

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



### **Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master**

**Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie**

**Spécialité/Option : Production et Transformation Laitières**

**Département : Ecologie et Génie de l'Environnement**

**Filière : Sciences Alimentaires**

**Etude comparative de deux protéases coagulant le lait, extraites de pro-  
ventricules de poulet et de caillette d'ovine.**

**Présenté par :**

- ❖ **Mme AZZOUZI Roumaïssa**
- ❖ **Mme YAGHLA Besma**

**Devant le jury composé de :**

<b>Présidente</b>	<b>DJAMAA F.</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Guelma</b>
<b>Examineur</b>	<b>ROUABHIA K.</b>	<b>MAA</b>	<b>Université de Guelma</b>
<b>Encadreur</b>	<b>BAALOU DJ A.</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Guelma</b>

**Octobre 2020**

## **Dédicace**

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie le fruit de ce modeste travail:*

### ***A mon père « Ahmed »***

*Qui peut être fier de trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

### ***A ma mère « Noura »***

*Qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Je leur dit merci mille fois, qu'ALLAH me les garder*

### ***A ma grande mère Cherifa***

*Pour son amour et ses prières, Puisse ALLAH me la garder.*

### ***A mes frères Nidal et Abd errahmen et mes sœurs Imane et Chaimaa.***

*Qui n'ont cessé de m'encourager et à qui je souhaite réussite et bonheur dans leurs vies.*

*Votre fierté de moi me vaut tous les diplômes du monde.*

### ***A mon binôme***

***Besma yaghla*** avec qui j'ai passé et partagé de précieux moments et de très belles années.

### ***A mes chères amies***

*Qui j'ai aimé et estimé du fond du cœur. : **Rahil**.*

*En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Je vous souhaite une brillante réussite dans la vie professionnelle, familiale une bonne santé et une vie inondée de bonheur.*

### ***A ma grande famille.***

***Merci à tous et à toutes.***

**ROUMAISSA**

## **Dédicace**

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie le fruit de ce modeste travail:*

### ***A mon père « Douadi »***

*Qui peut être fier de trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi .. tu es le meilleur père du monde .*

**« je t'aime papitou »**

### ***A ma mère «Mounira»***

*Qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Je leur dit merci mille fois, qu'ALLAH me les garder*

**« je t'aime Mamiti »**

### ***A mon cher frère Rabah***

*Mon ange gardien et mon fidèle compagnant dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse . Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. je te remercie de tout mon cœur frero.*

### ***A mes sœurs sarra , maissa, ranime.***

*Qui n'ont cessé de m'encourager et à qui je souhaite réussite et bonheur dans leurs vies. Votre fierté de moi me vaut tous les diplômes du monde.*

***Je vous aime***

### ***A mon binôme***

***Roumaissa Azzoouzi avec qui j'ai passé et partagé de précieux moments et de très belles années.***

***A mon cousin Badri***

*Pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire*

***A mes chères amies***

*Qui j'ai aimé et estimé du fond du cœur : **Nada et Nahla***

*En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Je vous souhaite une brillante réussite dans la vie professionnelle, familiale une bonne santé et une vie inondée de bonheur.*

***A ma grande famille.***

***Merci à***

***Tous et à toutes.***

***Besma***

## **Remerciements**

Nous voulons avant toute chose remercier « الله » le Tout Puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à adresser l'expression de nos profonds remerciements à notre encadreur **Mme Dr. Baaloudj Affef** qui nous a fait l'honneur d'assurer la direction de ce mémoire. Nous la remercions pour son soutien, la pertinence de ses conseils, sa grande disponibilité, sa patience et son aide précieuse pour l'élaboration de ce travail.

Nous tenons à remercier la présidente du jury Madame **Djema Fatma**, (Docteur, Université 8 Mai 1945 – Guelma), pour l'honneur qu'il me fait en présidant mon jury de soutenance.

Monsieur **Rouabhia Kamel** (MAA, Université 8 Mai 1945 – Guelma –), qui me fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail. Je lui exprime ma profonde gratitude.

Nos remerciements vont également à **Mme Kaid R** pour les aides qu'ils nous ont apportées.

Nous aimerons également remercier toute l'équipe du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers : **Mme Hassiba**, **Mme wafa**, **Mme Ratiba** et pour leurs conseils et aides et pour nous avoir facilité l'accès au laboratoire.

Nous sommes redevables à l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation durant ces 5 années.

On réserve enfin nos derniers remerciements aux gens qui nous ont aidées de près ou de loin pour réaliser ce travail.

# Table des matières

Dédicace	
Remerciements	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1
<b>Chapitre 1 : Etudes bibliographiques</b>	
1.Le lait .....	3
1.1.Définition .....	3
1.2.Importance Nutritionnelle .....	3
1.3.Composition du lait .....	4
1.4.Caractéristiques organoleptiques et physicochimiques du lait .....	5
1.4.1.Caractéristiques organoleptiques .....	5
1.4.1.1.La couleur .....	5
1.4.1.2.L'odeur .....	5
1.4.1.3.La saveur .....	6
1.4.1.4.La viscosité .....	6
1.5.Caractéristiques physico-chimiques .....	6
1.5.1.La densité .....	6
1.5.2.Le pH .....	6
1.5.3.Le point de congélation .....	6
1.5.4.Acidité de titration ou acidité Dornic .....	6
1.6.Caractéristiques microbiologiques de lait .....	7
1.6.1.La flore originelle .....	7
1.8.3.1.Caséines .....	13
1.8.3.2.Caséines $\alpha$ S .....	14
1.8.3.3.Caséine $\alpha$ S2 .....	14
1.8.3.4.Caséine $\beta$ et $\gamma$ .....	14
1.8.3.5.Caséine $\kappa$ .....	14
1.8.4. Micelle de caséine .....	14
1.8.4.1. Définition de la micelle de caséine .....	14
1.8.4.2. Formation de la micelle de caséine .....	14
1.8.4.3. Facteurs de stabilité de la micelle .....	15
1.8.5. Protéines du lactosérum .....	16
1.8.Lactose .....	16

<b>1.9.Minéraux</b> .....	17
<b>1.10.Vitamines</b> .....	17
<b>1.11.Valeur alimentaire du lait</b> .....	18
<b>1.12.Composants chimiques indésirables du lait</b> .....	18
<b>1.13.1.Antibiotiques</b> .....	19
<b>1.13.2.Pesticides</b> .....	19
<b>1.13.3.Métaux</b> .....	19
<b>2.Coagulation du lait</b> .....	19
<b>2.1.Définition de la coagulation</b> .....	19
<b>2.2.Types de coagulation du lait</b> .....	20
<b>2.3.Coagulation par acidification</b> .....	20
<b>2.4.Coagulation enzymatique</b> .....	21
<b>2.4.1.Propriétés du coagulum obtenu par voie enzymatique</b> .....	23
<b>2.5.Coagulation mixte</b> .....	23
<b>2.5.1.Différents coagulums obtenus</b> .....	24
<b>2.6.Facteurs influençant la coagulation du lait</b> .....	25
<b>2.6.1.Influence du pH</b> .....	25
<b>2.6.2.Influence de la température</b> .....	26
<b>2.6.3.Influence de la teneur en calcium</b> .....	26
<b>2.6.4.Effet de la concentration en d'enzyme</b> .....	26
<b>2.6.5.Influence de la concentration en caséines et le diamètre des micelles de caséines</b> .....	27
<b>3.Présure</b> .....	28
<b>3.1.Définition de la présure</b> .....	28
<b>3.2.Propriétés physicochimiques et technologiques de la présure</b> .....	28
<b>3.2.1.Propriétés physicochimiques</b> .....	28
<b>3.2.2.Propriétés technologiques</b> .....	28
<b>3.3.Composition de la présure</b> .....	29
<b>3.3.1.Chymosine : (E.C.3.4.23.4)</b> .....	29
<b>3.3.2.Pepsine (E.C. 3.4.23.1, 2,3)</b> .....	29
<b>3.3.3.Succédanés de présure d'origine animale</b> .....	30
<b>4.Fromage</b> .....	32
<b>4.1.Définition du fromage</b> .....	32
<b>4.1.1.Le fromage frais</b> .....	33
<b>4.2.Étapes de fabrication du fromage</b> .....	34
<b>4.2.1.La standardisation</b> .....	34
<b>4.2.2.La coagulation</b> .....	34
<b>4.2.3.L'égouttage</b> .....	35

4.2.4.Le salage .....	35
4.2.5.L'affinage .....	36
4.3.Étapes de fabrication du fromage frais .....	36
4.4.Classification officielle du fromage.....	38
4.4.1.Fromages frais à pâte fraîche .....	39
4.4.2.Fromages à pâte molle .....	39
4.4.3.Fromages à double présentation .....	39
4.4.4.Fromages à pâte persillée .....	39
4.4.5.Fromages à pâte pressée .....	39

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1.Matières premières.....	43
1.1.Préparation des proventricules de poulet .....	43
1.2.Préparation de la caillette (caillette ovine).....	43
1.3.Le lait ( substrat de Berridge ) .....	44
1.4.La présure .....	44
I.LA PEPSINE DE POULET .....	45
2.Extraction de la pepsine de poulet .....	45
2.1.Présentation du diagramme appliqué .....	45
3.Etude des propriétés coagulantes de l'extrait brute (pepsine de poulet) .....	47
3.1.Estimation de l'activité coagulante .....	47
3.2.Etude de la protéolyse des caséines.....	48
4.Caractérisation de l'extrait enzymatique brut .....	49
4.1.Appréciation de l'effet du pH du lait.....	49
4.2.Appréciation de l'effet de la température du lait .....	49
4.3.Etude de l'effet de la concentration en enzyme .....	50
II.LA PEPSINE OVINE .....	50
5.Extraction de la pepsine de l'ovins et appréciation du diagramme propose .....	50
5.1.Procédé d'extraction .....	50
5.2.Concentration de l'extrait clarifié .....	52
6.Etude de l'extrait enzymatique brute (caillette d'ovine) .....	53
6.1.Mesure de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut.....	53
7.Caractérisation de l'extrait enzymatique.....	54
7.1.Influence de la température.....	54
7.2.Influence de pH.....	54
7.3.Influence de CaCL <sub>2</sub> .....	54
7.4.Influence de la concentration en enzyme .....	55



## Chapitre 3 : Résultats et discussions

<b>1.Extraction de la pepsine des extraits bruts (ovins, poulet) .....</b>	<b>56</b>
<b>1.1.Rendement de l'extraction.....</b>	<b>56</b>
<b>1.2.Détermination de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut.....</b>	<b>57</b>
<b>1.3.Activité protéolytique.....</b>	<b>59</b>
<b>2.Conditions optimales de coagulation .....</b>	<b>62</b>
<b>2.1.Effet du pH du lait sur l'activité coagulante.....</b>	<b>62</b>
<b>2.2.Effet de la température du lait sur l'activité coagulante .....</b>	<b>65</b>
<b>2.3.Effet de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante .....</b>	<b>67</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>72</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>72</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>74</b>
<b>Résumé</b>	

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Schéma de la composition de la matière grasse du lait .....	13
<b>Figure 2:</b> Structure de la micelle de caséine.....	15
<b>Figure 3:</b> Les gels laitiers et le phénomène de coagulation par acidification. ....	20
<b>Figure 4:</b> Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation du lait par la présure. ....	21
<b>Figure 5:</b> Hydrolyse de la caséine $\kappa$ par la présure.....	22
<b>Figure 6:</b> Les gels laitiers et le phénomène de coagulation par la présure.....	23
<b>Figure 7:</b> Modélisation des modes d'obtention des matrices fromagères lactiques, mixtes et présure. ....	24
<b>Figure 8:</b> Influence de la variation des facteurs de milieu sur le temps de floculation .....	27
<b>Figure 9:</b> Complexe stomacal du poulet.....	32
<b>Figure 10:</b> Diagramme général de fabrication de fromage à pâte fraîche .....	38
<b>Figure 11:</b> Photo d'une caillette ovine .....	44
<b>Figure 12:</b> Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet selon Bohak.....	46
<b>Figure 13:</b> les principales étapes d'extraction de la pepsine ovine .....	51
<b>Figure 14:</b> Extrait enzymatique brut ovine .....	52
<b>Figure 15:</b> l'extrait enzymatique concentré.....	52
<b>Figure 16:</b> 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). ....	60
<b>Figure 17:</b> Evolution de l'activité protéolytique de l'EEcl. ....	61
<b>Figure 18:</b> Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine de poulet et de la L'activité coagulante de la pepsine de poulet augmente au fur et à mesure de .....	62
<b>Figure 19:</b> Influence du pH sur l'activité coagulante de l'EECL et l'EEC (ovins). ....	63
<b>Figure 20:</b> Activité coagulante de la pepsine de poulet et la présure en fonction de la température du lait à pH 6,4. ....	65
<b>Figure 21:</b> Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de pepsine d'ovins et de présure. ....	66
<b>Figure 22:</b> 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). ....	68
<b>Figure 23:</b> Influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante de pepsine d'ovins et de présure. ....	69
<b>Figure 24:</b> Influence de la concentration en $\text{CaCl}_2$ sur l'activité coagulante de l'EE .....	70

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Composition moyenne du lait de vache .....	4
<b>Tableau 2:</b> Composition moyenne du lait de différentes espèces animales.....	5
<b>Tableau 3:</b> Caractéristiques physico-chimiques des laits de diverses espèces animales .....	7
<b>Tableau 4:</b> Flore originelle du lait cru de vache. ....	8
<b>Tableau 5:</b> Principaux constituants de la fraction lipidique.....	13
<b>Tableau 6:</b> Teneurs en minéraux de lait de vache.....	17
<b>Tableau 7:</b> Teneurs moyenne en vitamines de lait de vache.....	18
<b>Tableau 8:</b> Comparaison entre un caillé lactique et un caillé de présure.....	25
<b>Tableau 9:</b> Origine des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait.....	30
<b>Tableau 10:</b> Caractéristiques des extraits brut et clarifié de pepsine de poulet issus de 100g de proventricules par macération durant 3h à 25°C.....	56
<b>Tableau 11:</b> Les volumes de l'EEB et l'EEC récupéré après les opérations d'extraction.....	57
<b>Tableau 12:</b> Comparaison d'AC de l'EEB aux AC des AC de références bibliographiques. ....	58

## Liste des abréviations

**AC** : Activité coagulante

**AFNOR**: Association française de normalisation

**AP** : Activité protéolytique

**MG** : matière grasse

**D°** : Degré Dornic

**E.S.T** : Extrait sec total

**EEB** : extrait enzymatique brut

**FAO** : Food and agriculture organization

**PM** : Poids moléculaire

**TC** : Temps de coagulation

**TCA** : Acide trichloro acétique

**U.A.C.** : Unité d'activité coagulante

**E** : enzyme

**EE** : extrait enzymatique

**EEB** : Extrait Enzymatique Brut

**EEc** : Extrait enzymatique concentré

**EEcl** : Extrait enzymatique clarifié

**EST** : Extrait Sec Totale

**R t** : Rendement

**TCEcl** : temps de coagulation de l'extrait clarifié



# **Introduction**

### Introduction

La composition du lait est considérée comme étant un aliment parfaitement adapté aux besoins nutritionnels et physiologiques du corps humain à tout stade de la vie, mais la Courte durée de sa conservation a conduit à sa transformation en caillé. Cette technique est utilisée dans les industries fromagères pour la fabrication de fromage.

