

## ESSAI DE CONSERVATION DE L'EXTRAIT BRUT DE PEPSINE DE POULET PAR SECHAGE SOUS VIDE PARTIEL OU PAR LYOPHILISATION

**Benyahia-Krid Férial Aziza, Kechkar Areslane, Kotomale Assirius,  
Saoudi Zineddine, Bouhamed Mohammed Salah, et Zidoune Mohammed Nasereddine**

*Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.) :  
Equipe : Transformation et Élaboration des produits Agro-alimentaires (TEPA).  
Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires  
(INATAA). Université Constantine 1, Route Ain El Bey, Constantine-25000, Algérie.*

[ferialaziza@yahoo.fr](mailto:ferialaziza@yahoo.fr)

### **RÉSUMÉ**

Le développement de l'aviculture offre des possibilités de récupération de la pepsine, enzyme protéolytique et coagulante à partir de proventricules de poulet. Cet organe considéré comme déchet peut servir comme source de protéase en général, ou en remplacement des agents coagulants, utilisés de façon croissante par l'industrie laitière. Le travail vise à évaluer l'effet de deux techniques de conservation de l'extrait enzymatique brut de pepsine de poulet : séchage sous vide partiel (200 mbar, 48°C) comparé à la lyophilisation (0,1mbar, -60°C) sur l'activité coagulante résiduelle au cours du stockage.

L'impact de l'adjonction ou non du lactose en tant que protecteur et l'activation ou non du pepsinogène avant et après séchage sous vide partiel ou lyophilisation, sont également évalués. Alors que le séchage sous vide partiel engendre une activité résiduelle de 45,8 % qui baisse encore à 26,2 % au bout de 135 jours de stockage, la lyophilisation assure de meilleurs résultats avec 48,5 % en fin d'opération et plus de 41% durant la même période de conservation. L'ajout du lactose comme agent protecteur à l'extrait de pepsine de poulet assure une activité coagulante résiduelle plus intéressante. De plus, il s'avère que l'activité résiduelle est meilleure si le pepsinogène n'est pas activé avant lyophilisation, mais plutôt après.

### **ABSTRACT**

#### **Chicken pepsin crude extract preservation test by drying under partial vacuum or by lyophilization**

Aviculture development offers possibilities to recover pepsin for its use, generally, as a proteinase or as a substitute in milk coagulation, used increasingly in the dairy industry. The work aims to evaluate the effect of two conservation techniques of the chicken pepsin enzyme crude extract, drying under partial vacuum (200 mbar, 48 ° C) compared to freeze-drying (0,1mbar, -60° C) of the residual coagulant activity during storage. The impact of adding or not lactose as protector and activation or not pepsinogen before and after drying under partial vacuum or lyophilization, are also evaluated. While partial vacuum drying engenders a residual activity of 45,8 % which drops to 26,2 % at 135 days of storage ; freeze-drying ensures better results with 48,5 % at the end of the operation and more than 41 % during the same conservation period. The addition of lactose in the pepsin extract ensures more interesting residual clotting activity. Furthermore, it turns out that residual activity is better if pepsinogen is not activated before freeze-drying , but rather later.

## INTRODUCTION

La production mondiale en fromage a augmenté d'un facteur annuel approximatif de 3,5 depuis 1996 jusqu'à l'an 2000 (FAO, 2012). De plus, la présure d'origine animale ne couvre qu'approximativement 30% de la production fromagère à l'échelle mondiale car la disponibilité des caillottes de veaux de lait devient limitée (FAO, 2012). Cette situation a imposé la recherche d'agents coagulants de remplacement. Parmi les succédanés, la pepsine de poulet (EC 3.4.23.1) est une protéase capable de coaguler le lait. Elle est extraite à partir du proventricule de poulets, organe écarté avec les viscères lors de l'abattage. Une valorisation est possible à ce niveau vu d'une part, sa facilité de récupération et sa disponibilité croissante liée au développement de l'aviculture et d'autre part, la possibilité d'utilisation directe, notamment en fromagerie, pour faire face à la pénurie en présure et aux besoins liés à l'amélioration de la production laitière. Pour préserver une stabilité de l'activité de l'extrait enzymatique et garantir une utilisation optimale, l'étude des possibilités de conservation par séchage est envisagée. Notre objectif est d'étudier l'effet de la conservation par lyophilisation (-60°C, 0,1 mbar, 12 heures) et par séchage sous vide partiel (48°C, 200 mbar, 18h) sur l'activité coagulante résiduelle de l'extrait brut de pepsine de poulet. Cet effet est apprécié après stockage à température ambiante pendant 135 jours. L'impact de l'adjonction ou non du lactose en tant que protecteur et l'activation ou non du pepsinogène avant et après séchage sous vide partiel ou lyophilisation, sont également évalués.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Lait écrémé

