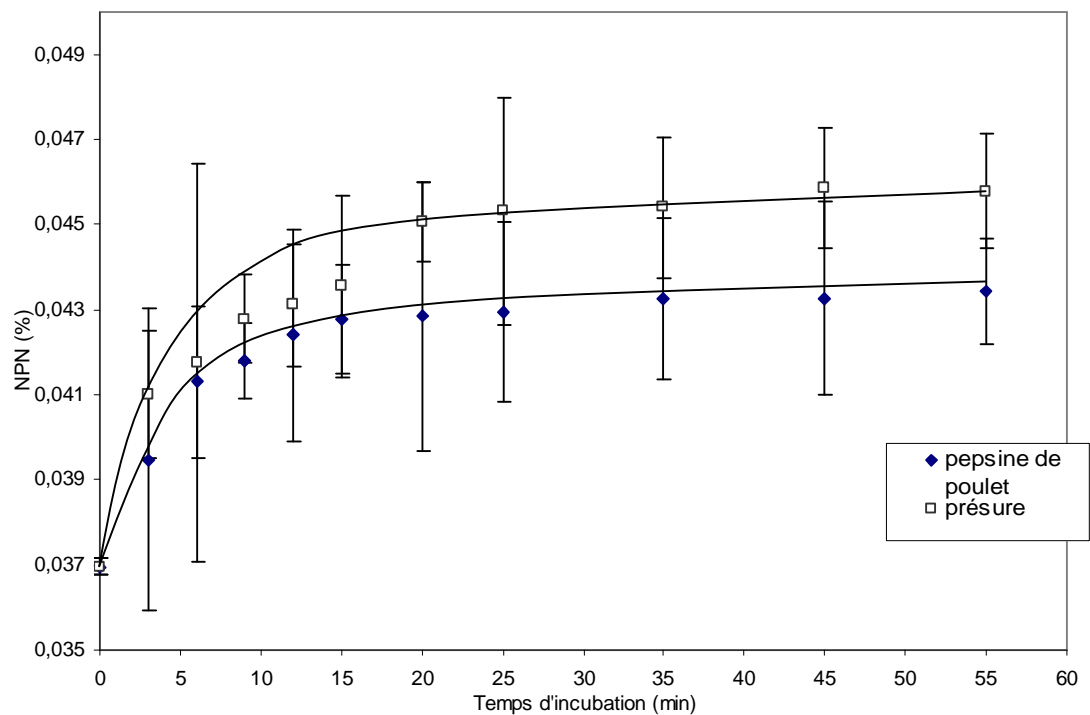


Figure 16 : Evolution de la teneur en NPN du lait au cours de la coagulation par la pepsine de poulet et la présure. (la teneur en NPN est donnée en gramme d'azote soluble à 12% de TCA pour 100 ml de lait)

La pepsine de poulet a donné une augmentation progressive du taux d'NPN durant les 15 premières minutes d'incubation. Au point de floculation la pepsine de poulet donne un taux de NPN, exprimé en pour cent de l'azote total de 6,82 % contre un taux de 6,947 % pour la présure au même temps de floculation (Tableau 13).

A partir de 20 min d'incubation l'NPN atteint un taux maximal qui tend vers une valeur constante (Figure 16). En effet, jusqu'à 55 min d'incubation, le dosage du NPN a donné des valeurs très rapprochées avec des différences non significatives ($P = 0.966$). Une stabilité du taux de NPN libéré est, également, observé pour la présure. La différence est non significative pour les valeurs mesurées à partir de 20 min d'incubation ($P = 0,987$).

Cependant le taux de NPN final obtenu pour la pepsine de poulet n'a pas excédé celui obtenu par la présure (figure 16). Nous avons mesuré un taux final de NPN (en pour cent de l'azote total) de 6,927 % et de 7,314 % pour la pepsine de poulet et la présure respectivement avec un taux initial de 5,89% (Tableau 13). Cela correspond à une augmentation de 1,3 % et de 1,48% pour la pepsine de poulet et la présure respectivement. Toutefois, pour les deux enzymes l'augmentation du taux de NPN est inférieure à 2,99 % donnée par GARNIER *et al.*, (1962).

Tableau 13 : NPN libéré, à différentes durées d'incubation, par la présure et la pepsine de poulet

Temps D'incubation (sec)	Pepsine de poulet		Présure	
	NPN/100ml de lait	% NPN/TN	NPN/100 ml de lait	% NPN/TN
0	0,0370 ± 0,0002	5,896	0,0370 ± 0,0002	5,896
3	0,0395 ± 0,0035	6,298	0,0410 ± 0,0015	6,540
6	0,0413 ± 0,0018	6,591	0,0417 ± 0,0047	6,660
9	0,0418 ± 0,0009	6,669	0,0428 ± 0,0011	6,826
12	0,0424 ± 0,0025	6,765	0,0428 ± 0,0014	6,877
15	0,0428 ± 0,0013	6,823	0,0435 ± 0,0022	6,947
20	0,0428 ± 0,0031	6,834	0,0451 ± 0,0009	7,190
25	0,0429 ± 0,0021	6,850	0,0453 ± 0,0027	7,229
35	0,0432 ± 0,0019	6,899	0,0454 ± 0,0017	7,244
45	0,0433 ± 0,0023	6,904	0,0458 ± 0,0014	7,304
55	0,0434 ± 0,0012	6,927	0,0458 ± 0,0014	7,314
TN	0,6268 ± 0,0092		0,6268 ± 0,0092	