Il est connu depuis longtemps que l'homme a utilisé plusieurs méthodes pour faire cailler le lait de ses chèvres, brebis et ses vaches, dont l'enzyme coagulante était juste d'origine végétale, la plus connue est extraite du figuier, qui a été utilisée pour la première fois par les Bergers grecs. Mais avec la technologie, plusieurs techniques d'extraction de l'agent coagulant ont été développées.

La présure animale qui renferme essentiellement de la chymosine, constitue l'agent coagulant le plus utilisé dans la coagulation enzymatique du lait. Elle est extraite à partir des caillettes de veau non sevrés, ce qui affecte lourdement les coûts par la faiblesse du rendement en viande. Selon **Ramet, (1997)** l'utilisation de la présure, comme agent coagulant le lait, est confrontée à la contrainte de sacrifice des jeunes veaux, en conséquence l'industrie fromagère subit une crise d'approvisionnement de ce coagulant. Cette situation a donné une impulsion aux recherches sur les enzymes de remplacement de la présure. Pour cela et pour répondre aux exigences des industries fromagères, plusieurs recherches ont été faites pour trouver d'autres enzymes de remplacement

En effet, différentes protéases obtenues à partir de plantes, d'animaux, de bactéries et de moisissures ont été proposées, mais seulement un nombre limité a dépassé le stade expérimental. D'après **Anifantakis et Kandarakis, (1983)**, la principale contrainte est liée aux activités protéolytiques indésirables développées par ces succédanés, et qui affectent le rendement fromager et la qualité organoleptique des produits finis.

Certains succédanés d'origine animale, en l'occurrence bovine, ovine..... peuvent être considérés comme des produits de remplacement acceptables de la présure de veau ; il convient toutefois de signaler comme pour la présure, que leur disponibilité reste tributaire du marché de la viande. (**Eck, 1987**).

L'Algérie ne fait pas l'exception, en 2011, selon l'Office National des statistiques (O.N.S, 2011) près de 25 mille tonnes de fromages ont été vendus dans le marché Algérien. Soit une consommation de l'ordre de 0,62 Kg/habitant. Les fromageries Algériennes ont utilisé 1,5 tonne de présure et/ou ses succédanés ; cette quantité totalement importée a coûté une valeur de plus de 102 mille dollars l'équivalent d'environ 7,5 millions de DA.

Cette grande dépendance de l'Algérie vis-à-vis des fournisseurs étrangers en présure traditionnelle et/ou ses succédanés, a attiré notre attention sur la recherche de sources locales productrices d'agents coagulant le lait.

Les substituts de présures doivent répondre principalement à trois critères importants et qui consistent en :

- L'obtention des produits fromagers comparables à ceux de la présure animale.
- L'absence de toxicité.

- Un prix de revient moins élevé à celui de la présure.

Dans notre travail on s'intéresse à une étude bibliographique comparative relative à l'extraction et la caractérisation d'une protéase coagulant le lait dénommée la pepsine ovine, issue des caillottes d'ovins adultes, puis sa concentration, par la suite, son utilisation pour la coagulation du lait cru. Davantage meilleur, la pepsine extraite de proventricules de poulet a fait l'objet de plusieurs études en vue de son utilisation pour la coagulation du lait (**Gorgin et Rosenthal, 1978 ; Green *et al.*, 1984; Emmons *et al.*, 1990**).

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  $\kappa$  (**Dalgleish, 1982 ; Lucey, 2002 ; Creamer, 2002**). Toute action non spécifique sur la caséine  $\kappa$  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**).

Dans cet objectif, notre travail est réalisé pour :

- Faire une étude de synthèse sur l'extraction d'une coagulase à partir de pro ventricule de poulet et de caillette d'ovins.
- Déterminer l'effet de l'extrait enzymatique brut de proventricule de poulet et de caillette d'ovins sur la coagulation de lait et comparer ses résultats avec la présure de référence .

Pour répondre aux objectifs fixés, notre manuscrit sera structuré et composé de 3 chapitres plus l'introduction et la conclusion.

- Le 1er chapitre a inclus une étude bibliographique.
- Le 2ème chapitre présente le matériel et les méthodes d'étude présentée par les différents chercheurs.
- Le 3ème chapitre est spécifique pour les résultats et discussions.

# **Chapitre 1**

## **Etudes bibliographiques**



## 1. Le lait

### 1.1. Définition

Le lait est le produit intégral de la traite complète et ininterrompue d'une femelle laitière, bien portante, bien nourrie et non surmenée. Sont donc impropres à la consommation humaine des laits provenant d'animaux atteints de maladies, d'animaux mal nourris et les laits contenant du colostrum. Le lait doit être recueilli proprement, il ne doit être ni coloré, ni malodorant ; il ne doit pas contenir d'espèces microbiennes pathogènes (**Lecoq, 1965**).

Le lait est un aliment opaque blanc mat, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, à l'odeur peu marquée et au goût douceâtre, sécrété, après parturition par la glande mammaire des mammifères femelles, pour nourrir les nouveau-nés (**Marcel, 2007**).

Du point de vue physicochimique, le lait est un produit complexe. Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques est indispensable à la compréhension des transformations du lait et des produits laitiers (**Vignola, 2002**).

### 1.2. Importance Nutritionnelle

Le lait joue, un rôle très important dans l'alimentation Humaine, tant au point de vue calorique que nutritionnel. Un litre de lait correspond à une valeur d'environ 750 Kcal facilement utilisables. Comparativement aux autres aliments, il constitue un élément de haute valeur nutritionnelle. L'intérêt alimentaire du lait est :

- ✓ La principale source de calcium
- ✓ Une source de matière grasse
- ✓ Une bonne source de vitamines (**Leroy, 1965**)

Le lait est également une excellente source de minéraux intervenant dans divers métabolismes Humains notamment comme cofacteurs et régulateurs d'enzymes. Le lait assure aussi un apport non négligeable en vitamines connues comme Vitamines A, D, E (liposolubles) et Vitamines B1, B2, B3 (hydrosolubles). Il est néanmoins pauvre en fer et en cuivre et il est dépourvu de fibres (**Cheftel et Cheftel, 1996**).

### 1.3. Composition du lait

La composition chimique du lait varie en fonction de la race, l'âge et de l'alimentation. Il est considéré comme une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse comprenant de nombreux éléments dont les uns sont à l'état dissous et les autres sous la forme colloïdale (Pougheon et Goursaud, 2001).

**Fredot (2006)** rappelle que le lait est constitué de quatre phases :

- Une émulsion de matières grasses ou phase grasse : constituée de globules gras et de vitamines liposolubles (A, D).
- Une phase colloïdale : qui est une suspension de caséines sous forme de micelle.
- Une phase aqueuse : qui contient les constituants solubles du lait (protéines solubles, lactose, vitamines B et C, sels minéraux, azote non protéique).
- Une phase gazeuse: composée d'O<sub>2</sub>, d'azote et de CO<sub>2</sub> dissous qui représentent environ 5 % du volume du lait.

La composition moyenne du lait de vache et de quelques espèces est indiquée dans le tableau 1 et 2.

**Tableau 1:** Composition moyenne du lait de vache (Beal et Sodini, 2003).

Compsant	Teneur exprimée en g pour %
L'eau	87.8
Lactose	4.8
Matière grasse	3.9
Matières azotées :	3.8
- Caséines	2.6
- Protéines sériques	0.5
- Azote non protéique	0.1
- Calcium	0.12
- Phosphore	0.09
- Potassium	0.14

**Tableau 2:** Composition moyenne du lait de différentes espèces animales (Vignola, 2002).

Espèces	Eau (%)	Matière Grasse(%)	Protéines (%)	Glucides (%)	Ménéraux (%)
Vache	87,5	3,7	3,2	4,6	0,8
Chèvre	87,0	3,8	2,9	4,4	0,9
Brebis	81,5	7,4	5,3	4,8	1,0
Chamelle	84,6	5,4	3,0	3,3	0,7
Jument	88,9	1,9	2,5	6,2	0,5

#### 1.4. Caractéristiques organoleptiques et physicochimiques du lait

La connaissance des caractéristiques physicochimiques du lait a une importance incontestable car elle permet d'évaluer la qualité de la matière première et de prévoir les traitements technologiques adaptés.

##### 1.4.1. Caractéristiques organoleptiques

###### 1.4.1.1. La couleur

Le lait est un liquide blanc mat, opaque à cause des micelles de caséinates, ou parfois bleuté ou jaunâtre du fait du bêta carotène ou de la lactoflavine contenue dans la matière grasse (Sousa et Malcata, 2002). Si l'on retire la matière grasse et les protéines du lait, par exemple lors de la fabrication du fromage, le sérum qui en résulte présente une couleur verdâtre. C'est la lactoflavine qui se manifeste (Larpent, 1997).

###### 1.4.1.2. L'odeur

Toujours une faible odeur et variable en fonction de l'alimentation de la femelle productrice (Sousa et Malcata, 2002). Il faut noter que le lait est capable de fixer très facilement les odeurs environnantes. Il faut donc le manutentionner dans des récipients rigoureusement propres et à l'abri de l'air (Cidil, 1995).

#### 1.4.1.3. La saveur

La saveur est douceâtre, faiblement sucrée grâce à sa richesse en lactose (Sousa et Malcata, 2002).

#### 1.4.1.4. La viscosité

La viscosité en fonction de l'espèce, on distingue : Un lait visqueux chez les monogastriques (jument, ânesse, carnivores, et femme), on parle de lait albumineux et un lait moins visqueux chez les herbivores (lait de brebis plus visqueux que celui de la vache), ce lait est dit caséineux (Sousa et Malcata, 2002).

### 1.5. Caractéristiques physico-chimiques

#### 1.5.1. La densité

Elle est entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,033 à 20°C. La densité des laits écrémés est supérieure à 1,035. Un lait à la fois écrémé et mouillé peut avoir une densité normale (Vierling, 1999).

#### 1.5.2. Le pH

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais à un pH se situe entre 6.6 et 6.8. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une diminution du pH (Beka, 2011).

#### 1.5.3. Le point de congélation

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes. Sa valeur moyenne est entre -0,54 °C et - 0,55°C (Mathieu, 1998). Il est légèrement inférieur à celui de l'eau puisque la présence des solides solubilisés abaisse le point de congélation. Il peut varier de -0,530°C à -0,575°C avec une moyenne à -0,555°C (Bourgeois et al., 1996).

#### 1.5.4. Acidité de titration ou acidité Dornic

Le lait présente une acidité qui peut être titrée par une solution de la soude (0.1M) en présence de phénophtaléine à 1 % comme indicateur coloré. Cette acidité est exprimée en degré Dornic, c'est-à-dire en décigramme d'acide lactique par litre. Un lait frais doit avoir une acidité entre acidité 15 et 18°D (Beka, 2011).

Les caractéristiques physico-chimiques des laits de diverses espèces sont représentées dans le **tableau 3**

**Tableau 3:** Caractéristiques physico-chimiques des laits de diverses espèces animales (FAO, 2006).

Constantes	Vache	Bufflone	Chamelle	Chèvre	Brebis
Densité de lait entier à 20 °C	1,028-1,033	1,029-1,033	1,025-1,038	1,027-1,035	1,034-1,039
Point de congélation (°C)	0,520-0,550	0,544	0,58	0,550-0,583	-0,57
pH-20 °C	6,60-6,80	6,66-6,82	6,20-6,82	6,45-6,60	6,50-6,85
Acidité titrable (°Dornic)	15-17	14-18	-	14-18	22-25
Viscosité du lait entier à 20 °C (centipoises)	2,0-2,2	-	-	1,8-1,9	2,86-3,93

## 1.6. Caractéristiques microbiologiques de lait

Le lait est un aliment dont la durée de vie est très limitée. En effet, son pH voisin de la neutralité, le rend très facilement altérable par les microorganismes et les enzymes, sa richesse et sa fragilité font du lait un milieu idéal aux nombreux microorganismes comme les moisissures, les levures et les bactéries qui se reproduisent rapidement (Gosta, 1995).

### 1.6.1. La flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de  $10^3$  germes/ml) (Cuq, 2007). La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (Vignola, 2002). Il s'agit de microcoques, mais aussi streptocoques lactiques et lactobacilles. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation (Guiraud, 2003) et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (Varnam et Sutherland, 2001) (tableau 4).

**Tableau 4:** Flore originelle du lait cru de vache (Vignola, 2002).

Microorganismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus sp</i>	30-90
<i>Lactobacillus sp</i>	10-30
<i>Streptococcus sp</i> ou <i>Lactococcus sp</i>	<10
Gram négatif	<10

### 1.6.2. La flore de contamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (Vignola, 2002).

#### 1.6.2.1. La flore d'altération

La flore d'altération causera des défauts sensoriels de goût, d'arôme, d'apparence ou de texture et réduira la vie du produit laitier. Parfois, certains microorganismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes.

Les principaux genres identifiés comme flore d'altération ; les coliformes, et certains levures et moisissures (Essalhi, 2002).

##### ✓ Les coliformes

En microbiologie alimentaire, on appelle <coliformes> les entérobactéries fermentant le lactose avec production de gaz à 30°C. Cependant, lorsqu'ils sont en nombre très élevé, les coliformes peuvent provoquer Des intoxications alimentaires. Le dénombrement des coliformes a longtemps été considéré comme un indice de contamination fécale. Comme les entérobactéries totales, ils constituent un bon indicateur de qualité hygiénique. (Guiraud, 2003).

##### ✓ Les levures

Bien que souvent présentes dans le lait, elles s'y manifestent rarement. Peu d'entre elles sont capables de fermenter le lactose. Le genre *Torulopsis*, productrices de gaz à partir du lactose, supportent des pressions osmotiques élevées et sont capable de faire gonfler des boîtes de lait

concentré sucré (FAO, 2007). Les levures associées au lait sont les espèces suivantes : *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candia kefir*, (**Bourgeois et al., 1988**).

#### ✓ Les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques. Ce sont des eucaryotes hétérotrophes, ils sont obligés de prélever le carbone et l'azote nutritifs de la matière grasse, le sucre et les protéines. D'une façon générale, les aliments sont des substrats très favorables à leur développement, ces germes peuvent y causer des dégradations par défaut d'apparence, mauvais goût, ou plus gravement production de mycotoxines (**Cahagnier, 1998**).

