

PEPSINE DE POULET : EFFETS COAGULANT ET PROTEOLYTIQUE SUR LES CASEINES DU LAIT

F.A. Benyahia¹, O. Aissaoui-Zitoun¹, B. Meghzili¹ & M.N. Zidoune²

¹Laboratoire du Génie Agro-Alimentaire (GENIAAL

²Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A-TEPA), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Université des frères Mentouri, Constantine 1, Route Ain El Bey, Constantine-25000, Algérie

ferialaziza@yahoo.fr

RESUME

La présente étude vise la détermination du pouvoir coagulant et l'action protéolytique de la pepsine de poulet sur les caséines du lait. La méthodologie suivie s'est basée sur la détermination du temps de floculation des caséines, leur précipitation à pH 4,6 en solution de TCA pour exprimer les variations d'azote non caséinique (NCN : non-casein nitrogen), et l'azote non protéique (NPN : non-protein nitrogen). Ces variables sont comparées à la présure, enzyme de référence en fromagerie. Les paramètres étudiés ont été déterminés après action de chaque enzyme sur les caséines dans un intervalle de temps de 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, et 24 h respectivement. Les résultats ont montré qu'un litre de l'extrait brut de pepsine obtenu à partir de 400 g de proventricules coagule environ 13142 litres de lait. Cette même quantité de lait pourrait être coagulée dans les mêmes conditions par 0,18 litres de présure de force (1 : 70815). D'autre part, la libération de NPN n'a pas montré une distinction significative entre l'action de la pepsine ou la présure, mais une différence notable ($p < 0,05$) a été enregistrée dans les taux d'évolution de NCN entre les deux enzymes. En effet, le taux de protéolyse après 24 h de coagulation par rapport à l'azote total (TN) exprimé par le rapport NPN/TN en % par la pepsine et la présure était respectivement $7,99 \pm 0,12$ & $7,93 \pm 0,16$ et exprimé par le rapport NCN/TN en % $25,51 \pm 0,34$ & $16,53 \pm 0,38$. Le proventricule, estomac chimique, source de pepsine de poulet et en partie jeté lors de l'abattage, pourrait être valorisé et éventuellement utilisé pour coaguler environ 24,6 milliards de litres de lait/an.

Mots clés : pepsine de poulet, valorisation, coagulation du lait, protéolyse.

ABSTRACT

Chicken pepsin: coagulant and proteolytic effects on milk caseins

The present study aims to determine the coagulating strength and the proteolytic action of chicken pepsin on milk caseins. The methodology followed is based on the determination of the caseins flocculation time, their precipitation at pH 4.6 in TCA solution to express variations of non-casein nitrogen (NCN) and non-protein nitrogen (NPN). These parameters are compared to rennet, the reference enzyme in cheese-making. The parameters studied were determined after action of each enzyme (pepsin or rennet) on caseins in a time interval of 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, and 24 h respectively. Results showed that one liter of crude pepsin extract obtained from 400 g of proventriculi coagulates approximately 13142 liters of milk. This same quantity of milk could be coagulated under the same conditions by 0.18 liters of rennet with coagulating strength 1:70815. On the other hand, the release of NPN did not show a significant difference distinction between the action of pepsin or rennet, but a considerable difference ($p < 0.05$) was noted in the evolution rates of NCN between the two enzymes. Indeed, the rate of proteolysis after 24 h of coagulation compared to total nitrogen (TN) expressed by the NPN/TN ratio in % by pepsin and rennet was respectively 7.99 ± 0.12 & 7.93 ± 0.16 and expressed by the NCN/TN ratio in % 25.51 ± 0.34 & 16.53 ± 0.38 . The proventriculus, chemical stomach, source of chicken pepsin and partly discarded during slaughter, could be recovered and possibly used to coagulate around 24.6 billion liters of milk/year.