Le taux d'NPN final libéré par la présure est donné par plusieurs auteurs cependant les valeurs obtenues diffèrent d'un travail à un autre. RICHARDSON (1975) donne une augmentation du taux de NPN (% TN) de 4,2 % à 5,4, EMMONS *et al.*, (1990) donnent

un taux de 5,56% avec un taux initial de 5,17% et BARBANO et RASMUSSEN (1992) indiquent une augmentation du taux de NPN de 4,87 à 6,61 %. Cependant, l'augmentation du taux de NPN dans ces cas est inférieure à celle reportée par Garnier *et al.*, (1962) comme indiqué ci-dessus.

Il faut noter, d'autre part, que le taux d'NPN initial du lait que nous avons mesuré est relativement élevé (5,89 % de TN) par rapport à celui donné par ces auteurs. RICHARDSON (1975) donne deux valeurs de NPN égale à 4,2 et de 5,7 %, mesurées sur deux échantillons de lait différents.

Un taux d'NPN plus faible que celui donné par la présure à été observé avec La pepsine bovine. BARBANO et RASMUSSEN (1992) indiquent une augmentation du taux de NPN de 1,61 % par la pepsine bovine contre une augmentation de 1,73 % pour la présure. RICHARDSON (1975) indique une augmentation pour la pepsine bovine de 1 % contre 1,2 % pour la présure et qui demeurent constante pour les deux enzymes.

Toutefois, l'obtention d'un taux d'NPN stable après floculation et durant la phase de coagulation du lait par la pepsine est un indice d'une action spécifique et limitée. En effet, les protéases possédant une action protéolytique moins spécifique sur les caséines libèrent d'une manière continue de NPN soluble dans 12% de TCA. C'est le cas de la chymotrypsine et de la trypsine et de la papaïne (ALAIS, 1974, RICHARDSON, 1975). La protéase de *Mucor miehei*, donne également moins de NPN que la présure et cela jusqu'à plus de 60 min d'incubation. Cependant, cette protéase continue à libérer de NPN et la courbe de la protéolyse n'atteint pas un plateau (ALAIS, 1974). D'autre part, l'étude de son action sur la caséine κ par chromatographie phase inverse a montré que cette enzyme attaque plusieurs liaisons en plus de la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆. En effet, plusieurs liaisons au niveau de la para κ caséine sont attaquées et qui ont donné sept pics sur le chromatographe de l'HPLC phase inverse contre deux pics pour la chymosine (SHAMMET *et al.*, 1992).

Cependant, il est nécessaire de souligner que la mesure du taux d'NPN pour estimer l'hydrolyse de la caséine κ par les enzymes coagulants est basée sur le principe qu'une seule liaison peptidique est hydrolysée alors que d'autres liaisons au niveau de la caséine κ ou autres caséines peuvent être hydrolysées par les protéases. En effet, la mesure de NPN ne permet pas d'identifier à partir de quelle chaîne peptidique proviennent les

peptides libérées et qui peuvent donner un résultat comparable en NPN que la chymosine. Toutefois, la libération d'un taux de NPN qui demeure stable après floculation du lait est un indice d'une action spécifique et limitée de la protéase employée. D'autre part, la mesure du taux NPN libéré au cours de la phase de coagulation est souvent réalisée pour l'estimation du taux de protéines libérées et son effet sur le rendement fromager. Cette mesure est souvent complétée par mesure du taux de protéines totales libérées dans le lactosérum ou bien par mesure des protéines solubles à pH 4,6. Cela permet de mettre en évidence la libération de peptides de poids moléculaires plus élevés, insolubles à 12% de TCA (EMMONS et *al.*, 1990 ; EMMONS et BINNS, 19990 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992).

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

Notre travail a porté sur l'extraction de la pepsine à partir de proventricules de poulet, l'étude de ces propriétés coagulantes et protéolytique et les possibilités d'assurer la conservation de l'extrait.

L'extrait clarifié de pepsine de poulet obtenu, selon le digramme appliqué, a une activité coagulante de 8,36 U.A.C /ml. L'activité coagulante de cet extrait est égale à 2579 (litre de lait coagulé par litre d'extrait). Ce niveau d'activité semble faible comparé aux extraits liquides de présure commercialisés qui sont généralement de force 10 000 (l/l).

Durant l'activation du pepsinogène à pH 2,0 et à 25°C, 78% de la pepsine activé après 60min est obtenu à partir de 15min d'activation. Cette durée d'activation est celle indiqué dans le protocole appliqué. Après 30 et 45min d'activation, dans les mêmes conditions, le taux de pepsine activé atteint 82 et 94% respectivement.

Le temps de macération de 3h à 25 °C semble suffisant pour assurer l'extraction du maximum de la pepsine (ratio proventricules à la solution d'extraction de 1:3 p/v). A partir de ce temps, le taux d'extraction tend à se stabiliser.