#### 1.6.2.2. La flore pathogène

La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, et elle fait, alors, suite à une excrétion mammaire de l'animal malade ; elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux) ou bien liées à l'Homme (**Brisabois et al., 1997**). Parmi ces germes :

#### ✓ Bactéries infectieuses

Qui doivent être vivantes dans l'aliment lors de sa consommation pour agir. Une fois ingérées, elles dérèglent le système digestif. Apparaissent alors divers symptômes connus, tels que la diarrhée, les vomissements, les maux de tête...etc.

#### ✓ Salmonelles

Ces entérobactéries lactose-, sont essentiellement présentes dans l'intestin de l'Homme et des animaux. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives, leur survie et leur multiplication est possible dans un milieu privé d'oxygène. Elles se développent dans une gamme de température variant entre 4°C et 47°C, avec un optimum situé entre 35 et 40°C. Elles survivent aux basses températures et résistent à la réfrigération et à la congélation. En revanche, elles sont détruites par la pasteurisation (72°C pendant 15 secs). Elles sont capables de se multiplier dans une gamme de pH de 5 à 9, mais sont sensibles à la fermentation lactique (**Jay, 2000 et Guy, 2006**).

#### ✓ Listeria

Les bactéries du genre *Listeria* se présentent sous la forme de petits bacilles de forme régulière arrondis aux extrémités et ne formant ni capsule ni spore. Elles sont à Gram positif (Seelinger et Jones, 1986). Leur croissance est possible entre 0 °C et 45 °C (température optimale : 30°C-

37°C), pour des pH compris entre 4,5 et 9,6. Elles sont mobiles grâce à des flagelles péritriche (Lovett, 1989).

*Listeria monocytogenes* peut être considérée comme un agent pathogène alimentaire « parfait » car elle est ubiquiste, très résistante aux conditions extrêmes (température, pH...) et surtout elle est capable de se développer aux températures de réfrigération des aliments. (Kornacki et Marth, 1982).

#### ✓ Bactéries toxinogènes

Qui produisent une toxine dans l'aliment qui est responsable de l'intoxication du consommateur. Il n'est donc pas suffisant de détruire la bactérie pour éviter l'incidence de la maladie. De plus, certaines toxines sont très résistantes aux traitements thermiques, telle que la pasteurisation et même la stérilisation (Lamontagne et al., 2002).

Les principaux micro-organismes toxinogènes :

#### ❖ Staphylocoques

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Staphylococacae*. Ce sont des coques à Gram positif de 0,5 à 2,5 µm de diamètre, non sporulés et immobiles. (Leyral et Vierling, 2007). Ils se trouvent assez fréquemment dans le lait et parfois, en nombre important. L'origine de la contamination est l'infection mammaire et peut être plus fréquemment, l'Homme. Leurs fréquence tend à augmenter du fait de leur antibiorésistance, ils provoquent par leur production de toxines thermostables, des intoxications de gravité variable pouvant être redoutable chez l'enfant (FAO, 2007). Pour cela, les normes exigent leur absence dans les produits alimentaires (J.O.R.A, 1998).

#### ❖ Les clostridiums sulfito-réducteurs

Ce sont des bâtonnets sporulés, mobiles, Gram+ anaérobies stricts, présentent généralement dans le sol et l'eau, mais aussi dans le tube digestif Humain et animal, le pouvoir pathogène est dû à la synthèse des toxines (Lamontagne et al., 1996).

### 1.7. Principales Activités des micro-organismes dans le lait

Les altérations du lait sont associées à la multiplication de levures, moisissures et bactéries. Les contaminations bactériennes sont les plus fréquentes et les plus importantes et leurs potentialités de développement les plus à craindre.



Ces processus de dégradation sont possibles, lorsque les conditions du milieu environnant sont favorables à la prolifération microbienne et à l'activité enzymatique. De graves défauts de goût et d'odeur peuvent apparaître (**Kim et al., 1982**).

Parmi ces activités :

### 1.7.1. Acidification

Un tel processus conduit à la coagulation de la caséine et à la prise en masse du lait. Selon la température du lait et les bactéries impliquées, le phénomène de coagulation sera plus ou moins rapide : de 10°C à 37°C, le germe le plus fréquemment impliqué est *Streptococcus lactis* avec plus rarement association avec des coliformes, entérocoques, microcoques et lactobacilles. Au-dessus de 37°C, les germes en cause sont *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* et *Lactobacillus bulgaricus*. A des températures inférieures à 10°C, le processus est plus lent, la prise en masse nécessite un délai relativement important. Le caillot peut être dégradé dans une seconde étape par les espèces psychrotrophes protéolytiques : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, microcoques ... (**Guiraud et Galzy, 1980 ; Leyral et Vierling, 2007**).

### 1.7.2. Protéolyse

Au cours de leurs activités métaboliques, certains microorganismes, grâce à l'action de leurs protéases, dégradent des fractions protéiques du lait. Ce phénomène produit la libération de sous-produits très variés, dont des peptides à longue ou courte chaîne à l'origine des goûts amers. Les germes incriminés sont *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* (**Vignola, 2002 ; Guiraud, 2003**).

### 1.7.3. Lipolyse

La lipolyse est une réaction enzymatique de dégradation de la matière grasse qui se traduit dans le lait par une augmentation de la teneur en acides gras libres. Au-delà de certains seuils, cette augmentation peut provoquer l'apparition de défauts de goûts (rance) dans les produits laitiers (**Heuchel et al., 2003**). Dans un lait cru réfrigéré, la flore dominante est représentée par les psychrotrophes. 70% ou plus de cette population possèdent une activité lipolytique. Cependant, elle n'est perceptible au goût qu'à partir des teneurs de  $10^6$  à  $10^7$  germes/ml, c'est-à-dire pour des laits crus considérés comme très pollués (**Richard, 1983 ; Chilliard et Lamberet, 1984**).

## 1.8. Principaux constituants du lait de vache

Le lait est un système complexe constitué d'une solution aqueuse, d'une suspension colloïdale et d'une émulsion (**Remana, 2013**). Les principaux constituants du lait sont (**Pougheon et Goursaud, 2001**) :

- L'eau, très majoritaire,
- Les glucides principalement représentés par le lactose,
- Les lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras,
- Les sels minéraux à l'état ionique et moléculaire,
- Les protéines, caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles,
- Les éléments à l'état de trace mais au rôle biologique important, enzymes, vitamines et oligoéléments.

### 1.8.1. L'eau

L'eau représente environ 81 à 87% du volume du lait, les autres éléments constituent la matière sèche totale ou extrait sec. L'extrait sec dégraissé correspond à l'ensemble des composants de la matière sèche à l'exception des matières grasses. L'eau du lait se trouve sous deux formes: l'eau libre (96 % de la totalité) et l'eau liée (4 %) à la matière sèche (**FAO, 1985**). C'est donc l'élément quantitativement le plus important. Elle conditionne l'état physique des autres constituants, en intervenant dans l'émulsion de la matière grasse et la dispersion des micelles de caséines (**Mahaut et al., 2003**).

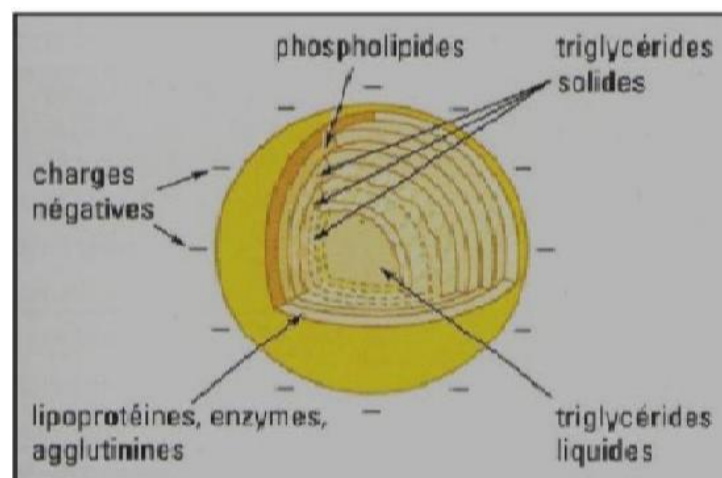
### 1.8.2. Lipides ou matières grasses

Les lipides du lait n'ont aucun rôle dans le phénomène de coagulation. Ils sont constitués en majeure partie de triglycérides qui représentent 97 à 99% des lipides totaux (**Tableau 4**). Ces lipides se solidifient à température ambiante (**Boyaval et al., 1995**)

La matière grasse du lait est à l'état d'émulsion dans le lait sous forme de globules sphériques d'un diamètre variant entre 1,5 et 10 millièmes de millimètre (**Figure 1**). Sa composition et sa structure ne sont pas homogènes : une fraction majeure localisée à l'intérieur du globule gras est constituée par les glycérides et les stérides ; la fraction mineure représentée par les lécithines, elle est située à l'interface du globule. Son rôle est de stabiliser la phase grasse en la maintenant à l'état d'émulsion. (**FAO, 1985**).

**Tableau 5:** Principaux constituants de la fraction lipidique (Vignola, 2002).

Composant	proportions des lipides
Triglycérides	98
Phospholipides	1
Fraction insaponifiable	1

**Figure 1:** Schéma de la composition de la matière grasse du lait (Bylund, 1995).

### 1.8.3. Protéines

La fraction azotée est la partie la plus complexe du lait. Elle est probablement moins bien connue dans sa constitution et dans les transformations qu'elle peut subir (Vétier et al., 2000).

Cette fraction représente 97% des protéines pour le lait de vache (Bonfoh et al., 2005). Parmi les protéines on distingue essentiellement les caséines, les protéines du lactosérum et les protéases peptones (Vétier et al., 2000).

Le taux de matières azotées totales du lait appelé taux protéique (TP) conditionne la valeur ajoutée du lait. En effet, plus le taux protéique est élevé et plus le rendement de transformation fromagère sera bon (CAA, 1996). On distingue deux groupes de matières azotées dans le lait : les protéines et les matières azotées non protéiques [Luquet, 1990].

#### 1.8.3.1. Caséines

On distingue essentiellement trois types de caséines : la caséine  $\alpha$ , la caséine  $\beta$  et la caséine  $\kappa$ , représentant environ 78 % des composés azotés du lait.

Les caséines précipitent si on acidifie le lait à pH 4,6 ou on fait réagir une enzyme spécifique comme la chymosine (Cheftel et *al.*, 1985).

### 1.8.3.2. Caséines $\alpha$ S

C'est la protéine la plus importante en masse, elle possède 199 AA et un poids moléculaire de 23 614 KDa. Cette caséine est très sensible au calcium au pH normal du lait (pH=6,7), quelle que soit la température et en présence de calcium, on constate une formation de flocons.

### 1.8.3.3. Caséine $\alpha$ S2

Elle représente 8 à 11% de la micelle de caséine, possède 207 AA et 13 à 10 phosphates (il s'agit de  $\alpha$ S2 ou  $\alpha$ S3 ou  $\alpha$ S4 ou  $\alpha$ S6 selon le nombre de phosphates) et son poids moléculaire estimé varie de 25150 à 25390 KDa.

### 1.8.3.4. Caséine $\beta$ et $\gamma$

**La caséine  $\beta$**  Représente 25 à 35% de la micelle, avec ses 209 AA et 5 groupements phosphates, elle possède beaucoup d'analogie avec la caséine  $\alpha$ S1.

**La caséine  $\gamma$**  sous forme de fragments C-terminaux résultant de la protéolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine.

### 1.8.3.5. Caséine $\kappa$

Cette caséine se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure. La coagulation du lait se fait suite à la protéolyse de cette caséine par la présure qui scinde la molécule en deux parties, la partie N-terminale (1-105) ou para caséine et le fragment C-terminal (106-169) ou caséino macropeptide (CMP) aux propriétés très contrastées.

## 1.8.4. Micelle de caséine

### 1.8.4.1. Définition de la micelle de caséine

La micelle de caséine est constituée de 10 à 100 submicelles reliées entre elles par l'intermédiaire de pont phospho-calcique (**Figure 2**). Les résidus phosphosérines et les groupements acides des acides aminés participent à l'interaction des submicelles avec le calcium.

### 1.8.4.2. Formation de la micelle de caséine

Les différentes caséines vont s'associer entre elles de façon à créer un édifice plus volumineux: la submicelle et les submicelles de caséine qui vont s'associer pour donner la micelle de caséine.

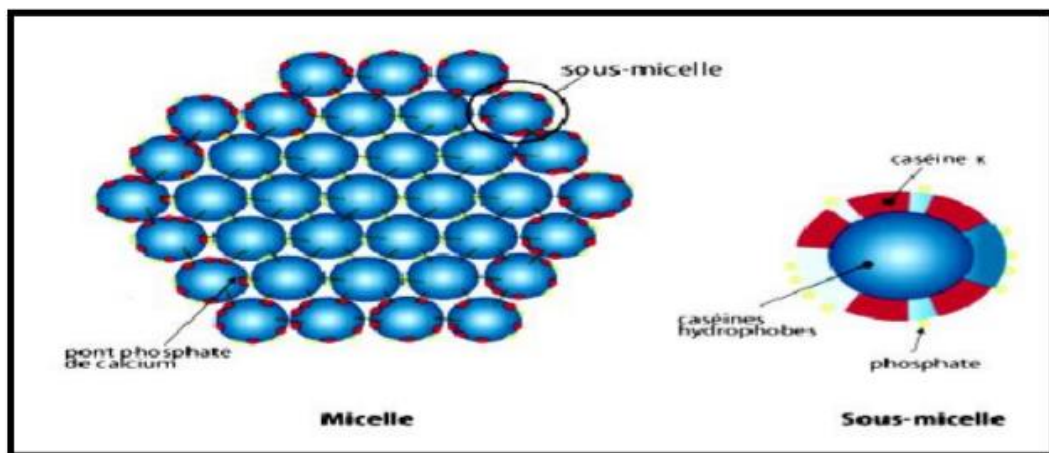
La sous-micelle de caséine résulte de l'association des caséines alpha, bêta et kappa qui représente environ 92% de la masse de la sous-micelle, le reste étant représenté par des minéraux

Il semblerait qu'il y ait deux familles de submicelles :

Les submicelles de type F2 sont constituées par l'association des caséines  $\kappa$  et S1 et S2. Elles se retrouveraient en surface des micelles. La caséine  $\kappa$  formerait une « chevelure » hydrophile à la surface de la micelle.

Les submicelles de type F3 sont constituées par les caséines S1 et  $\beta$ . Elles seraient positionnées au cœur de la micelle.

Le diamètre de la micelle varie entre 50 à 600 nm et le diamètre moyen est de 120 nm. Le rayon de la micelle de caséine est inversement proportionnel au contenu en caséine  $\kappa$ . En effet, les plus petites micelles renferment de plus fortes proportions de caséine  $\kappa$  en raison du ratio surface/volume élevé des petites micelles. Quoique le contenu en calcium et en phosphore micellaire augmente avec l'augmentation du diamètre micellaire.