INTRODUCTION

La coagulation du lait pour la fabrication de fromages traditionnels est réalisée avec de la présure de caillotte de ruminants. La présure de veau est la plus utilisée dans le monde (Moschopoulou *et al.*, 2007 ; González-Velázquez *et al.*, 2021 ; Liu *et al.*, 2021 ; Rajagopalan *et al.*, 2021). Ces dernières années, le nombre de jeunes veaux, sources de présure traditionnelle a diminué, tandis que la production de fromage dans le monde augmente continuellement. La recherche de substituts de présure est en cours pour pallier aux problèmes des prix élevés et des ressources en quantités limitées d'estomacs de ruminants (Esteves *et al.*, 2001 ; Afsharnezhad *et al.*, 2019 ; Rajagopalan *et al.*, 2021). Toutes les enzymes commerciales utilisées comme coagulants du lait sont des protéinases aspartiques, (Silva *et al.*, 2002 ; Rocha *et al.*, 2021). Parmi ces protéases se trouve la pepsine de poulet (EC.3.4.23.1) qui peut être extraite des préestomacs de poulets dans l'industrie avicole. La promotion de l'extraction de la pepsine de poulet serait justifiée en Algérie du fait de sa facilité de valorisation et de sa disponibilité liée à l'expansion de l'aviculture (250 000 tonnes/an) et de la production laitière (355 000 tonnes/an) (FAO, 2019). Nous avons donc jugé nécessaire d'extraire cette pepsine de poulet, de déterminer son pouvoir coagulant et de caractériser ses aspects protéolytiques en estimant l'évolution de la libération de NPN (non-protein nitrogen) et de NCN (non-casein nitrogen).

MATERIEL & METHODES

1. Lait écrémé

La poudre de lait écrémé obtenue par le procédé moyen chauffage (medium heat) (Molochansk Dairy, Ukraine) a été reconstituée à 12 % (p/vol.) dans de l'eau distillée et équilibrée pendant une nuit à 4°C. De l'azide de sodium (0,04 % p/vol.) a été ensuite rajouté pour empêcher la croissance microbienne.

2. Enzymes coagulantes

2.1. Extrait de pepsine de poulet : l'extraction de pepsine a été réalisée selon le protocole de Bohak (1970). Cent grammes de proventricules de poulet ont été broyés dans 300 mL de solution constituée de 30 g de NaCl et 7g de NaHCO₃ par litre de solution. Ensuite le mélange a été agité pendant 3 heures à 4°C. Après filtration sur gaze (0,5 mm), l'extrait brut a été acidifié avec HCl 3N jusqu'à pH 2 pour activer la pepsine en 30 min., puis le pH a été réajusté à 6,6 avec NaOH 1N.

2.2. Présure : la poudre commerciale de présure bovine (MARSCHALL, Rhodia-Food France) contient au minimum 75 % de chymosine.

3. Tests d'activité enzymatique

Pour ce test, un mL de solution diluée de pepsine de poulet ou de présure a été ajouté à des volumes de 10 mL de lait écrémé réchauffé (substrat Berridge) pour la coagulation à 30°C dans des tubes à essai. Le temps de coagulation a été déterminé lorsque les premiers flocons visibles sur la surface de verre en mouvement, sont apparus. En raison de leur différence de concentration enzymatique, l'extrait de pepsine de poulet et la solution de présure commerciale ont été dilués pour limiter le temps de coagulation du lait de 5 à 6 minutes (Green *et al.*, 1984). L'activité de coagulation du lait a été exprimée en unité de présure (UP) et la force coagulante en unité Soxhlet (US) (Alais, 1984).

$$\text{Activité coagulante (UP mL}^{-1}\text{)} = (10 \times V)/(T \times v)$$

Où UP: unité présure, V : volume de lait, v : volume d'enzyme, T : temps de coagulation du lait (s).