Pour la zone de pH étudié (5,8-7,0) à 30 °C , la pepsine et la présure ont montré une activité maximale à pH 5,8. Pour les valeurs de pH de 5,8 à 6,4, L'activité coagulante de la pepsine de poulet est plus favorisée par l'abaissement du pH du lait comparé à la présure. L'activité mesurée pour la pepsine à pH 5,8 est 3,35 fois celle obtenue à pH 6,4 contre une augmentation au double pour la présure. Aux valeurs de pH supérieures à 6,4, l'activité coagulante diminue au fur et à mesure de l'augmentation du pH du lait, pour les deux enzymes. A cette zone de pH, la pepsine de poulet montre une sensibilité à la variation du pH comparable à celle de la présure. Les deux enzymes étudiés montrent encore une faible activité coagulante à pH 7,0.

La pepsine de poulet et la présure ont montré une activité maximale à 55 et 50 °C, respectivement (à pH 6,4). L'augmentation de la température du lait entraine une amélioration très nette de l'activité coagulante de la pepsine. De 30 à 55°C, une hausse de la température

de 5°C entraîne une augmentation en moyenne de 0,74 de l'activité coagulante pour la pepsine et de 0,4 pour la présure (de 30 à 50°C).

Le temps de floculation est inversement proportionnel à la concentration en pepsine est cela pour les valeurs de concentration comprises entre 0,011 à 0,200 mg/ml de lait (pH 6,4, 30 °C). Pour les concentrations en pepsine de 0,200 à 4,00 mg/ml de lait, le temps de floculation est de plus en plus court et tend vers une valeur constante. La variation du temps de floculation en fonction de la concentration en présure suit la même tendance, pour la même marge de concentration.

La pepsine de poulet montre une activité protéolytique limitée au cours de la phase de la coagulation. Cette activité se traduit par la libération de NPN au cours de la phase enzymatique de coagulation. Le taux de NPN atteint demeure constant après 20min d'activation indiquant une activité protéolytique spécifique et limitée de la pepsine. Cependant le taux de NPN final obtenu pour la pepsine de poulet n'a pas excédé celui obtenu par la présure. Nous avons mesuré un taux final de NPN/NT de 6,927 % et de 7,314 % pour la pepsine de poulet et la présure respectivement avec un taux initial de 5,89%.

La conservation par congélation permet une meilleure préservation de l'activité coagulante comparée à la réfrigération pour l'extrait clarifié et concentré de pepsine de poulet. L'extrait concentré de pepsine de poulet conserve mieux son activité coagulante au cours de la conservation, par réfrigération ou congélation, comparé à l'extrait clarifié non concentré. Toutefois, la concentration n'apporte qu'une légère amélioration de la conservation de l'extrait de pepsine conservé par réfrigération et congélation.

La pepsine de poulet séchée retient 93.3% de l'activité coagulante initiale, après séchage. Au cours de la conservation, la poudre de pepsine séchée a conservé 75,74% de son activité coagulante initiale.

La pepsine de poulet a retenu, après lyophilisation, 90.82% de son activité coagulante initiale. L'addition du lactose à raison de 5% (p/v) de l'extrait concentré traité n'apporte qu'une légère amélioration de la stabilité de la pepsine au cours de la lyophilisation avec 93,25 % de l'activité coagulante initiale récupérée. Au cours d'une durée de conservation de 56 jours la poudre lyophilisée de pepsine de poulet a conservé 80,25% de son activité coagulante. Toutefois, la poudre de pepsine lyophilisée a montré une stabilité meilleure que

celle de la poudre séchée. Cependant, il est nécessaire de souligner qu'une durée de conservation de 56 jours n'est pas suffisante pour apprécier la stabilité d'une enzyme conservée à l'état déshydraté.

Ces résultats ne constituent qu'une première approche. Des études portant sur plusieurs aspects doivent être réalisées tels que

- l'étude des différents facteurs influençant l'extraction de la pepsine à partir de proventricules de poulet d'optimiser les conditions d'extraction.
- la pepsine de poulet a montré une bonne stabilité au cours du séchage. Ainsi l'étude de ce mode de conservation pourrait aboutir à des résultats satisfaisants.

- l'utilisation de la pepsine de poulet dans la fabrication des principaux types de fromage est nécessaire. L'étude doit permettre la mise en évidence de l'effet de l'enzyme sur la qualité du fromage depuis l'étape de coagulation jusqu'à l'affinage. En effet, l'emploi de la pepsine dans les conditions réelles de fabrication de fromage permettra une meilleure approche de l'effet de cet enzyme sur le rendement fromager et sur les qualités organoleptiques du produit fini.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

ALAIS, C. (1974)

Science du lait ; principes des techniques laitières, 3^{ème} ed., Publicité Sep, 807p

ALAMAREOT J. (1982)

Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaire, édition du point vétérinaire-Alfort 1982 289p

ANDREEVA, N.S., and RUMSH, L.D. (2001)

Analysis of crystal structures of aspartic proteinases : on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes

Protein Sci. 10:2431-2450

ANIFANTAKIS, E., AND GREEN, M.L. (1980)

Preparation and properties of rennets from lamb's and kid's abomasa.