**Figure 2:** Structure de la micelle de caséine (Amiot et al., 2002).

#### 1.8.4.3. Facteurs de stabilité de la micelle

Les micelles de caséines compte tenu de leurs dimensions, présentent une grande stabilité. Elles supportent une longue conservation et des traitements thermiques ou mécaniques relativement sévères. Plusieurs facteurs contribuent à conférer aux micelles leur stabilité; les principaux sont leur charge électrique et leur degré d'hydratation.

La charge électrique des micelles du lait frais est fortement négative. Ce caractère résulte de la présence de nombreux groupements  $\text{COO}^-$ , correspondant aux acides aminés dicarboxyliques

constituant en particulier la caséine  $\kappa$ . Ainsi, les répulsions électrostatiques s'opposent au rapprochement des micelles et à leur agrégation. Ces répulsions contribuent au maintien de la dispersion malgré la très forte densité de la population et la faible distance entre particules.

Le degré d'hydratation des micelles est élevé : 1 g de protéines fixe environ 2,5 g d'eau. Ce caractère très hydrophile de la micelle correspond à la présence à sa périphérie d'une couche d'eau liée, étroitement fixée aux protéines, et d'une couche d'eau d'hydratation à structure moléculaire plus lâche, et moins orientée. Ces enveloppes d'eau contribuent à stabiliser fortement la micelle.

Ces facteurs primaires de la stabilité des micelles dépendent eux-mêmes de divers paramètres. Les uns liés à la composition saline de la phase aqueuse (concentration en ions  $H^+$ ,  $Ca^{++}$ , phosphate, etc.); les autres liés à la composition même des micelles (teneur en phosphate de calcium, proportion de la caséine  $\kappa$ ) (Alais, 1984).

#### 1.8.5. Protéines du lactosérum

Elles se retrouvent dans le lactosérum et sont qualifiées de solubles parce qu'elles ne précipitent pas au  $pH_i$  de la caséine entière.

Les deux principales protéines du lactosérum sont l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline. Leur composition en acides aminés est très différente de celle des caséines en ce qu'elles contiennent moins d'acide glutamique et proline mais sont plus riches en acides soufrés (Ramet et Weber, 1980).

Le lactosérum contient également des protéoses-peptones qui sont des substances glycoprotéiques peu abondantes dans le lait (Vétier et al., 2000).

### 1.8. Lactose

Le lactose est prépondérant parmi les glucides du lait ; c'est un diholoside, composé d'un  $\alpha$  ou  $\beta$  D-glucose et d'un  $\beta$  D-galactose, lié par la liaison 1  $\rightarrow$  4. Il est sécrété par la mamelle, à partir d'acides gras volatiles chez les ruminants. Sa teneur est très stable, entre 48 et 50 g/l dans le lait de vache. Le lactose est le seul sucre qui puisse être utilisé correctement par le jeune animal (Amiot et al, 2002).

Le lactose est quasiment le seul glucide du lait de vache et représente 99% des glucides du lait de monogastriques. Sa teneur est très stable entre 48 et 50 g/l dans le lait de vache. Cette teneur présente de faibles variations dans le sens inverse des variations du taux butyreux. Le lactose est un sucre spécifique du lait (Hoden Coulon, 1991).

## 1.9. Minéraux

Sont présents dans le lait à 7 g/l environ. Les plus représentés en quantité sont le calcium, le phosphore, le potassium et le chlore. On retrouve ces matières salines soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble. Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont particulièrement biodisponibles. Les autres (calcium, phosphore, magnésium et soufre) existent dans les deux fractions (**Libouga et al., 2001**). La teneur en moyenne en minéraux est donnée dans le **tableau 6**.

**Tableau 6:** Teneurs en minéraux de lait de vache (**Kon, 1972**).

Minéraux	Teneurs (mg pour 100g)
Sodium	50
Potassium	150
Calcium	125
Magnésium	12
Chlore	100
Acide citrique	180

## 1.10. Vitamines

On répartit les vitamines en deux classes selon leurs solubilités, soit les vitamines hydrosolubles et les vitamines liposolubles (**Vignola, 2002**) (**Tableau 6**).

Toutes les vitamines sont présentes dans le lait frais en quantité plus ou moins grande à l'exception de la vitamine B12. A noter la richesse en vitamine B1 et B2 (**Apfelbaum et al., 1981**).

Le lait est une bonne source en vitamines, on distingue les vitamines hydrosolubles (vitamines B1, B2, B6) et les vitamines liposolubles (Vitamine A, D, E, K) (**Veisseyre, 1975**).

**Tableau 7:** Teneurs moyenne en vitamines de lait de vache (Vignola2002).

Vitamines	Teneurs ( $\mu\text{g}/100\text{Ml}$ )
<b>Vitamines hydrosolubles</b>	45
Thiamine : B1	
Riboflavine : B2	175
Pyridoxine : B6	50
Niacine et niacinamide	90
Acide ascorbique : C	20
<b>Vitamines liposolubles</b>	
Vitamine A et carotènes	40
Vitamine E	100
Vitamine K	20
Vitamine D	2,4

### 1.11. Valeur alimentaire du lait

Selon **Kont, 1999**, le lait est un aliment de très grande valeur. Ces connaissances seront confirmées par le développement de la chimie et de la nutrition. Parmi les nombreuses vitamines que contient le lait, trois méritent une attention particulière :

- La vitamine A (croissance, protection de la peau et des muqueuses),
- La vitamine D (anti rachitique, meilleure fixation du calcium),
- La vitamine B2 (utilisation des glucides, protides, lipides).

### 1.12. Composants chimiques indésirables du lait

Le lait peut contenir des substances ingérées ou inhalées par l'animal, sous la forme soit du constituant original, soit de composés métabolisés. Les substances étrangères peuvent provenir des aliments (engrais et produits phytosanitaires), de l'environnement prescrits à l'animal (produits pharmaceutiques, antibiotiques, hormones) (**Mahieu et al., 1977**) .



### 1.13.1. Antibiotiques

Les résidus d'antibiotiques, surtout si ces substances sont appliquées localement pour le traitement des mammites (**Jacquet, 1969**), leurs présences dans le lait engendrent un double inconvénient. Ainsi, pour le consommateur, elle peut être responsable de phénomènes d'allergie et cancérigènes (**Michell, 2005**). Chez les sujets sensibles, elle peut contribuer à l'installation d'une flore endogène antibiorésistantes (**Morel, 1962**).

### 1.13.2. Pesticides

Les résidus de pesticides sont des substances polychlorées, liposolubles, et s'accumulent donc dans les graisses de réserve. Lors de la fonte des graisses, les substances emmagasinées sont brusquement remises en circulation, et des manifestations d'intoxication peuvent apparaître (**Beroza et Bowman, 1996**).

### 1.13.3. Métaux

Parmi les métaux susceptibles de contaminer le lait à des taux inquiétants pour la santé : le sélénium, l'arsenic, le plomb et le mercure (**Vanier, 2005**).

## 2. Coagulation du lait

### 2.1. Définition de la coagulation

La coagulation du lait est une étape importante dans la préparation du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé. On distingue deux types de coagulation : la coagulation acide et la coagulation enzymatique. Cependant, en fromagerie, la coagulation du lait résulte le plus souvent de l'action combinée d'une enzyme et de l'acidification, seule varie l'importance relative de leur action coagulante respective (**Farkye, 2004 ; JANHØJ et Qvist, 2010**)

La coagulation du lait correspond à une déstabilisation de l'état micellaire original de la caséine du lait. En fromagerie la déstabilisation du système colloïdal est réalisé soit par la voie fermentaire à l'aide des bactéries lactiques, soit par voie enzymatique à l'aide des enzymes coagulantes dont, la plus utilisée est la présure (**Hamrani, 2008**).

La coagulation enzymatique du lait provoquée par le clivage protéolytique de la caséine K par la chymosine (EC 3.4.23.4) et la synérèse ultérieure des micelles de caséine attaquées est une réaction d'importance pratique fondamentale dans l'utilisation technologique du lait et également d'un grand intérêt biochimique comme l'ont montré **Mocquot et al., (1954)**.

D'après **Gelais et Tirard, (2009)** la coagulation du lait peut être caractérisé par trois paramètres:

- ✓ Le temps de prise (temps de floculation)
- ✓ Le taux (vitesse) du raffermissement
- ✓ La fermenté maximale du gel

## 2.2. Types de coagulation du lait

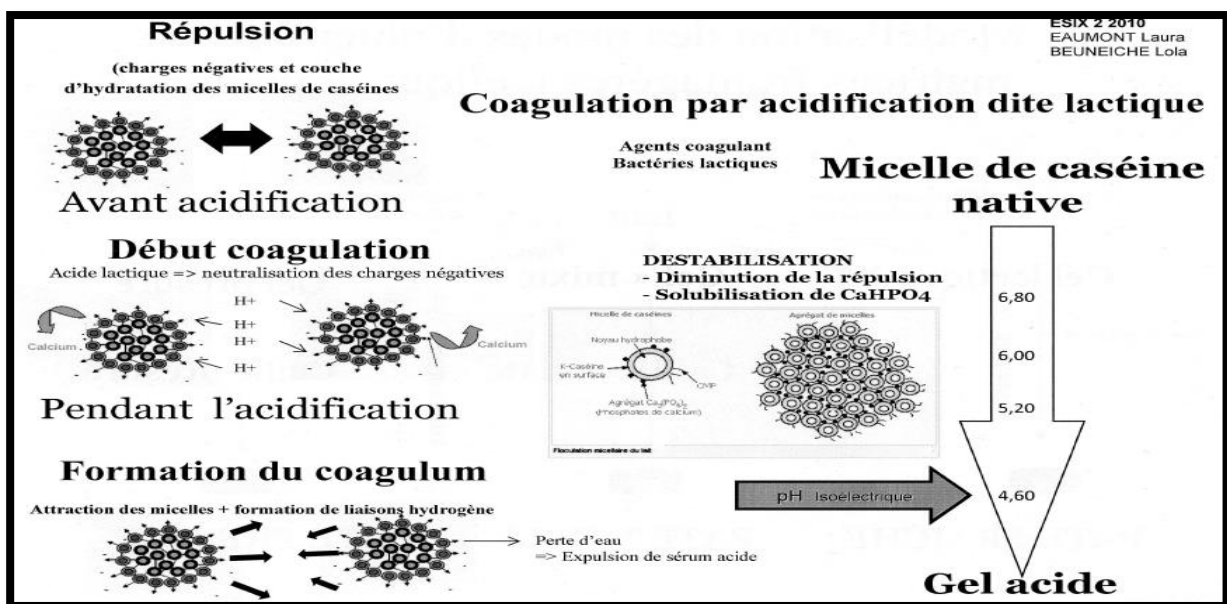
Ce processus est réalisé selon trois manières :

- Par acidification
- Par voie enzymatique
- Par voie mixte

Les mécanismes d'action de ces agents coagulants au niveau de la micelle sont très différents, bien qu'ils conduisent à la formation d'un coagulum occupant tout le volume initial du lait.

## 2.3. Coagulation par acidification

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ( $pH_i = 4,6$ ) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui fermentent le lactose en acide lactique, ou par acidification chimique par injection de  $CO_2$ , addition de glucono-delta-lactone ou l'ajout de protéines sérique à pH acide (**Mahaut et al., 2003**).

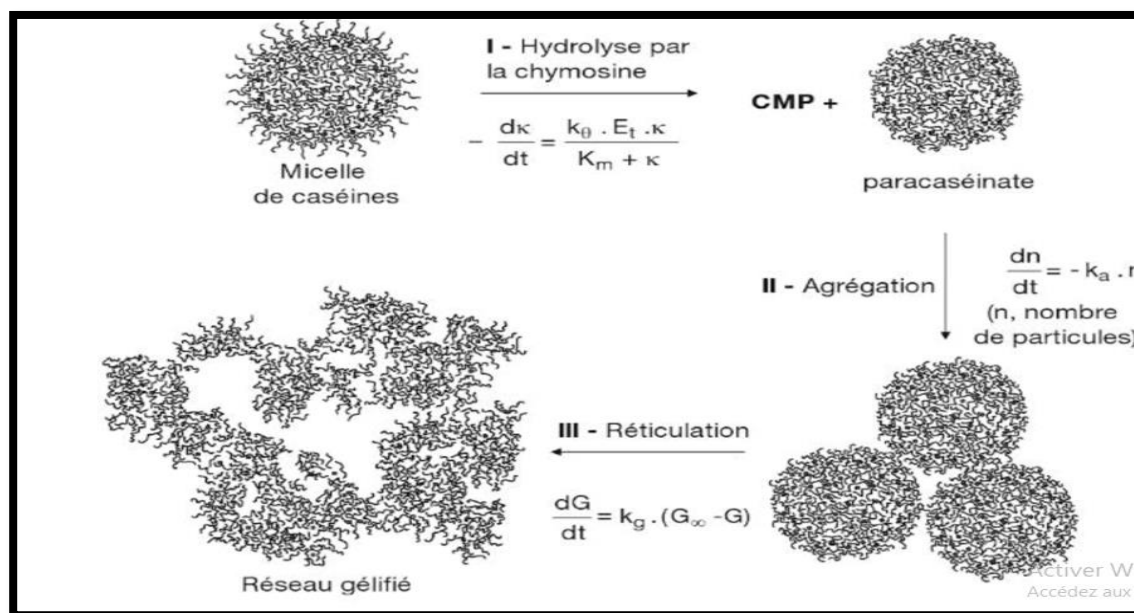


**Figure 3:** Les gels laitiers et le phénomène de coagulation par acidification (**Ronez, 2012**).

L'acidification du lait peut conduire, suivant les conditions, soit à un précipité de caséine, soit à la formation d'un gel (**Figure 3**). Si l'acidification est rapide par addition d'un acide minéral ou organique, il y a formation des caséines à leur point isoélectrique sous forme d'un précipité plus ou moins granuleux dispersé dans le lactosérum. Par contre, une acidification progressive, obtenue soit par fermentation lactique soit par hydrolyse de glucono-delta-lactone conduit à la formation d'un gel lisse homogène qui occupe entièrement le volume initial du lait (**Brulé et al., 1997; Lucey et al., 1997**).

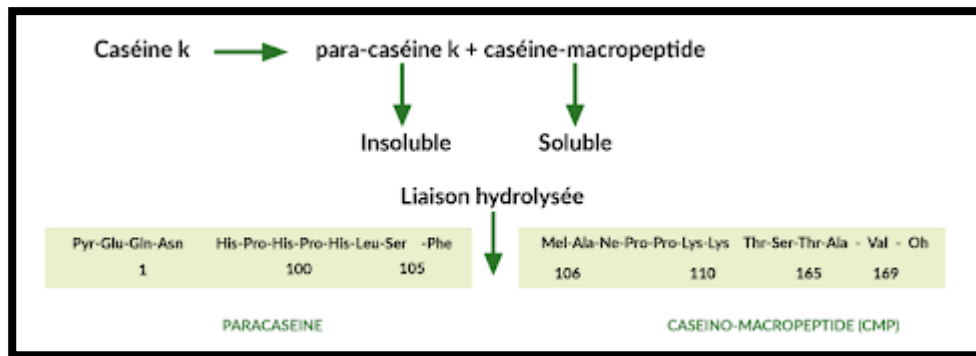
## 2.4. Coagulation enzymatique

Diverses enzymes protéolytiques ont la capacité de coaguler le lait mais la présure reste la plus utilisée. La coagulation du lait par la présure est divisée en trois étapes : la phase d'hydrolyse, la phase d'agrégation et la phase de formation du gel (**Figure 4**) (**Brown et al., 1988; Kelly et al., 1996; Horne et Banks, 2004; Ronez, 2012**).