La force coagulante a été estimée en unités Soxhlet (US) en utilisant l'activité de coagulation du lait (Alais, 1984)

$$\text{Force coagulante} = \text{Activité coagulante} / 4,16 \cdot 10^{-3}$$

4. Suivi de la protéolyse : L'activité protéolytique dans les gels de pepsine de poulet ou de présure a été estimée par la production de : (1) azote non caséinique (NCN : Non-casein nitrogen) et (2) azote non protéique (NPN : Non-protein nitrogen). Ceux-ci ont été déterminés respectivement dans le surnageant après précipitation de caséine à pH 4,6, ou dans de l'acide trichloracétique (TCA) 12 %. Les valeurs de NCN et NPN par rapport à l'azote total (TN : Total nitrogen) ont été suivies pendant des intervalles de temps de 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h et 24 h. Les différentes fractions d'azote ont été estimées par la méthode de Kjeldahl (IDF 20-1-ISO 8968-1: 2014).

5. Analyses statistiques

Les variations de la protéolyse des gels de pepsine de poulet ou de présure, de 30 minutes à 24 heures sont présentées comme des moyennes de mesures en triple et soumises à une analyse de variance par STATISTICA Version 13.2 (2016).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les principales caractéristiques de l'extrait de pepsine de poulet ou de la présure sont présentées dans le tableau 1.

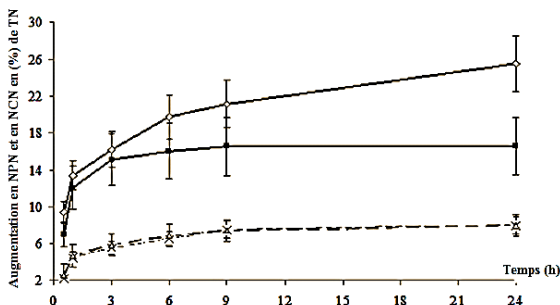
Tableau 1 : Comparaison des niveaux protéolytiques de l'extrait de pepsine de poulet et de présure lors de la coagulation du lait

Caractéristiques	Extrait brut de pepsine de poulet	Présure
Activité coagulante de lait (UP/ml)	60,06 ^a ± 0,14	323,62 ^b ± 44,56
Force coagulante (US)	13142 ^a ± 1498	70815 ^b ± 1865
Taux de protéolyse (à 24 heures de coagulation)		
NPN/TN (%)	25,51 ^a ± 0,34	16,53 ^b ± 0,38
NPN/TN (%)	7,99 ^a ± 0,12	7,93 ^b ± 0,16

Les moyennes ne partageant pas la même lettre, sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Le protocole d'extraction a montré qu'un litre de pepsine de poulet brut obtenu à partir de 400 g de proventricules pouvait coaguler environ 13 142 litres de lait. Cette quantité de lait pouvait être coagulée par 0,18 litre de présure de force (1 : 70815). Le coût d'importation de la présure, enzyme utilisée par excellence dans la fabrication de fromages par les industries laitières en Algérie, est d'environ 220 €/Kg. L'utilisation de pepsine de poulet permettrait de coaguler le lait et par conséquent, de faire des économies. Comme l'activité protéolytique de la pepsine de poulet est relativement élevée comparativement à l'activité de la présure, elle est plutôt recommandée dans la coagulation du lait destiné à la fabrication des fromages à pâtes pressées.

Figure 1 : Evolution de l'augmentation du NPN (Δ , $\times$), et du NCN ($\diamond$, $\blacksquare$) du gel pepsine et du gel présure respectivement



L'activité protéolytique des enzymes coagulantes a été estimée à partir de la libération des fractions NPN et NCN par rapport à TN (Figure 1).