La poudre de lait écrémé moyen chauffage, (Molochansk Dairy, Ukraine) est reconstituée à 12 % (p/vol.) dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  (0,01 M) puis conservée toute une nuit à 4°C pour assurer la stabilité et la réhydratation des micelles. Pour éviter le développement microbien dans la solution du lait, 0,04% (p/vol.) d'azide de sodium sont ajoutés.

### 1.2. Proventricules

Les proventricules ont été prélevés à partir de tubes digestifs de poulets, dont l'âge moyen était de 8 semaines. Ils sont ouverts par incision longitudinale, après avoir éliminé la matière grasse qui les recouvre, rincés, puis égouttés.

### 1.3 Extraction de la pepsine de poulet et préparation pour lyophilisation ou séchage sous vide partiel

Les proventricules de poulet (100g) ont été hachés puis mis sous agitation pendant 3 heures à 4 °C dans 300 mL d'une solution contenant 30 g NaCl - 7g  $\text{NaHCO}_3$  par litre. Après filtration sur gaze (0,5 mm), l'extrait brut de pepsine de poulet est acidifié par HCl 3N à pH 2 pendant 30 minutes pour activer la pepsine puis réajusté par NaOH 1N à pH 6,6 (Bohak, 1970). Les extraits de pepsine de poulet sont ensuite préparés pour être lyophilisés (-60°C, 0,1 mbar, 12 heures) ou séchés sous vide partiel (48°C, 200 mbar, 18h) puis stockés quatre modalités (activé lactosé, activé non lactosé, non activé lactosé, non activé non lactosé). La mention non activé indique que l'extrait brut de pepsine de poulet est non activé avant lyophilisation ou avant séchage sous vide. Son activation (HCl 3N à pH 2 pendant 30 minutes, puis réajusté par NaOH 1N à pH 6,6) a lieu, lors de sa reconstitution avec de l'eau distillée pour l'estimation de l'activité résiduelle après les deux opérations de séchage et lors du stockage. L'activité coagulante résiduelle est ensuite vérifiée après la phase de séchage, puis pendant le stockage (tous les 15 jours jusqu'à 135 jours de stockage).

### 1.4. Expression de l'activité coagulante initiale à l'état frais

L'activité coagulante est évaluée en unités présure (UP) :  $\text{UP/mL} = 10V/Tv$  (Alais, 1984) ; tel que : **UP** : unité présure, **V** : volume de lait ; **v** : volume de l'enzyme multiplié par son facteur de dilution ; **T** : temps de floculation en secondes. Ce temps est estimé comme suit :

10 mL de lait mis dans un tube à essai, à 30 °C dans un bain Marie, sont additionnés de 1 mL de la solution enzymatique. Le temps de floculation est fixé par arrêt du chronomètre lors d'apparition des premiers flocons sur la paroi du tube sous mouvement rotatoire, en position incliné (Alais, 1984).