**Figure 4:** Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation du lait par la présure (**Thomas et al., 2008**).

➤ **Phase primaire ou phase d'hydrolyse enzymatique** : L'enzyme vient couper le lien peptidique Phe105 -Met106 de la caséine  $\kappa$ , qui conduit à la formation de paracaséine  $\kappa$  (1-105) et de caséinomacropéptide (CMP 106-169) (**Figure 5**). Il est possible que l'enzyme s'attaque à une micelle et hydrolyse toutes les caséines  $\kappa$  sur son passage ou bien qu'après l'attaque d'une molécule de caséine  $\kappa$  elle retourne en solution pour diffuser jusqu'à la prochaine micelle (**Ruettimann et Ladisch, 1987**). L'hydrolyse de la caséine  $\kappa$  conduit à la modification des propriétés des micelles à un point où elles s'agrègent (**la seconde phase**) (**Lucey, 1995**).



**Figure 5:** Hydrolyse de la caséine  $\kappa$  par la présure (Fox et al., 1994).

➤ **Phase secondaire ou phase d'agrégation** : les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes. Ceci est possible parce que les charges en surface des micelles diminuent lorsque le CMP est libéré. La perte de ce segment réduit le potentiel d'interaction total de la micelle d'environ 30 à 50 %. Ce qui permet un rapprochement des micelles attaquées par l'enzyme et facilite l'agrégation (Singh et Fox, 1989; Brulé et al., 1997; Lucey et al., 1997). L'agrégation devient possible lorsque le degré d'hydrolyse de 60 à 90 % est atteint (Horne David S., 1993). Le temps nécessaire pour atteindre cette phase est désigné le temps de coagulation (Dalglish et al., 1981). En pratique, ce temps est défini comme le temps écoulé entre l'addition de la présure et l'observation visuelle de floculation.

➤ **Phase tertiaire ou phase de formation du gel** : Les micelles agrégées subissent des réorganisations impliquant des liaisons phosphocalciques ou des ponts disulfures entre les paracaséines. Dans les caillées, la présure attaque très rapidement la caséine  $\alpha_1$  en scindant les liaisons Phe23- Phe24, Phe24- Val 25, ce qui conduit à la formation d'un réseau tridimensionnel continu « le gel ». Les agrégats augmentent d'abord de taille. Par la suite, la réticulation entre les chaînes et la fusion des particules transforment le lait en gel (Ronez, 2012). Le caillé se raffermi et la synérèse débute. Cette phase de réticulation consiste en une protéolyse générale, elle est proportionnelle à la concentration en enzyme. Elle n'intervient pas directement dans le phénomène de coagulation proprement dit. C'est une réaction lente et non spécifique car elle concerne toutes les caséines. Elle débute lentement avec la réaction primaire et se poursuit durant l'affinage (Hamrani, 2008).

La figure 6 résume le phénomène de la coagulation enzymatique par la présure.

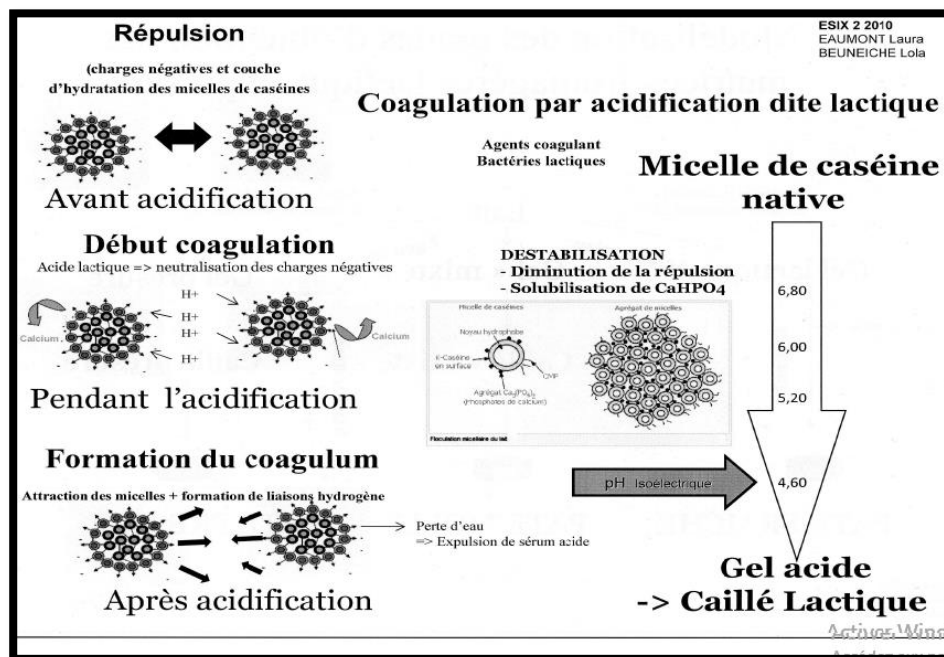


Figure 6: Les gels laitiers et le phénomène de coagulation par la présure (Ronez, 2012).

#### 2.4.1. Propriétés du coagulum obtenu par voie enzymatique

Il convient en particulier de noter que le comportement rhéologique du gel est différent selon le type d'enzyme coagulante utilisée ; aussi, par exemple, avec les enzymes d'origine fongique, le raffermissement du gel est plus lent dans les minutes qui suivent le point de floculation visible qu'avec la présure, mais ultérieurement il devient plus rapide et parfois plus important ; l'activité protéolytique propre à chacune des protéases utilisées permet d'expliquer cette évolution.

Les gels formés par voie enzymatique possèdent des propriétés rhéologiques caractéristiques : ils sont élastiques et peu friables ; leur raffermissement est rapide et important par comparaison au gel lactique, leur porosité est bonne, mais leur imperméabilité est forte, leur aptitude à l'égouttage est prononcée sous réserve de rompre leur imperméabilité caractéristique par des traitements physiques et chimiques adéquats (macération et salage), pendant la phase d'égouttage (Ramet, 1985).

#### 2.5. Coagulation mixte

Elle est réalisée par action conjointe de la présure et de l'acide lactique. Cependant, la formation du coagulum se fait généralement sous l'action dominante de la présure. C'est ensuite, progressivement qu'il acquiert des caractères lactiques. Cette opération se pratique pour l'obtention de fromages frais (petits suisses, demi-sels, etc...) et de fromages à pâte molle

(camembert, brie, etc...). Selon les pâtes, il y aura utilisation d'une dose bien précise de présure et de levains lactiques (Ramet, 1998).

Le coagulum obtenu présente des caractères intermédiaires entre ceux des gels lactiques et de la présure. Il est caractérisé par une souplesse et une contractilité moins, une fermeté et une friabilité plus accentuées que celles du gel présure (veisseyre, 1975).

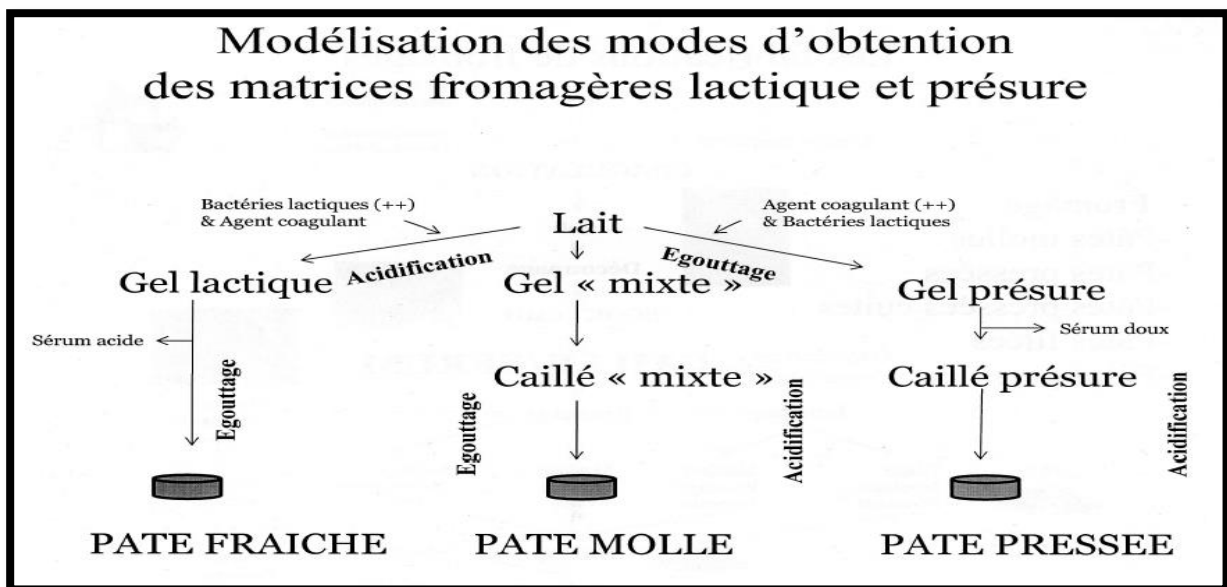
### 2.5.1. Différents coagulums obtenus

Les différents caillés obtenus selon Ronez, (2012):

- 1- Caillé lactique : l'acidification précède l'égouttage.
- 2- Caillé mixte : l'acidification et l'égouttage sont menés simultanément
- 3- Caillé présure : l'égouttage précède l'acidification :

- L'égouttage résulte de phénomènes physiques actifs, appelés : Synérèse ; et passifs lié à la porosité et la perméabilité du coagulum.
- La synérèse est la poursuite de l'organisation d'un réseau dense.

La figure 7 indique la modélisation des modes d'obtention des matrices fromagères obtenues par des différents.



**Figure 7:** Modélisation des modes d'obtention des matrices fromagères lactiques, mixtes et présure (Ronez, 2012).

Le tableau 8 représente la différence entre un caillé lactique et un caillé de présure.

**Tableau 8:** Comparaison entre un caillé lactique et un caillé de présure (Vignola, 2002).

Paramètres	Types de caillés	
	Lactique	présure
Egouttage	Faible	Elevé
Teneur en eau	Elevé	Faible
Teneur minérale	Faible	Elevé
Pouvoir tampon	Faible	Elevé
Teneur résiduelle en lactose	Elevé	Faible
Structure des caséines	Etat dissocoé	état micellaire
PH	faible < 4,6	Elevé >5
Type de texture	plastique	élastique ,solide
Durée de conservation	faible (quelques semaines)	elevé(plusieurs mois)

## 2.6. Facteurs influençant la coagulation du lait

La coagulation du lait est un processus complexe, mais des études ont montré qu'il est affecté par de nombreux facteurs, qui sont le pH, la concentration en enzyme, la température, la teneur en calcium, la teneur en caséines et la dimension des micelles (**Figure 9**) (DagleIsh et al., 1981; Mahaut et al., 2003; Nájera et al., 2003).

### 2.6.1. Influence du pH

La présure a une activité coagulante sur le lait de pH optimum voisin de 5,5. Au pH du lait frais (pH 6,65), l'activité est modérée.

En fromagerie, on acidifie le lait jusqu'à pH 6,4 – 6,5 pour que l'activité croît sensiblement, La réduction du temps de coagulation du lait bénéficie la fabrication du fromage, car elle laisse plus de temps pour le raffermissement du caillé au cours du processus de coagulation. Un caillé plus ferme pendant la coagulation est positivement corrélé au rendement en fromage (**Vallas et al., 2010**).

La vitesse de raffermissement du gel accroît avec l'augmentation de la vitesse de coagulation. Au-dessous du pH 6, la caséine se déminéralise et la désagrégation de la structure micellaire est accentuée jusqu'à devenir totale à pH 5,2. Il en résulte un affaiblissement du réseau du gel. L'influence de pH joue un rôle très important sur le temps de coagulation (**Nájera et al., 2003**).

À pH supérieur à 7, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme étant rapidement inactivée (**Lenoir et al, 2006**).

### 2.6.2. Influence de la température

L'activité de la présure influencée par la température. Elle est affectée par la température à laquelle les étapes d'emprésurage et de maturation sont conduites (**St-Gelais et Tirard-Collet, 2002**). Elle montre une activité maximale entre 40 et 42 °C et est inhibée à des températures inférieure a 10°C et supérieures à 55°C (**St-Gelais et Tirard-Collet, 2002**).

La température affect la vitesse d'agrégation d'une façon remarquable, car son augmentation diminue le temps d'agrégation et augmente la vitesse d'organisation des gels mais réduit leur fermeté maximale (**Brulé et al., 1997**).

### 2.6.3. Influence de la teneur en calcium

L'addition au lait de chlorure de calcium, pratique courante en fromagerie, diminue le temps de coagulation et accroît la fermeté du coagulum (**Montilla et al, 1995 ; Balcones et al, 1996 ; Solorza et Bell, 1998**) mais à haute concentrations de CaCl<sub>2</sub> ( $\geq 0,3M$ ), le temps de coagulation peut être augmenté (**Mcmahon et al, 1984**). L'ajout de CaCl<sub>2</sub> permet également de réduire le pH du lait résultant en une augmentation du taux d'agrégation des protéines (**Gastaldi et al, 1994**).

### 2.6.4. Effet de la concentration en d'enzyme

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme utilisé (**Mahaut et al., 2003**). Ce qui peut traduire par l'expression suivante :

$$T_c = k / E + t_a$$



**TC** : temps de coagulation.

**K** : inverse de la constante de vitesse.

**E** : concentration en enzyme

**Ta**: temps écoulé entre la fin de la réaction enzymatique et le moment de coagulation.

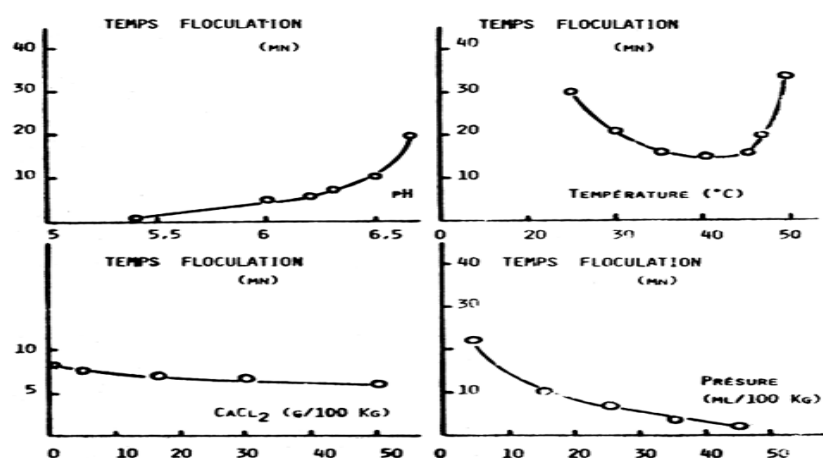
Cette équation empirique est valable pour des températures comprises entre 25 et 40°C et pour un temps de coagulation compris entre 2 et 40 minutes.