Journal of Dairy Research. 47: 221-230

ANTONINI, J., et RIBADEAU DUMAS, B. (1971)

Isolement, purification et propriétés de deux zymogènes gastriques bovins, propriétés des protéases correspondants.

Biochimie, 53:321-329.

BARBANO, D. M., and RASMUSSEN, R. R. (1992)

Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants

J.dairy Sci. 75:1-12.1992.

BELDARRAÍN, A., ACOSTA, N., MONTESINOS, R., MATA, M., and CREMATA, J. (2000)

Characterization of *Mucor pusillus* rennin expressed in *Pichia pastoris*: enzymic spectroscopic and calorimetric studies

Biotechnol. Appl. Biochem. 31:77-84

BERRIDGE, N. J. (1955)

Purification and assay of rennin

In:Methods in enzymology, Acad.Press Inc., New York ,V. 2, p. 69-77, 987p.

BOHAK, Z. (1970)

Chicken pepsinogen and chicken pepsin

In: Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes. Ed.,G. E. Perlmann and L. Lorand, Acad.Press Inc., New York, V. 19, p.347-358, 1042 p.

BOHAK, Z. (1969)

Purification and characterisation of chicken pepsinogen and chicken pepsin

J. biological chemistry.Vol. 244, N°.17: p.4638-4648

BARBANO, D. M., and RASMUSSEN, R. R. (1992)

Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants

J.dairy Sci. 75:1-12.

BRULE, G., LENOIR, J., et REMEUF, F. (1997)

La micelle de caséine et la coagulation du lait

In: Le fromage. Ed., A. Eck, 3^{ème} ed., Technique et documentation Lavoisier, Paris, p.7-41, 891p.

CARPENTER J., F., PRESTRELSKI, S., J., and ARAKAWA, T. (1993)

Separation of freezing and drying induced denaturation of lyophilized proteins using stress specific stabilization.

Archives of biochemistry and biophysics Vol. 303, N°2 : 456-464.

CAYOT, P., et LORIENT, D., (1998)

Structures et techno-fonctions des protéines du lait. Technique et documentation Lavoisier, 363 p.

CHOW, R.B., and KASSELL, B. (1968)

Bovine pepsinogen and pepsin. I- Isolation, purification and some properties of the pepsinogen
The Journal of Biological Chemistry Vol. 243, N° 8:1718-1724

CREAMER, L.K. (2002)

Casein nomenclature, structure and association properties

In: Encyclopedia of Dairy Science, Ed., H. Royinski, J. Fuquay, and P. Fox, Elsevier science Ltd, p.1895-1902

CUVELIER, G.F. (1993)

Production des enzymes

In: Biotechnologie. Ed., R. Scribon, 4^{ème} ed., Technique et documentation Lavoisier, p.948

DALGLEISH, D.G. (1982)

The enzymatic coagulation of milk

In: Developments in dairy chemistry –1 Protéins, Ed. P.F Fox. Applied science publishers LTD, London et New York, p.157-187, 409p.

DALGLEISH, D.G., and HOLT, C. (1988)

A geometrical model to describe the initial aggregation of partly renneted casein micelles.
Journal of colloid and Interface Science vol. 123 N° 1:80-84

DALGLEISH , D.G. (1997)

The enzymatic coagulation of milk

In: Advanced in dairy chemistry -1, proteins, Ed., P.F.Fox , Blackie and Son Ltd,p.579-619

DALGLEISH, D.G. (1998)

Casein micelles as colloids : surface structures and stabilities

J. Dairy Sci.81:3013-3018

DALGLEISH, D.G., SPAGNUOLO, P.A., et GOFF, H.D. (2004)

A possible structure of casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy.

International Dairy Journal 14:1025-1031

DAVE, R.I., MC MAHON, D.J., OBERG, C.J., and BROADBENT, J.R. (2003)

Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of mozzarella cheeses made using direct acidification.

J. Dairy Sci. 86: 114-116

DONTA, S.T., and Van VUNAKIS, A (1970)

Chicken pepsinogens

In: Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes. Ed. G. E. Perlmann and L. Lorand, Acad. Press. Inc., New York, V. 19, p.358-363, 1042 p.

EL-ABBASSY F., and WAHBA, A. (1988)

Milk clotting and proteolytic activities of chicken pepsin (Abstract)

Alexandria-Journal-of-Agricultural-Research. 31:173-181, Base de données: FSTA
Rétrospective 1969-1989

EMMONS, D. B., BECKETI, D. C. and BINNS, M. (1990)

Milk-Clotting Enzymes. 1. Proteolysis During Cheese Making in Relation to Estimated Losses of Yield

J. Dairy Sci. 73:2007-2015

EMMONS, D. B., and BINNS, M. (1990)

Cheese yield experiments and proteolysis by milk-clotting enzymes

J. Dairy sci. 73: 2028-2043

ERNSTROM, C.A., and WONGT, N.P. (1983)

Milk clotting enzymes and cheese chemistry.