### 1.5. Expression de l'activité coagulante résiduelle après lyophilisation ou après séchage sous vide partiel (A.C. A S.)

$$\text{A.C.A. S. (\%)} = \frac{\text{Activité coagulante après séchage}}{\text{Activité coagulante initiale à l'état frais}} \times 100$$

### 1.6. Expression de l'activité coagulante résiduelle (A.C.R.) pendant le stockage (0 à 135 J)

$$\text{A.C.R. (\%)} = \frac{\text{Activité coagulante après stockage (15j)}}{\text{Activité coagulante initiale à l'état frais}} \times 100$$

Les données expérimentales sont présentées sous forme de moyennes et d'écarts-type de trois expériences.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'extrait brut de pepsine de poulet (EBPP), est caractérisé par son volume après extraction (330 mL/100g de proventricules), son pH avant activation ( $8,56 \pm 0,48$ ), son extrait sec total ( $10,45 \pm 0,77$  g/100mL) et par sa teneur en protéines totales ( $35,47 \pm 0,40$  mg/mL). Soulignons qu'un litre de cet extrait enzymatique obtenu à partir d'environ 300 g environ, de proventricules a une force coagulante de 1/2200. Par comparaison à une présure commerciale de force 1/10000 qui coûte environ 120 €. Avec l'extrait brut de pepsine issue des proventricules de poulets, il faudrait 4,6 L pour coaguler 10000 de lait. Cet extrait enzymatique présenté sous quatre formes et quatre formes pour les extraits lyophilisés (voir 1.3) a donné des activités coagulantes résiduelles après lyophilisation ou séchage sous vide partiel présentées dans le tableau 1. L'activité coagulante obtenue juste après lyophilisation est supérieure à celle observée après séchage sous vide ( $45,8\%$  vs  $39,6\%$ ) ; il en est de même après 135 jours de stockage ( $41\%$  vs  $21,3\%$ ). Dans les conditions de notre travail, l'effet de conservation par lyophilisation sur l'activité coagulante d'extraits de pepsine de poulet, semble être adéquat. En effet, la lyophilisation confère aux enzymes une stabilité remarquable (Pelmont, 1993, Wallach, 1997 et Ward *et al.*, 1999). Elle occupe une place originale au regard des techniques de séchage car elle permet d'obtenir des produits stables et capables à se réhydrater instantanément. Aussi, réduit-elle les possibilités de développement des réactions d'altération (Schwegman *et al.*, 2005). D'autre part, les extraits enzymatiques lactosés ont montré des activités coagulantes résiduelles supérieures à celles des extraits enzymatiques non lactosés quel que soit le mode de séchage utilisé et indépendamment de l'activation (tableau 1). En effet, les enzymes en milieu aqueux sont instables. Pour cela, le séchage sous vide poussé (lyophilisation) ou sous vide partiel est souvent recommandé. Cependant, le processus en lui-même peut causer des dommages au niveau des différentes structures de la protéine (Ward *et al.*, 1999). L'utilisation des sucres, comme

agents protecteurs des enzymes lors des processus de déshydratation en l'occurrence les diholosides (ex : lactose) est largement recommandée. Ils les protègent durant la déshydratation et même au cours du stockage (Izutsu, 2004). Cette protection est déterminée par l'interaction directe avec les protéines et le remplacement de l'eau perdue lors du séchage par la formation de liaisons hydrogènes avec les groupements polaires (Carpenter *et al.*, 1987, Izutsu *et al.*, 1991, Carpenter *et al.*, 1993, Vasiljevic et Jelen, 2003). Pour finir, cette étude a montré que l'activité coagulante résiduelle est meilleure si le pepsinogène n'est pas activé avant lyophilisation, mais plutôt après (tableau 1). En effet, Bohak (1973) et Kageyama (1988), rapportent que le changement de conformation qui a lieu lors de l'activation du pepsinogène entraîne le démasquage d'un groupe sulfhydryl et le détachement d'un peptide, pro-segment constitué de 44 résidus d'acides aminés. jouant un rôle protecteur vis-à-vis du site actif de l'enzyme. Dans des conditions neutres ou peu alcalines le zymogène inactif est stabilisé contre toutes interactions électrostatiques entre les résidus d'acides aminés basiques présents dans le pro-segment et les résidus acides présents dans le fragment de l'enzyme.