Il existe une corrélation linéaire entre la concentration en présure et le temps de coagulation. En effet, le temps de coagulation baisse lorsque la concentration en présure augmente (**Horne et Muir, 1994**). Le taux de raffermissement et la fermeté du gel augmentent quant à eux avec la concentration en présure (**St-Gelais et Tirard-Collet, 2002**).

### 2.6.5. Influence de la concentration en caséines et le diamètre des micelles de caséines

La vitesse d'hydrolyse enzymatique est proportionnelle à la teneur en protéines. Ainsi, la vitesse d'agrégation et la fermeté des gels augmentent avec la teneur en caséines.

La coagulation enzymatique est influencée par le diamètre des micelles de caséine. En outre, plus le diamètre est grand, plus le temps de prise est long et plus le taux de raffermissement et la fermeté finale sont faibles (**St-Gelais et Tirard-Collet, 2002**). En fromagerie, la taille des petites micelles sont recherchées puisqu'elles sont associées à un temps de prise plus court et un taux de raffermissement plus rapide (**Park et al., 2007**). De plus, les micelles de petites tailles fusionnent plus étroitement entre elles et caractérisent la forme dense et ferme du réseau protéique, en revanche de celle des micelles de grande taille (**Delacroix-Buchet et al., 1993; Choisy et al., 1997; Roupas et Mead, 2001**).



**Figure 8:** Influence de la variation des facteurs de milieu sur le temps de floculation

- a- influence du pH du lait
- b- influence du CaCl<sub>2</sub>
- c- influence de la température du lait,
- d- influence de la concentration de la présure (**Ramet et Weber, 1980**).

### 3. Présure

#### 3.1. Définition de la présure

La présure (EC 3.4.23.4), une protéase d'aspartate est l'enzyme principale utilisée dans la production du fromage (**Fox et al., 1993**), elle est extraite de la quatrième poche de l'estomac des jeunes ruminants avant sevrage (**Eck et Gillis, 1997**). La présure de veau traditionnelle contient deux protéases, l'une majeure constituée par la chymosine (80%) l'autre mineure, par la pepsine (10 – 20%) (**Alais et al., 2003**).

Actuellement, la présure de veau est la plus largement utilisée en fromagerie (**Mahaut et al, 2000 ; Ramet, 2006**).

#### 3.2. Propriétés physicochimiques et technologiques de la présure

##### 3.2.1. Propriétés physicochimiques

D'après (**Collin, 2015**), le ratio chymosine/pepsine doit être égal ou supérieure à 1.38. Ces deux enzymes appartiennent aux groupes des endoprotéases à aspartate dont le poids moléculaire est voisin de 35KDA et leur pH optimum d'action se situe dans la zone acide [pH 2 ; pH 6], ceci est dû à la présence de deux groupements carboxyliques apportés par deux résidus aspartyle au niveau du site catalytique.

La chymosine et la pepsine sont sécrétées par les cellules gastriques sous forme inactive appelées proenzymes ou zymogènes et elles deviennent actives sous l'action de l'acide gastrique en baissant le pH (**Mahon et Brown, 1985**).

L'activité protéolytique de la présure est fortement influencée par les facteurs du milieu en particulier le pH et la température. Le pH optimal est de l'ordre de 5.5 et la température optimale est de 42°C. L'activité est inhibée à 0°C et à 65°C (**Eck et Gillis, 1997**).

##### 3.2.2. Propriétés technologiques

Toute enzyme doit permettre de respecter les modalités habituelles du déroulement des différentes phases de la fabrication ou ne s'en éloigner que très peu, celles-ci déterminent en effet

la composition, les qualités organoleptiques du produit fini qui sont relativement constantes pour chaque catégorie de fromage (**Ramet, 1985**).

- L'activité coagulante doit être bonne dans les conditions physico-chimiques des laits habituellement transformés en fromagerie ;
- Les propriétés rhéologiques des coagulums doivent évoluer après la floculation de façon à permettre le travail mécanique du gel dans les délais habituels ;
- La synérèse du coagulum au cours de la phase d'égouttage doit permettre d'obtenir un fromage d'extrait sec et de composition chimique caractéristiques, dans un délai au plus égal à celui observé avec la présure ;
- Les modalités de l'affinage doivent permettre d'obtenir un produit fini présentant les normes organoleptiques habituelles après une durée de maturation voisine de celle des fromages fabriqués avec la présure.

Les rendements fromagers, exprimés en poids sec de fromage, doivent être au moins égaux à ceux relevés lors de l'emploi de la présure.

### 3.3. Composition de la présure

#### 3.3.1. Chymosine : (E.C.3.4.23.4)

La chymosine est une protéase acide, sécrétée sous forme de proenzyme inactive appelée prochymosine. Son activation en chymosine se fait spontanément dans la caillotte aux pH inférieurs à 5,0 par hydrolyse de l'extrémité N-terminale de la molécule (**Mahon et Brown, 1985**) tandis qu'à pH 2, elle subit un clivage d'un peptide de 27 acides aminés N-terminaux générant un intermédiaire actif appelé pseudo -chymosine de 338 acides aminés (37,4 kDa) Ce dernier est stable à un pH inférieur à 3 ou supérieur à 6 mais à pH 4,5, il se transforme en chymosin (**Kumar et al., 2010**). L'activité optimale de la chymosine est à pH 5,5 et à une température de 42°C. Lorsque la présure est extraite d'animaux adultes, la proportion chymosine /pepsine est inversée et la pepsine (EC 3.4.23.1) prédomine (**Sousa et al., 2001**). La chymosine représente plus de 80 % de l'activité coagulante (**Andren, 2002**). L'activité coagulante de 1 mg de chymosine correspond à celle de 5 mg de pepsine à pH 6,7 (**Endren, 2002**).

#### 3.3.2. Pepsine (E.C. 3.4.23.1, 2,3)

La pepsine est une protéase acide sécrétée dans le suc gastrique de tous les mammifères après sevrage (adultes) sous forme de précurseur inactif appelé pepsinogène d'un poids

moléculaire de 42 KDa. Elle hydrolyse la plupart des protéines naturelles telles que la caséine, la globuline, et certaines enzymes telles que la trypsine, la papaine et les amylases, attaque électivement les peptides contenant de la L-Phénylalanine ou de la L-Tyrosine et plus généralement les acides aminés à noyau aromatique (Yamamoto, 1975). La pepsine en tant qu'agent coagulant unique n'est pas préférée dans la fabrication du fromage en raison de sa forte activité protéolytique. Les présures animales sont généralement enrichies par addition de pepsines pour une activité protéolytique appropriée (Temiz et al., 2008).

**Tableau 9:** Origine des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait (Mietton , 1991).

Origine		Enzyme
Animal	Ruminant : -Veau -Chevreau -Agneau -Bovin adulte Porc Poulet	<u>Chymosine +Pepsine</u>  <u>Pepsine porcine</u> <u>Pepsine aviare</u>
Végétal	Figuier Chardon+artichaut Ananas (tige)	Ficine Cardosine A et B Bromeline
Microbienne	Moisissure : -Mucor mehel -Mucur pusillus -Aspergillus niger Levures : -Kiuywromyes lactis Bacterie : -Echerichia .coli -Bacillus subtilis	Protéase de Mm ,Mp ,Cp Chymosine « génétique »  Chymosine « génétique »  Chymosine « génétique »

### 3.3.3. Succédanés de présure d'origine animale

Plusieurs protéases d'origine animale ont fait l'objet d'expérimentations dans le but d'une utilisation possible en industrie fromagère.

La trypsine et la chymotrypsine entraînent des modifications profondes des modalités de fabrication et de la qualité des produits finis consécutives à la forte activité protéolytique. Ces enzymes ne sont pas utilisées au plan industriel. Seules les pepsines porcines et bovines semblent intéressantes dans l'industrie fromagère.

➤ **La pepsine porcine :** est une protéase à caractère plus acide que la chymosine, son activité est bonne en milieu acide, mais décroît fortement au-dessus du pH 6,3 ; au pH du lait frais, la coagulation n'apparaît pas. Elle 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 gastricine (**Adoui, 2007**).

Le principal inconvénient de la pepsine porcine comme agent coagulant du lait est le fait que son activité coagulante est fortement dépendante du pH, elle est instable au-dessus de pH 6, elle est partiellement dénaturée et après 1 heure, seulement 50% de son activité coagulante est maintenue .une dénaturation irréversible survient à un pH supérieure à 7 et à une température au-dessus de 55°C (**Brown et al., 1988**).

➤ **La pepsine bovine :** est un des constituants mineurs normaux de la présure, mais dont la sécrétion devient prépondérante après sevrage. La pepsine bovine apparaît très voisine de la présure et son activité est moins dépendante du pH que celle de la pepsine porcine. C'est une enzyme coagulante, obtenue à partir des caillottes de bovins adultes sevrés, qui contient dans des proportions différentes, les mêmes protéases que celle de la présure (chymosine 6 à 9 % ,gastricine 6 à 9%,pepsine 85 à 93%) et elle présente une activité coagulante sensiblement inférieure à celle de la présure (**Martin, 1984**).

➤ **La pepsine gastricine :** nommée aussi pepsine C, elle à une forte activité vis-à-vis de l'hémoglobine (Linden et Humbert, 1991),a été également expérimentée avec succès en Israël pour la fabrication de fromages locaux (**Hamrani, 2008**).

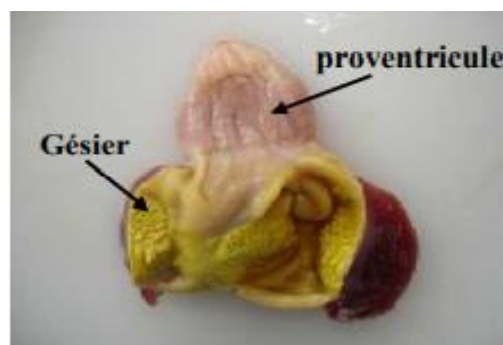
➤ **La pepsine extraite du proventricule de poulet :** Permettrait la fabrication de Cheddar si la maturation n'excède pas trois mois. **Paez De Leon et al. (1995)** avaient entrepris une étude sur une pepsine isolée à partir des estomacs de poulet. Ces auteurs ont utilisé la pepsine de poulet purifiée comme agent coagulant dans la production industrielle de fromages blancs pasteurisés. Les résultats obtenus pour le fromage à pâte molle sont comparés avec un fromage obtenu avec par la présure, confirment qu'il ya aucune différence dans le rendement et la qualité du fromage (**Morsli, (1997)**). La pepsine de poulet est sensible au changement de pH. En effet, l'optimum de son activité est entre pH 1,5 et 4,5. A pH 1,5 elle est active à 90% et elle perd son activité avec l'augmentation de pH pour atteindre 35% de sont activité maximale à pH 4,5 et reste stable jusqu'à pH de 8 et elle est totalement inactivée au-delà de pH 8,5, sont pH optimum sur l'hémoglobine est de 2,8 (**Bohak, 1969**).

### ➤ La pepsine de poulet

La pepsine du poulet est extraite du proventricule ou ventricule succenturié qui est un renflement fusiforme de 3 cm de long en moyenne, situé au-dessus du gésier, il est revêtu d'un épithélium de cellules cylindriques.

Le pepsinogène du poulet est composé de 387 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 43000 Da. La pepsine elle, est composée de 308 résidus d'acides aminés et un poids moléculaire de 35000 Da (**Bohak, 1969**).

Le pH optimum de la pepsine du poulet est de 2.8. L'enzyme reste stable à pH 8, et devient inactive à pH 8,5 (**Bohak, 1969**). Les travaux de **Green et al., (1984)**, ont montré que le cheddar préparé par un mélange de pepsine de poulet et de pepsine porcine était similaire à celui préparé par de la présure. **Gordin et Rosenthal, (1978)** ont utilisé la pepsine de poulet pour la fabrication de l'emmental et un autre fromage traditionnel de type Kashkaval, qui sont des fromages à pâte molle ; ils ont obtenu de meilleurs résultats et des fromages de qualité comparable à celles obtenues par la présure.



**Figure 9:** Complexe stomacal du poulet (**Bohak, 1969**)

Certains succédanés d'origine animale peuvent être considérés comme des produits de remplacement acceptables de la présure de veau ; il convient toutefois de remarquer que, comme pour l'élaboration de la présure, leur disponibilité reste tributaire du marché de la viande (**FAO, 1998**).

## 4. Fromage

### 4.1. Définition du fromage

Dans la réglementation française, la dénomination "fromage" désigne un produit fermenté ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait qui peut être partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la

partie aqueuse. La teneur en matière sèche du produit doit être au minimum de 23 g pour 100 g de fromage, à l'exception de certains fromages frais (**Jorf, 1988**)

Le fromage est un produit alimentaire obtenu à partir de lait coagulé ou de produits laitiers, puis d'un égouttage suivi ou non de fermentation et éventuellement d'affinage (**Aurelien, 2010**)

Selon le Codex alimentaire Standard 283-1978 (**Alimentarius, 1978**): Le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi-dure, dure ou extra-dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine ne dépasse pas celui du lait :

- ✓ Le fromage affiné : est un fromage qui n'est pas prêt à la consommation peu après sa fabrication, mais qui doit être maintenu pendant un certain temps à la température et dans les conditions nécessaires pour que s'opèrent les changements biochimiques et physiques caractéristiques du fromage.
- ✓ Le fromage affiné aux moisissures : est un fromage affiné où l'affinage est provoqué essentiellement par la prolifération de moisissures caractéristiques, dans la masse et/ou sur la surface du fromage.
- ✓ Le fromage non affiné dont le fromage frais est un fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après sa fabrication.

Le fromage est obtenu par la coagulation complète ou partielle des protéines du lait, du lait écrémé, du lait partiellement écrémé, de la crème, de la crème de lactosérum ou du babeurre, seuls ou en combinaison, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation.

#### 4.1.1. Le fromage frais

La pâte fraîche est la première étape de fabrication de tout fromage, avant toute fermentation et tout affinage. La pâte fraîche est faite à partir de lait et pour certains de petit-lait (lactosérum) tiré du lait entier ou écrémé comme le fromage à la crème. D'autres peuvent être enrichis de crème, la pâte fraîche doit réserver une consistance plus ferme tout en conservant un taux d'humidité très élevé, de 60 à 80% et une teneur en matière grasse réduite de 0.5 à 30 %, acide et peu minéralisée (**Eck et Gillis, 1997**).