In: Fundamentals on dairy chemistry. Ed., B.H. Webb, A.H. Johnson and J.A. Alford .2^{ème} ed., the Avi publishing Company Inc, p. 662-771, 929p.

ERSKINE, P.T., COATES, L., MALL, S., GILL, R.S, WOOD, S.P. MYLES, D.A., and COOPER, J.B. (2003)

Atomic resolution analysis of the catalytic site of an aspartic proteinase and an unexpected mode of binding by short peptides

Prot. Sci. 12:1741-1749.

FAO (1991)

Guide to specification, Milk clotting activity

FAO and Food nutrition paper, p.172-178.

FEDERICI, F. (1982)

Comparative study of some properties of a new milk coagulating enzyme and two commercial rennets

In: Utilisation des enzymes en technologie alimentaire. Ed., P. Dupuy, Technique et documentation Lavoisier p. 281-286.p.555.

FOLTMANN, B. (1971)

The biochemistry of prorennin and rennin (chymosin)

In: Milk proteins, chemistry and molecular biology. Ed., H.A. Mc Kenzie V. II, Academic press, p. 217-252.

GAIASCHI, A., BERETTA, B., POIESI, C., CONTI, A., GIUFFRIDA, M.G, GALLI, C.C., and RESTANI, P. (2000)

Protéolysis of α s-casein as a marker of Grana Padan cheese ripening.

J. Dairy Sci. 83:2733-2739.

GORDIN, S., and ROSENTHAL, I. (1978)

Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme
Journal of food Protection 41:684-688

GRAPPIN, R., DUPONT, D., and LEFIER, D. (2002)

Analytical methods
In: Encyclopedia of Dairy Science, Ed., H. R. oyinski, J.Fuquay and P.Fox, Elsevier science Ltd, p. 1967-1976

CREEN, M.L., and LLEWELLIN, J.M (1973)

The purification and properties of a single chicken pepsinogène fraction and the pepsin derived from it
Biochem.J. 133:105-115

CREEN, M.L., and FOSTER, P.M.D. (1974)

Comparaison of the rates of proteolysis during ripening of cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants
Journal of Dairy Research, 41: 269-282

GREEN, M.L., VALLER, M.J., and KAY, J. (1984)

Assessment of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin préparations.
J. dairy Research 51:331-340

GUILLOU, H., PELISSIER, J.P., et GRAPPIN, R. (1986)

Méthodes de dosage des protéines du lait de vache
Le lait 66:143-175.

HAARD, N.F., SHAMSUZZAMAN, K., BREWER, P., et ARUNCHALAM, K. (1982)

Enzymes from marine organisms as rennet substitutes
In : Utilisation des enzymes en technologie alimentaire. Ed., P.Dupuy. Technique et documentation Lavoisier p237-242.

HARRIS, E.L.V. (1989)

Clarification and extraction
In: Protein purification methods. E.L.V. Harris and S. Angal, Oxford University press, p. 67-125, 315p.

HORBOE, M., ANDERSEN, P.M., and FOLTMANN, B. (1974)

The activation of bovine pepsinogene
The journal of biological chemistry 249:4487-4491

HORNE, D.S. (1998)

Casein interaction: casting light on the black boxes, the structure in dairy products.
Int. Dairy Journal 8:171-177

HORNE, D.S. (2002)

Casein structure, self assembly and gelation
Current opinion in colloid and interface science 7:456-461

HYNES, E.R., MEINARD, C.A., SABBAG, N., CATTARIO, T., CANDIOTI, M.C., and ZALAZAR, C.A. (2001)

Influence of milk clotting enzymes concentration on the α_{s1} -casein hydrolysis during soft cheeses ripening

J. dairy Sci. 84: 1335-1440

IZUTSU, K.I., AOYAGI, N., and KOJIMA, S. (2004)

Protection of protein secondary structure by saccharides of different molecular weights during freeze-drying.

Chem. Pharm. Bull. 52:199-203

KAYAGEMA, T., and TAKAHASHI, K. (1976)

Pipsinogène and pepsin from gastric mucosa of japenese monkey

J.Biochem., 79:455-468.

KIM, S. Y., GUASEKARAN, S.,and OLSON, N.F. (2004)

Combined use of chymosine and protease from *Cryphonectria parasitica* for control of meltability and fermness of cheddar chesse

J. Dairy Sci. 87: 274-283

KRUIF, C.G. (1999)

Casein micelles interaction

International Dairy Journal 9:183-188

LARBIER M et LECLERC B. (1992)

Nutrition et alimentation des volailles : physiologie digestive. INRA Pqris 1992.

LARSSON, K.I., ANDREN, A., GEURTS, T.J., DE ROOS, A.L., and. WALSTRA, P. (1997)

Association of chymosine with artificial casein micelles as influenced by micelle composition and pH.

International Dairy Journal. 7:43-46.

LÉONIL, J., BOS, C., MAOBOIS, J-L., TOMÉ, D (2001)

Le lait est ses constituants : biodisponibilité et valeur nutritionnelle 1 protéines

In : Lait, Nutrition et santé. Ed., G. Debry. Tec et Doc. P.41-83,566p.