Les rapports NPN/TN et NCN/TN dans le lait écrémé sont respectivement de 5,1 % et 33,3 %. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Alais (1984), qui sont de 5 pour NPN et de 32 % pour NCN. Aucune différence significative n'a été notée dans l'activité protéolytique des deux enzymes lorsqu'elle est exprimée en par le rapport NPN/TN. L'allure de la libération du NPN pour les deux enzymes est similaire. Cette libération s'est déroulée en deux étapes : (a) : 0-9 h, au cours desquelles il y a eu une augmentation d'environ 5,8 % pour la pepsine et 5,4 % pour la présure ; (b) : 9-24 h, pendant lesquelles il y avait une stabilisation de la libération des fractions NPN à environ 0,5 %. Cependant, l'activité protéolytique indiquée par la libération du NCN a montré une différence significative ($p < 0,05$) entre la pepsine et la présure. Pour la pepsine, il y a eu une augmentation continue de la libération du NCN d'environ 16 % de 0 h (9,4 %) à 24 h (25,5 %). Néanmoins, la présure a montré deux niveaux d'activité protéolytique, le premier étant caractérisé par une augmentation de la libération du NCN d'environ 9,5 % de 0 h (7,0 %) à 9 h (16,5 %), le deuxième niveau se stabilisant de 9 h à 24 h. Ainsi, une augmentation de l'activité protéolytique de la pepsine sur les caséines, indiquée par la libération de NCN s'est produite de 30 minutes à 24 heures d'incubation sans qu'il ait une stabilisation contrairement à l'activité de la présure qui s'est stabilisée de 9 h à 24 h d'incubation.

La libération similaire du NPN par la présure et par la pepsine indique que la caséine κ constitue un substrat spécifique de la pepsine lors de la phase primaire (ou phase enzymatique) de la coagulation du lait et que cette protéolyse aboutit à la formation de deux fragments distincts, la paracaséine κ , à caractère hydrophobe et la caséinomacropeptide (CMP) à caractère hydrophile (Alais, 1984).

En outre, si aucune augmentation dans la libération d'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 n'est observée dans l'intervalle de temps étudié, cela peut être dû au fait que les produits d'hydrolyse des autres caséines (α ou β) par la présure ou par la pepsine sont des composés de poids moléculaire élevé, insolubles dans le TCA, réactif déprotéinisant.

De manière générale, l'azote non protéique ne représente qu'une faible fraction de l'azote du lait, entre 5 et 6p. 100, soit l'équivalent de 1,6 à 1,9 g de matière azotée totale (N X 6,39) par kg de lait (Veisseyre 1979, Alais, 1984).

Ces résultats obtenus sont appuyés par ceux donnés par Veisseyre (1979), qui a signalé que le taux de libération de NPN à partir de la présure s'est stabilisé à environ 4,5 % de TN du lait et l'allure des courbes est similaire à celle de cette présente étude. A l'opposé, certaines protéases comme la trypsine, la chymotrypsine et d'autres, issues de microorganismes tels que *Mucor pusillus*, *Mucor*

miehei et *Endothia* libèrent du NPN en continu dans du TCA 12 % sans aucune stabilisation. (Houins *et al.*, 1973 ; Veisseyre, 1979 ; Alais, 1984 ; Morellon-Sterling *et al.*, 2020 ; Holt et Carver, 2021 ; Guinee, 2021 ; Liu *et al.*, 2021).

La différence de libération de NCN peut s'expliquer par la spécificité de la présure qui hydrolyse la caséine kappa uniquement au niveau de la liaison Phe(105)-Met(106), principalement dans une gamme de pH de 5,8 à 6,8 alors que le site actif de la pepsine contient deux résidus d'acide aspartique, Asp 32 et Asp 215 qui clivent les résidus d'acides aminés aromatiques (Tyr, Trp, Phe) et hydrolysent préférentiellement les liaisons peptidiques hydrophobes (Leu, Ile, Ala et Val) ainsi que Glu. Ainsi, l'activité des enzymes protéolytiques diffère selon leur origine et leur spécificité qui dépendent étroitement des acides aminés et parfois des métaux, qui composent leurs sites de fixation et leurs sites catalytiques (Bayliss *et al.*, 1969 ; Andreeva et Rumsh, 2006, Keil, 1992, Qi *et al.*, 2007, Afsharnejad *et al.*, 2019, González *et al.*, 2021, Rajagopalan *et al.*, 2021, Rocha *et al.*, 2021).