## CONCLUSION

La coagulation du lait est réalisable par la pepsine de poulet, seule ou en mélange avec la présure. A titre d'exemple, environ 17 litres peuvent être extraits de 5000 g de proventricules, écartés comme déchets lors de l'abattage de 700 poulets (capacité journalière moyenne d'un abattoir algérien), permettraient de coaguler 37400 litres de lait. Ce même volume pourrait l'être, par l'utilisation de 3,7 litres de présure de force 1/10000. Ce remplacement réduirait environ 500 € des apports en présure. Cette enzyme possédant ce potentiel de force coagulante pourrait être conservée pendant 4,5 mois. Notre étude a montré que la lyophilisation est le mode de séchage le plus approprié pour préserver une stabilité de son activité et garantir son utilisation. De plus, l'ajout du lactose comme agent protecteur a conduit à une amélioration satisfaisante de son activité enzymatique et l'activation du pepsinogène s'est avérée encore meilleure après lyophilisation.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alais C., 1984. Sciences du lait, principes des techniques laitières. SEPAIC, 4<sup>ème</sup> édition. 811p.
2. Bohak, Z. 1973. Eur.J. Biochem. 32: 547-554.
3. 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 Vol 19. pp 347-358, 1042p.
4. Carpenter J.F., Prestrelski S.J. et Arakawa T., 1993. Archives of biochemistry and biophysics, Vol. 303, N°2: pp 456-464.
5. Carpenter J.F., Crowe L.M. and Crowe J.H. 1987. Biochimica & Biophysica Acta. p923, pp 109-125.
6. Izutsu K., Aoyagi N. and Kojima S., 2004. Chem. Pharm.Bull. 52 (2) 199-203.
7. Izutsu K., Yoshioka S., Takeda Y., 1991. Int. J. Pharm. 71, pp 137-146.
8. Kageyama T., 1988. Eur.J. Biochem. 176 : 543-549.
9. Pelmont J., 1993. Les enzymes. Presses Universitaires de Grenoble, Collection : Grenoble Sciences, 605 p.
10. Schwegman J.J, Hardwick L.M. and Akers M.J. 2005. Pharmaceutical Development and Technology, 10 : 151-173.
11. Vasiljevic T., and Jelen P. 2003. Innovative Food Science and Emerging Technologies 4 : 319-329.
12. Wallach J. 1997. Les enzymes. Edition Nathan, 130 p.
13. Ward K.R., Adams G.D.J., Alpar H.O. and Irwin W.J., 1999. International Journal of Pharmaceutics 187 : 153-162.
14. [WWW.FAOSTAT.FAO.org](http://WWW.FAOSTAT.FAO.org) site consulté le 2 mars 2013

**Tableau 1** : Activité coagulante résiduelle moyenne en p. 100 de l'activité coagulante de l'extrait frais après lyophilisation ou séchage sous vide partiel et au 135<sup>ème</sup> jour de stockage.

Type de EBPP	Activité coagulante résiduelle après lyophilisation (%)	Activité coagulante résiduelle au 135 <sup>ème</sup> jour de stockage (%)	Activité coagulante résiduelle après séchage sous vide partiel (%)	Activité coagulante résiduelle au 135 <sup>ème</sup> jour de stockage (%)
Activé lactosé	48,4 ± 0,5	40,6 ± 1,1	<b>45,8 ± 0,7</b>	<b>26,2 ± 1,6</b>
Activé non lactosé	42,0 ± 0,4	38,7 ± 1,5	38,2 ± 0,9	18,2 ± 1,9
*Non activé lactosé	<b>48,5 ± 0,3</b>	<b>43,0 ± 1,5</b>	39,1 ± 0,5	21,5 ± 1,9
*Non activé non lactosé	44,5 ± 0,7	41,7 ± 1,6	35,2 ± 0,5	19,2 ± 1,7
Moyenne	<u>45,8</u>	<u>41</u>	<u>39,6</u>	<u>21,3</u>

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

**Figure 1** : Evolution de l'activité coagulante résiduelle pendant le stockage de l'extrait brut de pepsine de poulet (EBPP) lactosé pendant le stockage. × EBPP lyophilisé non activé ; ▲ EBPP lyophilisé activé ; ◇ EBPP séché activé ; ■ EBPP séché non activé.