LUCEY, J.K.(2002)

Rennet coagulation of milk

In: Encyclopedia of Dairy Science.Ed., H. Royinski, J.Fuquay and P.Fox, Elsevier science Ltd, p. 286-293

MARTIN, P., COLLIN, J.C., CARNOT, P., RIBADEAU DUMAS, B., et MOCQOT, C. (1982)

Methode d'analyse quantitative des extraits de présure et de pepsine bovine , détermination des teneurs en enzymes actifs

In: Utilisation des enzymes en technologie alimentaire. Ed., P. Dupuy, Lavoisier, p287-292, 555p.

MATIEU, J. (1998)

Initiation à la physicochimie du lait, Tec et Doc, 220p.

MC MAHON, D.J., and BROWN, R.J. (1990)

Development of surface functionality of casein particles as the controlling parameter of enzymic milk coagulation.

Colloids and surfaces, 44:263-279

MILLQVIST-FUREBY, A., MALMSTEN, M., and BERGENSTAHL, B. (1999)

Spray-drying of trypsin- surface characterisation and activity preservation

International Journal of pharmaceutics 188:243-253

MOSCHOPOULOU, E. (2004)

Effect of extraction conditionq on the characteristics of the traditional lamb rennets

Greek Journal of Dairy Science &Technology 1:27-42

NAJERA, A.J., de RENOBALLES, M., and BARRON, L.J.R. (2003)

Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet clotting properties of milk; a multifactorial study

Food Chemistry 80: 345-352

O'KEEFFE, A.M., FOX, P.F. and DALY, C. (1978)

Proteolysis in cheddar cheese: Role of coagulant and starter bacteria

Journal of Dairy reseaech 45: 465-477.

PAYENS, T.A.J. WIERSMA, A.K, and BRINKHUIJS, T. (1977)

On en zymatic clotting process I. kinetics of enzymz-triggered coagulation reactions

Biophysical chimistry 6:253-261

PAYENS, T.A. (1989)

The enzyme- triggered coagulation of casein micelles

Advances in Colloid and interface Science 30:31-69

PERLES, R., et COURTOIS, J.E. (1964)

Les protéases acides

In: Les enzymes ; traité de biochimie générale Ed., M. Javillier, V. 2, Masson, p. 481-516

POUGHEON, S., and GOURSAUD, J. (2001)

Le lait et ses constituants : caractéristiques physicochimiques

In: Lait, nutrition et santé. Ed., G. Débry, Techniques et documentation, p. 4-41, 566p.

RAMET, J.P. (1997)

Les agents de transformation du lait; la présure et les enzymes coagulantes

In: Le fromage. Ed., A. Eck, 3^{ème} ed., Technique et documentation Lavoisier, p.101-107, 539p.

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S, AND. DESHPANDE, V. V. (1998)

Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases

RICHARDSON, G.H. (1975)

Rennin and the formation of milk curd

In: Enzymes in food processing. Ed., G.Reed. Academic press, p. 362-391, 573p.

RICHTER, C., TANAKA, T., and YADA, R.Y (1998)

Mecanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin.

Biochem.J. 335:481-490

RICK, W.,and FRITSCH, W.P. (1974)

Pepsin (Pepsin, gastricsin, pepsinogen, Uropepsinogen)

In: Méthodes of enzymatic analysis. Ed., H.U. Bergmeyer et K. Gawehn, V.2, Verlag chemie GmbH, Weinheim, p.1047-1051

RUDAN, M.A., BARBANO, D.M., YUN J.J. and KINDSTEDT, P.S. (1999)

Effet of fat reduction on chimalical composition, protéolysis, fonctionnality and yield of Mozzarila cheese

J. Dairy. Sci. 82:661-672

SANNY, C.G., HARTSUCK, J.A., and TANG, G. (1975)

Conversion of pepsinogen to pepsin

The Journal of Biological Chemistry Vol.250, No. 7: 2635-2639

SCHMIDT, D.G. (1982)

Association of caseins and casein micelle structure

In: Developments of dairy chemistry1-proteins. Ed., P. F. Fox, Applied science publishers LTD, p. 61-86.

SEPULVIDA, P., MARCINISZUN, J., IANE LIU, J.R., TANG, D J. (1975)

Primary structure of porcine pepsin

III-Amino acid sequence of a cyanogen bromide fragment, CB2A and the complete structure of porcine pepsine

The journal of biological Chemistry Vol. 250, N° 13: 5082-5088

SHAMMET, K. M., BROWN, R. J., and MC MAHON, D. J. (1992)

Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on κ -casein

J. Dairy Sci. 75 : 1373-1379

SHAMMET, K. M., BROWN, R. J., and MC MAHON, D. J. (1992)

Proteolytic activity of proteinases on macropeptide isolited from κ - casein

J dairy Sci. 75:1380-1388

SILVA, S.V., and MALCATA, F.X. (2005)

Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *cynara-cardunculus*

Food Chemistry 89 (2005) 19-26

SOUSA, M.J., ARDO, Y., and MCSWEENEY, P.L.H. (2001)

Advances in the study of proteolysis during cheese ripening
International Dairy Journal 11: 327-345.