Traditionnellement sont des fromages à égouttage lent. Ils résultent de la coagulation à prédominance lactique du lait, combinant souvent l'action des ferments lactiques à celle de la présure. Ces fromages se caractérisent par l'absence d'affinage après les étapes d'égouttage et de moulage (**Corrieu et Luquet, 2005**).

La norme FAO/OMS (n°A-6 ,1978 modifiée en 1990) donne la classification officielle des fromages en fonction de leur teneur en eau dans le fromage dégraissé (HFD), de leur teneur en matière grasse (G/S) et des principales caractéristiques d'affinage. Selon cette norme, le fromage appelé Jben fabriqué en Algérie, est un fromage à pâte molle, mi- gras et frais.

En effet il y a trois types de procédés de fabrication de fromage frais artisanal :

- Une étape d'acidification spontanée, à température ambiante, pendant 24 h à 72 h selon la température.
- A partir du lait cru de brebis ou de chèvre, acidifié spontanément et coagulé par des enzymes coagulantes d'origine végétale issues des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus L*), ou d'artichaut (*Cynara scolymus*), ou du latex de figuier (*Ficus carica*) ou des graines de citrouille (Le végétal est utilisé pour accélérer la coagulation et pour donner un certain goût au fromage).
- En utilisant de la présure animale, du lait de vache et des levains acidifiants est utilisé industriellement.

## **4.2. Étapes de fabrication du fromage**

La fabrication du fromage comporte trois phases principales (**Vignola, 2002**) :

- La coagulation.
- L'égouttage.
- L'affinage.

La standardisation de lait précède ces étapes. Ainsi qu'il faut signaler le salage avant l'affinage (**Eck et Gillis, 1997**).

### **4.2.1. La standardisation**

Elle consiste à amener le lait à une concentration donnée en matière grasse, en protéines, en chlorure de calcium et un pH donné pour aboutir à un fromage aux caractéristiques physicochimiques définies avec un rendement fromager satisfaisant (**Vignola, 2002**).

### **4.2.2. La coagulation**

La coagulation du lait est une étape importante dans la fabrication du fromage et son succès est un paramètre important pour obtenir un fromage de haute qualité (**Fox et al., 2004**).



Elle correspond à la transformation du lait liquide en un coagulum par des modifications physicochimiques qui interviennent au niveau des micelles de caséine sous l'action d'enzymes protéolytiques et/ou d'acide lactique (**Lapointe-Vignola, 2002; Vignola, 2002; Fox et al., 2004; Jeantet, 2006**).

#### 4.2.3. L'égouttage

L'égouttage est un phénomène dynamique qui se caractérise par la quantité de lactosérum éliminé durant le temps. En effet, il fixe les caractéristiques physiques (pH et aw) et chimiques du caillé et par conséquent l'affinage du fromage (**Weber, 1997**).

Dans cette étape il y a l'élimination de la majorité du lactosérum expulsé par synérèse, qu'il soit à l'intérieure ou à l'extérieure de caillé (**Jeantet, 2006**), il s'effectue en deux périodes l'une après la coagulation et persiste jusqu'au démoulage et l'autre dite complémentaire se produit dès le démoulage jusqu'à la fin de l'affinage (**Alais, 1984; Eck et Gillis, 1997; Fox et al.,**

#### 4.2.4. Le salage

Le salage est une opération qui consiste à l'enrichissement de la pâte en chlorure de sodium (NaCl) à des doses de 1 à 2% (**Eck et Gillis, 1997**). Le salage peut s'effectuer selon deux techniques (**Simal et al., 2001**):

- salage à sec : poudrage superficiel, frottage ou l'incorporation dans la masse du caillé (le cheddar).
- salage en saumure par immersion dans une solution saturée en NaCl.

Cette opération joue un rôle multiple :

- ✓ Il complète l'égouttage du fromage en favorisant le drainage du lactosérum ;
- ✓ Il apporte le goût caractéristique du fromage en augmentant le potentiel organoleptique du fromage.
- ✓ Il agit sur l'activité de l'eau qui influence le développement des microorganismes.
- ✓ Il collabore à la formation de la croûte ;
- ✓ Il dirige et freinte les développements microbiens et les actions enzymatiques au cours de l'affinage (**Eck et Gillis, 1997**).

#### 4.2.5. L'affinage

L'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants protéiques et lipidique du caillé ainsi que la fermentation du lactose et la production d'arôme (Mietton et al., 1994; Eck et Gillis, 1997; Jeantet, 2006), la pâte est ainsi modifiée dans son aspect, sa texture et sa consistance, sa saveur caractéristique selon le type de fromage (Vignola, 2002).

C'est un processus biochimique complexe pour plusieurs raisons:

- D'une part, la matrice issue de la coagulation et de l'égouttage du lait présente une très grande hétérogénéité physicochimique ;
- D'autre part, les enzymes intervenant dans cette étape peuvent avoir différentes origines, il peut s'agir d'enzymes endogènes du lait (plasmide, lipase...), ou ajoutées au lait au cours de fabrication ou produites au cours de l'affinage (Mahaut et al., 2003).

### 4.3. Étapes de fabrication du fromage frais

#### A. Traitement thermique

A pour but :

- dénaturer une partie de protéines sériques natives du lait afin d'exploiter leur caractère fortement hydrophile et d'améliorer le taux de récupération des protéines dans le fromage.
- Améliorer la qualité technologique des produits finis par la destruction des germes hétéro fermentaires indésirables ainsi que la qualité hygiénique par élimination des pathogènes.

Le traitement est réalisé à des températures élevées (82 à 88°C) avec un temps de chambrage long (1 à 5 min).

#### B. Coagulation

Est obtenue en induisant une forte acidification lactique grâce à l'emploi de bactéries lactiques dont on favorise la prolifération en ajustant la température à l'optimum de développement ( 18 à 28°C pour les souches utilisées ) et en prolongeant les temps d'incubation.

A la fin de la coagulation, la croissance des bactéries est en fin de phase exponentielle, la teneur en acide accumulé est importante et permet d'atteindre le pH isoélectrique de la caséine, cette acidification conduit à la déminéralisation et à la destruction requise des micelles.

Dans le même but, le rôle de l'enzyme coagulante est limité en raison de la faible concentration utilisée (1 à 5 mL/100 l de lait) et de la température peu favorable à son activité.

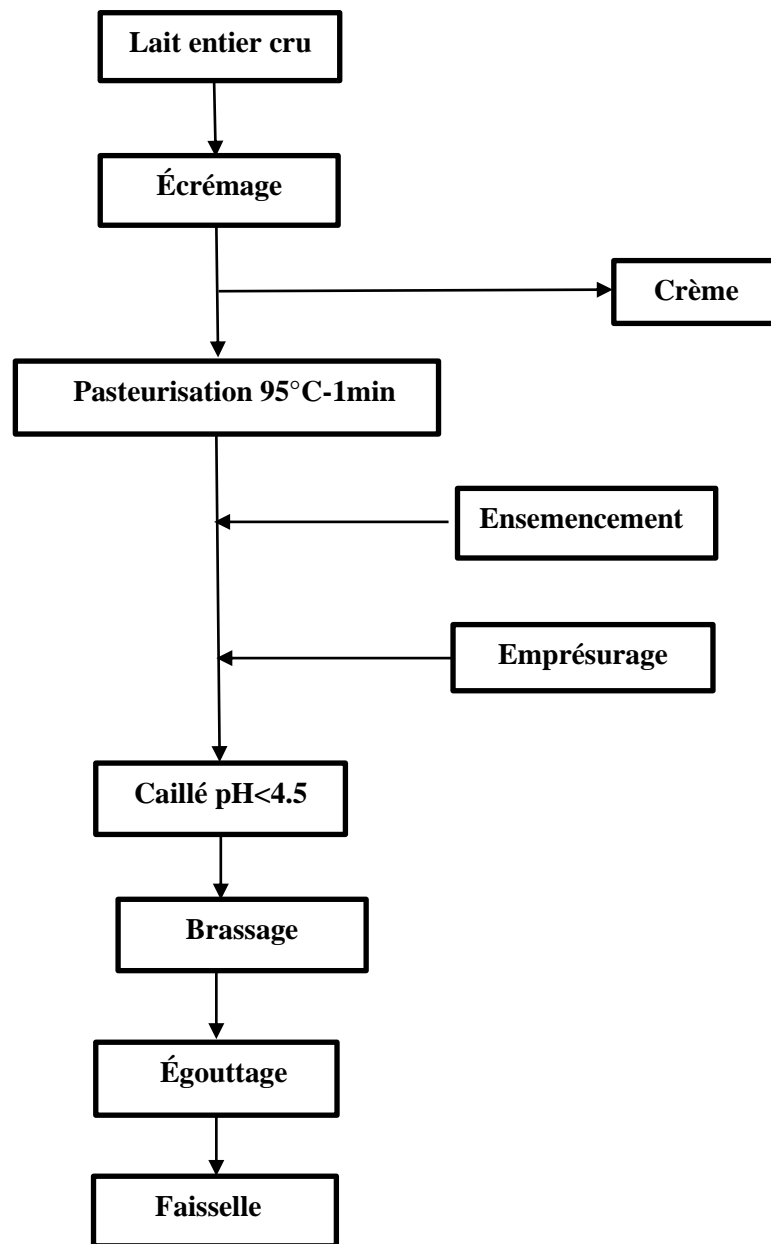
### **C. L'égouttage**

Favorise un contact prolongé entre l'acide lactique et les micelles de caséine, conduisant à l'obtention d'une pâte humide et sans cohésion.

Il existe cependant plusieurs variantes au niveau des méthodes d'égouttages qui permettent de différencier plusieurs procédés distincts :

- Fromage frais égouttés en moules et en toiles textiles;
- Fromage frais égouttés en cuve;
- Fromage frais égouttés par centrifugation.

- Diagramme général de fabrication du fromage frais



**Figure 10:** Diagramme général de fabrication de fromage à pâte fraîche (Jeantet et al., 2007).

#### 4.4. Classification officielle du fromage

La diversité des modes de fabrication des fromages et la variété des produits obtenus, ont conduit les spécialistes à des classifications usuelles. La classification la plus explicite est celle de **Pernodet (1984)**. Les fromages sont classés en fonction de la méthode de caillage (lactique ou présure), du mode d'égouttage et du type d'affinage appliqué :

#### 4.4.1. Fromages frais à pâte fraîche

Ce sont des fromages très humides (car peu égouttés), ils sont consommés sans être affinés, additionnés habituellement de sel, d'arômes ou de sucre. Exemple : fromage blanc.

#### 4.4.2. Fromages à pâte molle

C'est le produit d'une caille mixte. Il présente une pâte molle presque fondante due à la protéolyse pendant l'affinage. Cette pâte est revêtue de moisissures blanches de *Penicillium camembertii*. Exemple : le camembert.

#### 4.4.3. Fromages à double présentation

Ces fromages sont une transition entre les fromages frais du point de vue de la technologie et de la composition physico-chimique, et les fromages à pâtes molles (à croûte fleurie ou lavée). Leur croûte est le support de cultures fongiques ou bactériennes. Exemple : le Sait Florentin.

#### 4.4.4. Fromages à pâte persillée

Ce sont des fromages dont la pâte a subi un pressage mécanique, leur lente maturation leur donne une saveur subtile. Exemple : Le Cantal, le Cheddar.

#### 4.4.5. Fromages à pâte pressée

Ce sont des fromages de gros format, ayant subi un traitement thermique notable. Ils sont caractérisés par la présence d'ouvertures conséquentes au développement de bactéries propioniques. Exemple : l'Emmental, le Gruyere **Pernodet. (1984)**



# **Chapitre 2**

## **Matériel et méthodes**

## 1. Matières premières

### 1.1. Préparation des proventricules de poulet

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  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. Le poids unitaire des proventricules varie entre 5,3 g à 12,7 g avec une moyenne de 7,7 g. (Adoui, 2007)

### 1.2. Préparation de la caillette (caillette ovine)

Les caillettes utilisées ont été récupérées de l'abattoir de Tizi-Ouzou pour extraire la pepsine ovine est constituée des caillettes d'ovines adultes à l'état frais. Ces dernières sont ensuite lavées à l'eau de robinet puis dégraissées, découpées, broyées à l'aide d'un mixeur, conditionnées dans des boîtes en plastique, puis congelées à  $-18^{\circ}\text{C}$  pendant 24 à 48 h

La décongélation se fait d'une manière progressive pour éviter les chocs thermiques à des températures ambiantes. (Agrouche et Sehaki, 2016)



**Figure 11:** Photo d'une caillette ovine (Agrouche Kahina et Sehaki Kania)

### 1.3. Le lait ( substrat de Berridge )

Le lait utilisé est un lait écrémé en poudre, de qualité moyen chauffage (Solarec S.A. ; Belgique). Cette poudre est importée par l'ONIL-Algérie (Office National Interprofessionnel du Lait).

Il est reconstitué par dissolution de 12g de poudre de lait écrémé dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M. Il est appelé substrat standard de Berridge (Berridge, 1955. Libouga D.G, 2008 ; Benyahia-Krid et al., 2010). L'azide de sodium  $\text{NaN}_3$  ajouté (0,04% p/v) se forme de poudre pour éviter le développement des microorganismes. Le substrat standard de Berridge est conservé à 4°C pendant 12 h dans l'obscurité pour de permettre l'équilibre physico-chimique.