CONCLUSION

Les résultats de cette étude ont montré qu'un litre de pepsine de poulet brut obtenu à partir de 400 g de proventricules coagule environ 13 142 litres de lait. Aucune différence significative n'a été notée entre l'activité protéolytique de la pepsine de poulet et celle de la présure lorsqu'elle est exprimée en NPN. Ceci peut indiquer que leur hydrolyse des caséines était très spécifique et limitée. Le modèle de libération du NCN différait significativement ($p < 0,05$) entre la pepsine et la présure. Une augmentation de l'activité protéolytique de la pepsine sur les caséines, basée sur la libération de NCN s'est produite de 30 minutes à 24 heures d'incubation et il n'y a eu aucune stabilisation. L'utilisation de la pepsine de poulet comme substitut de la présure dans la coagulation du lait et la fabrication du fromage notamment à pâte cuite est réalisable. Elle doit être encouragée compte tenu de l'augmentation de la production de volaille et du lait cru en Algérie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afsharnezhad M., Shahangian S.S., and Sariri R., 2019. *Intern. J. of Biolog. Macromol.* 121: 173-82.
- Alais C., 1984. In Science du lait, principes des techniques laitières, 4^{ème} édition p. 818.
- Andreeva N. S. and L. D. Rumsh, 2006. *Protein Science* 10: 2439-2450.
- Bayliss R. S., J. R. Knowles and G. B. Wybrandt, 1969. *Biochem. J.* 113: 377-386.
- Bohak Z., 1970. In : methods in methods in enzymology vol XIX proteolytic enzymes (Eds;G.E. Perlmann and L. Lorand). Academic Press, New York, pp: 347-358.
- Esteves C.L.C., J. A. Lucey and E.M.V. Pires, 2001. *J. of Dairy Res.* 68: 499-510.
- FAO, 2019. Food and Agriculture Organization of United Nations.
<https://www.fao.org/statistics/fr/>
- González-Velázquez, D.A., Mazorra-Manzano M.A., Martínez-Porchas M., Huerta Ocampo J.A. Vallejo-Córdoba B., W.y G. Mora-Cortes, Moreno-Hernández J. M., et Ramírez-Suarez J.C., 2021. *Appl Biochem Biotechnol* 193, n° 2: 389-404.
- Green M.L., M. J. Valler and J. Kay, 1984. *J. of Dairy Res.* 51: 331-340.
- Guinee, Timothy P., 2021. *Intern. Dairy J.* 121 : 105095 , 1-13
- IDF 20-1, 2014. In Lait et produits laitiers -Détermination de la teneur en azote.
- Holt, C., et J.A. Carver, 2021. *Intern. Dairy J.*, 1-65.
- Houins G., Eroanne C and Coppens R., 1973. Le lait, pp : 529-530.
- Keil, B., 1992. In Specificity of proteolysis. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg New york p: 335.
- Liu, X., Wu Y., Guan R., Jia G., Ma Y. , et Zhang Y., 2021. *Food Res. Intern.*, 149: 110704, 1-11.
- Morellon-Sterling R., El-Siar H., Tavano O.L., Berenguer-Murcia A., et Fernández-Lafuente R., 2020. *Intern. J. of Bio.Macromol.*, 162: 394-404.
- Moschopoulou E., I. Kandarakis and E. Anifantakis, 2007. *Small Rum. Res.*, 72 : 237-241.
- Qi, W., R. X. Su, Z. M. He, Y.B. Zhang and F.M. Jin, 2007. *ADSA*, 90 : 5004-5011.
- Rajagopalan, A. Vasuki A., et Bindhu O. S., 2021. *Intern. Dairy J.*, 115 : 104934, 1- 5
- Rocha, G. F., Cotabarren J., Obregón W.D., Fernández G., Rosso A.M., et Parisi M.G., 2021. *Intern. J. of Bio. Macromol.* 192: 931-38.
- Silva, S.V., R. M. Barros and F. X. Malcata, 2002. *J. of Food Sci.*, 67: 1746-1751
- Veisseyre R., 1979. In Technologie du lait Maison rustique, 3^{ème} édition, refondue de techniques laitières. pp : 30-34.