SOUSA, M.J., and MALCATA, F.X. (2002)

Advances in the role of a plant coagulant (*Cuanara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species
Lait 82:151-170

TRUJILLO, A.J., GUAMIS, B., LAENCINA, J., and LOPEZ, M.B. (2000)

Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein.
Food chemistry 71: 449-457.

VASBINDER, A. J., ROLLEMA, H. S., and DE KRUIF, C. G. (2003)

Impaired Rennetability of Heated Milk; Study of Enzymatic Hydrolysis and Gelation Kinetics
J. Dairy Sci. 86:1548-1555

VASILJEVIC T. and JELEN, P. (2004)

Drying and storage of crude B-galactosidase extracts from *Lactobacillus delbrucki ssp bulgaricus* 1182
Innovative food Science and emerging technologies 4: 319-329

VEISSEYRE, R. (1979)

La technologie du fromage, 3^{ème} ed., la maison Rustique, Paris, 714

WALSTRA, P., BLOOMFIELD, V.A., WEL, G J, and JENNESS, R. (1981)

Effet of chymosin action on the hydrodynamique diameter of casein micelles
Biochimia and Biophysica Acta, 669: 258-259

WALSTRA, P., (1999)

Casein sub-micelles: do they exist?
International Dairy Journal 9: 189-192

WANGO, J., FARAH, Z., PUHAN, Z. (1993)

Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract.
Milchwissenschaft Vom.48, N°6:322-325

WILKINSON, M.G., and. KILCAWLEY, K.N (2004)

Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening
International Dairy journal 15: 817-830.

YAMAMOTO, A.(1975)

Proteolytic enzymes
In: Enzymes in food processing. Ed., G. Reed, 2^{ème} ed, Academic press p.124-179,573 p.

YAMASHITA, T., HIGASHI, S., HIGASHI, T., MACHIDA, H., IWASAKI, S., NISHIYAMA, M., and BEPPU, T. (1994)

Mutation of fungal aspartic proteinase, *Mucor pusillis* rennin, to decrease thermostability for use as a milk coagulant.

Journal of biotechnology 32:17-28

YU, J., TAMURA, G., et ARIMA, K. (1969)

Milk-clotting enzyme from microorganisms

VI-Properties of crystalline milk-clotting enzyme (Mucor rennin) isolated from *Mucor pisillus* Varlindt.

Biochim., Biophys., Acta, 171 : 138-144

Site internet

www.FAOSTAT.org.

www.FAO.org

FAO (1988)

LAMBERT, J., C. La transformation laitière au niveau villageois

Etude FAO production et santé animaux, 69.

RESUME

Le but de la présente étude est l'extraction de la pepsine à partir de proventricules de poulet en vue de son utilisation dans la coagulation du lait. Les propriétés coagulantes et protéolytiques de la pepsine de poulet sont étudiées ainsi que la possibilité de conservation de la pepsine extraite.

L'extraction est réalisée par macération de fragments de proventricules dans une solution saline (3% de NaCl). L'activité coagulante de la pepsine de poulet est déterminée par mesure du temps de floculation du lait, l'effet du pH de la température et de la concentration en enzyme est étudié. L'activité protéolytique est évaluée par dosage du taux de NPN libéré au cours de la coagulation du lait. La conservation de la pepsine de poulet est réalisée par réfrigération, congélation, séchage sous vide partiel ou lyophilisation.

L'extrait clarifié de pepsine de poulet obtenu, selon le digramme appliqué, a une activité coagulante de 8,36 UAC /ml. La force coagulante de cet extrait est égale à 2579 (litre de lait coagulé par litre d'extrait).

Pour la zone de pH étudié (7,0-5,8), l'abaissement du pH du lait favorise l'activité coagulante de la pepsine et la présure. L'influence du pH du lait est plus marquée pour la pepsine que pour la présure.

La pepsine de poulet et la présure ont montré des activités coagulantes maximales à 55 et 50 °C, respectivement. L'augmentation de la température du lait a montré une amélioration très nette de l'activité coagulante de la pepsine.

Le temps de floculation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme et varie d'une manière comparable pour la pepsine et la présure.

Le taux de NPN libéré au cours de la floculation du lait par la pepsine est plus faible que celui libéré par la présure. Jusqu'à 60min d'incubation le taux de NPN produit par la pepsine demeure constant indiquant une activité protéolytique spécifique et limitée.

La conservation par congélation permet une meilleure préservation de l'activité coagulante comparée à la réfrigération pour l'extrait clarifié et l'extrait concentré de pepsine de poulet.

La pepsine de poulet conserve plus de 90 % de son activité au cours du séchage sous vide partiel ou lyophilisation. Durant la conservation de 56 jours, la pepsine séchée sous vide partiel et lyophilisée préserve 80,25 et 75,74% de son activité coagulante, respectivement.

Suite à ces résultats l'étude de l'utilisation de la pepsine de poulet dans la fabrication de différents types de fromage doit être envisagée.

Mots clés: Pepsine de poulet, extraction, conservation, activités coagulantes et protéolytiques.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو استخراج إنزيم الببسين(pepsine) من الجهاز الهضمي للدجاج بغية استعماله لتخثير الحليب. المحاور التالية تمت درستها :..قدرة الببسين على تخثير الحليب ، نشاط الببسين لهدم البروتينات و إمكانية حفظ مستخلص الببسين.

استخلاص إنزيم الببسين تمت بوضع قطع من البطين المفرز(proventricule) في سائل مملح لمدة 3 ساعات قدرة الببسين على تخثير الحليب تقاس بحساب زمن تخثر الحليب. كما تمت دراسة. تأثير pH ، الحرارة ، و كمية الإنزيم على قدرة التخثير. دراسة نشاط الببسين لهدم البروتينات تمت بقياس قيمة النتروجين الغير البروتيني"NPN" المحرر أثناء تخثير الحليب بالببسين. مستخلص الببسين تم حفظه بالتبريد ، بالتجميد و التجفيف. تحت ضغط منخفض (séchage sous vide partiel) والتجفيف تحت ضغط منخفض وحالة تجمد (lyophilisation)

مستخلص الببسين المصفى يحتوي على 8,36 وحدة تخثير الحليب في مل. قدرة الببسين المقاسة تعادل 2579 لتر من الحليب المخثر لكل لتر من المستخلص.

تخفيض pH الحليب من 7,0 - 5,8 يؤثر ايجابيا على قدرة تخثير الحليب لكل من ببسين الدجاج و نفحة العجل (présure). ببسين الدجاج يظهر تأثير اكبر لتغير pH الحليب.

كل من ببسين الدجاج و نفحة العجل اظهر قدرة على تخثير الحليب قصوى عند درجة الحرارة 55 و 50 بترتيب. ارتفاع درجة حرارة الحليب يؤثر بصفة خاصة على ببسين الدجاج.

زمن تخثر الحليب يتغير عكسيا مع تغير كمية الإنزيم المضافة إلى الحليب لكل من ببسين الدجاج و نفحة العجل

قيمة النتروجين الغير البروتيني"NPN" المحرر أثناء تخثير الحليب بالببسين اقل من تلك الناتجة من طرف نفحة العجل. كمية النتروجين الغير البروتيني المحررة من قبل الببسين تبقى ثابتة مما يدل على أن الببسين يملك نشاط لهدم البروتينات محدد.

عملية تجميد مستخلص الببسين المصفى و مستخلص الببسين المركز تمكن من حفظ قدرة الببسين على تخثير الحليب أفضل من عملية التبريد.

مستخلص الببسين المركز يحافظ على اكثر من 90 % من قدرة الببسين الابتدائية على تخثير الحليب أثناء التجفيف تحت ضغط منخفض (séchage sous vide partiel). والتجفيف تحت ضغط منخفض وحالة تجمد (lyophilisation).

بعد مدت حفظ 56 يوم مستخلص الببسين المجفف تحت ضغط منخفض يحافظ على 75,74 % من قدرته الابتدائية على تخثير الحليب ، بينما مستخلص الببسين المجفف تحت ضغط منخفض وحالة تجمد (lyophilisation) يحافظ على 80,25 % من قدرته.

الكلمات الدالة : ببسين الدجاج ، استخلاص ، حفظ ، قدرة تخثير الحليب ، نشاط هدم البروتينات

Summary

The aim of this present study is pepsin extraction from forestomach of chicken for use as milk coagulant. Proteolytic and clotting properties of pepsin and enzyme activity during conservation of the pepsin extract are studied.

The chicken pepsin is extracted by maceration of the forestomach tissues in a saline solution (3% NaCl). Milk clotting activity of this enzyme is assessed by milk clotting time. The effect of pH, temperature and enzyme concentration abate clotting activity are studied. Proteolytic activity is estimated by titration of the non protein nitrogen (NPN) released during milk clotting. Four methods were studied for pepsin extract conservation: refrigeration, freezing (-18°C), vacuum drying (45°C, 200mbar) and freeze-drying.

Milk clotting activity of clarified chicken pepsin extract obtained is 8.36 MCAU/ml. The strength of this extract is 2579 (litre of clotted milk per litre of extract).

Decrease milk pH between 7.0-5.8 is favourable for milk clotting activity of both chicken pepsin and trade calf rennet. The chicken pepsin is more sensitive to pH shift.

Maxima milk clotting activities of chicken pepsin extract and trade calf rennet are observed at 55 and 50°C, respectively. The chicken pepsin is more temperature sensitive than calf rennet.

A good inverse proportionality relation between the amount of enzyme and clotting time is obtained for both enzymes.

The rate of NPN released during the clotting of milk with pepsin is less than that released with calf rennet. The NPN released by pepsin stays constant after 20 min of action which indicates limited specific proteolytic activity.

For clarified and concentrated pepsin extract, freezing is more preservative of milk clotting activity than refrigeration.

More than 90 % of initial milk clotting activity of pepsin is recovered after vacuum drying or freeze-drying. After 56 days of conservation the freeze-dried and vacuum dried pepsin pepsins keep 80.25 and 75.74% of their initial milk clotting activity, respectively.

Keywords: chicken pepsin, extraction, conservation, milk clotting activity, proteolytic activity