La poudre du lait utilisée provient du même lot et conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

### 1.4. La présure

La présure utilisée est une présure commerciale présentée sous forme de poudre (Rhodia food, Marshall TM, France) de force 1/100.000 à 520 mg de chymosine /1 g de présure. La poudre de présure est conservée à 4°C. A partir de celle-ci, nous avons préparé une solution mère par reconstitution à 1 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée. Cette solution est conservée à 4°C durant 3 jours maximum. Lors de chaque utilisation nous avons procédé à des dilutions dans de l'eau distillée à partir de la solution mère d'une façon à avoir un temps de floculation à 30°C compris entre 12 et 15 min. (c'est le temps de coagulation appliquée dans les fromageries)



## I. LA PEPSINE DE POULET

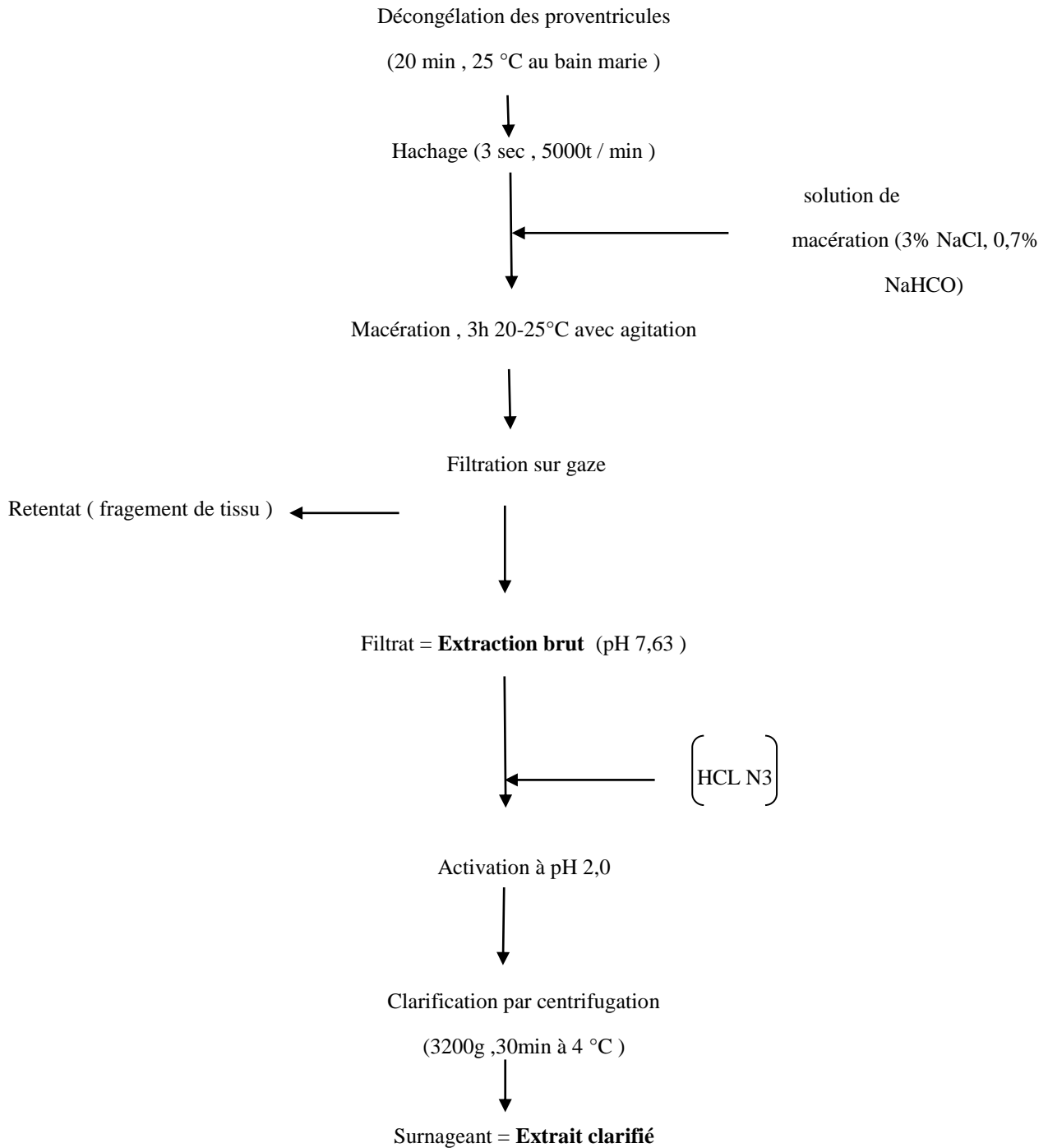
### 2. Extraction de la pepsine de poulet

#### 2.1. 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 12.

Une solution de macération à 30g/l de NaCl et 7g/l de NaHCO<sub>3</sub> 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, la floculation du mucilage; ce qui facilite par la suite, la clarification



**Figure 12:** 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. Etude des propriétés coagulantes de l'extrait brute (pepsine de poulet)

#### 3.1. 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 (**Berridje, 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 (**Berridje, 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:

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

Où

$$2400 = 40\text{min} \times 60\text{sec}$$

**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**).

### 3.2. Etude de la protéolyse des caséines

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, lorsqu'une 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.

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**).

#### **4. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut**

##### **4.1. 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 réalisé 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.

##### **4.2. 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**).

### 4.3. Etude de l'effet de la concentration en enzyme

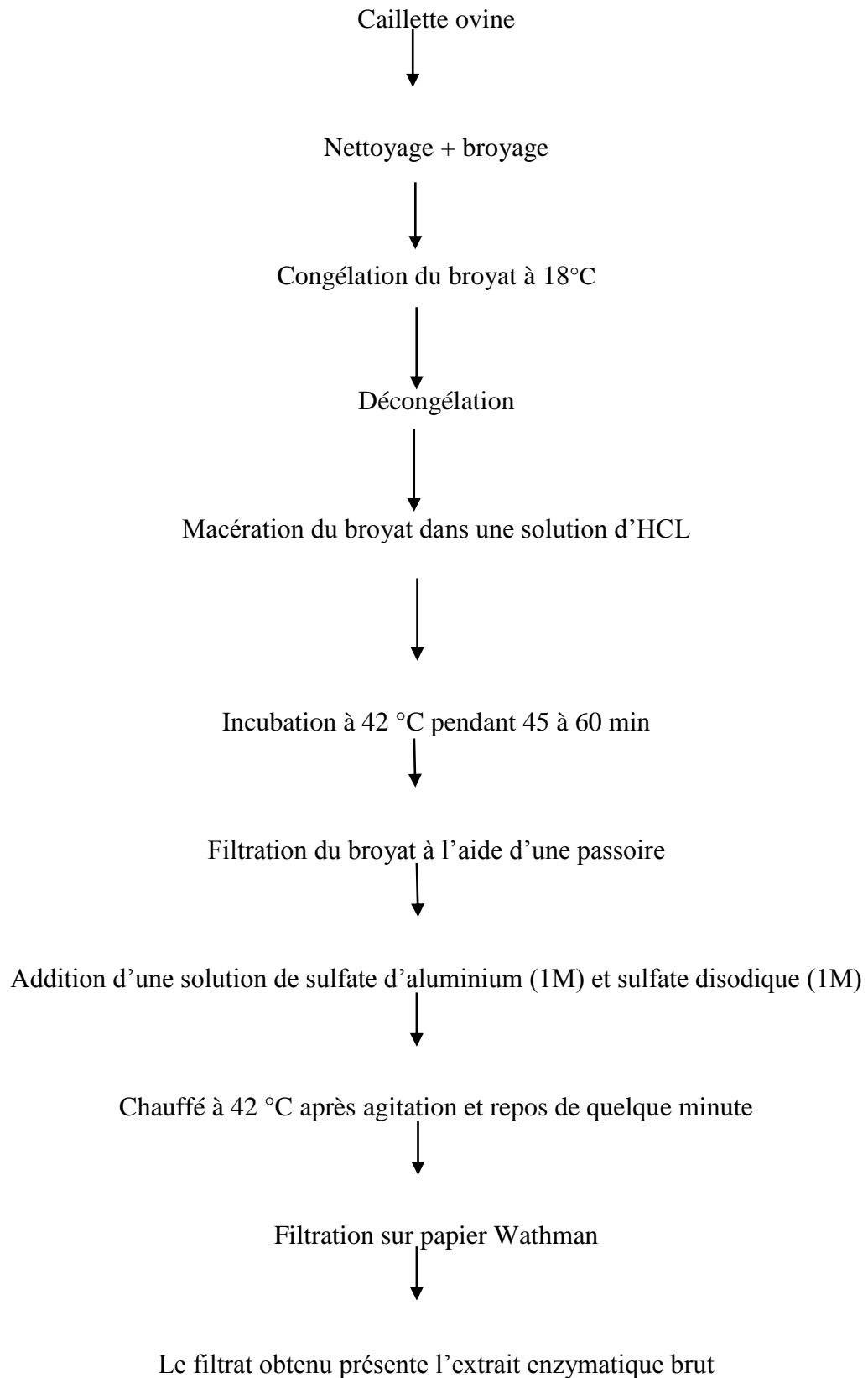
La variation du temps de floculation en fonction de la concentration en enzyme est déterminée en ajoutant au lait reconstitué des quantités d'extraits à une concentration finale variant entre 4,0 et 0,010 mg de pepsine par millilitre de lait. Le temps de floculation correspondant à chaque concentration en enzyme est noté.

## II. LA PEPSINE OVINE

### 5. Extraction de la pepsine de l'ovins et appréciation du diagramme propose

#### 5.1. Procédé d'extraction

L'extraction s'effectue selon la méthode de **Valles et Furet (1977)**.Après décongélation, on mettons le broyat des caillettes dans un bécher en verre pour prendre son poids ,en suite on le soumet à une macération dans une solution de HCL 0,2 M, en respectant le rapport (P /V), (poids des caillettes X 1,25) ml d'une solution d'HCL 0,2M rajoutée sur les caillettes, puis on procède à la pesée, en suite on agite un peu avec une spatule propre, le mélange est porté à 15 40°C dans un bain marie et maintenu pendant 45 à 60 min, en agitant de temps en temps. À la fin de l'incubation les résidus des caillettes sont séparés à l'aide d'une passoire. A la macération brute obtenue on ajoute 1% (V/V) en volume d'une solution de sulfate d'aluminium (1M) et 5%(V/V) d'une solution de sulfate disodique (1M), chauffée à 42°C après agitation et repos de quelques minutes, le mélange est filtré sur papier wathman, le filtrat ainsi obtenu est pesé en (g) : c'est l'extrait enzymatique brute (EEB)



**Figure 13:** les principales étapes d'extraction de la pepsine ovine (Valles et Furet ,1977)



**Figure 14:** Extrait enzymatique brut ovine (Agrouche k., 2016)

### 5.2. Concentration de l'extrait clarifié

Après filtration, on prend un poids donné de macération clarifiée au quel on rajoute deux fois son poids d'une solution saturée de NaCl qui contient 1% V/V d'HCl concentré  $d=1,19$ .

Le mélange est agité et laissé au repos pendant 1h, on procède à une centrifugation à 2100T/min pendant 20min, afin de récupérer le culot et rejeter le surnageant, on note ensuite le poids du précipité humide, et on lui rajoute une quantité déterminée d'eau distillé 10% P/V.

Le pH est ajusté à 5,5 par une solution de phosphate disodique 1M, la conservation est réalisée à 4°C après l'addition de quelques grammes de thymol.



**Figure 15:** l'extrait enzymatique concentré



## 6. Etude de l'extrait enzymatique brute (caillette d'ovine)

### 6.1. Mesure de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut

L'activité coagulante ou la force coagulante de l'extrait enzymatique brut (EEB) est déterminée selon la méthode de soxhlet décrite par Tsoulet (1979). Cette méthode permet d'exprimer l'activité de l'extrait enzymatique en force coagulante (unité soxhlet : US). Cette force coagulante définit le volume du lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique en 40 minutes, à 35°C.

L'évaluation de cette mesure est fixée dans les conditions standards suivantes :

- Volume de la solution enzymatique 1ml.
- Volume du lait à coaguler (substrat de Berridge) 10ml.
- Température du lait 35°C.
- pH de lait 6,4. Cette force est calculée par la formule suivante :

$$\text{Force} = \frac{2400 \times V}{T_c \times V}$$

Avec :

- F : force coagulante de l'extrait enzymatique ;
- V : volume du substrat de Berridge ajuster à pH 6,4 et porté à 35°C ;
- $v$  : volume de la solution enzymatique;
- $TC$  : temps de coagulation en seconde.

#### 6.1.1 .Préparation de substrat de Berridge (Annexe n°1)

### 6.2. Mesure du temps de coagulation

Le temps de coagulation est mesuré par la méthode de Berridge rapporté par **collin et al (1977)**, dont le principe consiste à ajouter 1ml de l'extrait enzymatique à 10ml du substrat de Berridge incubé à 35°C.

### Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique des extraits enzymatiques est déterminée selon la méthode de **Green et Stackpoole (1975)**, (Annexe n°3) L'objectif de cette méthode est d'évaluer le taux de dégradation des caséines pendant la réaction primaire, de ce fait, on mesure la concentration en produits d'hydrolyse de la caséine exprimé en concentration de tyrosine soluble dans l'acide

trichloracétique (TCA à 12%), une fois la réaction est arrêtée par l'ajout de TCA, on procède à une centrifugation qui permet de séparer le précipité de caséine et le produit d'hydrolyse. Le dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode de **Lowry et al. (1951)**.

### 6.3. Mesure de rendement de l'extraction (Rt)

D'après **Valles et Furet (1981)**, l'estimation de la quantité d'enzyme récupérée à partir d'un poids donné de matière première mise en œuvre est exprimée par le rendement d'extraction (Rt). Ce dernier est déterminé en unité d'activité coagulante pour 1g de caillette.

$$Rt = \frac{Ac \times P_{\text{extrait}}}{P_{\text{extrait}}}$$

Avec :

- **P<sub>extrait</sub>** : poids de l'extrait enzymatique;
- **P<sub>caillette</sub>** : poids de caillette;
- **Ac** : Activité coagulante.

## 7. Caractérisation de l'extrait enzymatique

La caractérisation de l'extrait enzymatique se fait par la détermination des conditions optimales de l'activité coagulante, cette dernière qui peut être modifiée par plusieurs facteurs en particulier le pH, la concentration en CaCl<sub>2</sub>, et la température.

L'extrait enzymatique clarifié subit une dilution de façon à obtenir un temps de coagulation voisin de 12min.

### 7.1. Influence de la température

La température optimale de l'activité coagulante de notre enzyme est déterminée en observant le temps de coagulation le plus court du lait, porté à des températures allant de 25 à 65°C avec un intervalle de 5°C.

### 7.2. Influence de pH

Le pH optimum d'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été déterminé en mesurant le temps de coagulation tout en faisant varier le pH du lait de 5,2 à 7 avec un intervalle de 0,2.

### 7.3. Influence de CaCl<sub>2</sub>

La concentration optimale en CaCl<sub>2</sub> du lait est déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait additionné des quantités de CaCl<sub>2</sub> variant de 0,02 à 0,4M/L avec un intervalle de 0,02.

**7.4. Influence de la concentration en enzyme**

L'activité relative correspond au temps de coagulation le plus court, elle est mesurée en faisant varier la concentration en protéines de l'extrait enzymatique par des dilutions de 0,005 à 0,1.

A decorative border in a dark red color, consisting of two parallel lines. The corners of the border are rounded and feature a slight inward curve, creating a frame for the text.

# **Chapitre 3**

## **Résultats et discussions**

## 1. Extraction de la pepsine des extraits bruts (ovins, poulet)

### 1.1. 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 10 donne les caractéristiques des extraits bruts et clarifiés obtenus à partir de 100 g de proventricules.

Le rendement d'extraction exprimé en unité d'activité coagulante par 100g de proventricules est égale à 4524 U.A.C. et de  $27,106 \times 105$  UPHB 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 (**Tableau10**).

**Tableau 10:** 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
Proteine (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

L'estimation de la quantité d'enzyme obtenue à partir de la caillette d'ovins après différentes étapes d'extraction est exprimée par le rendement d'extraction (Rt), la quantité totale de matière utile est d'environ 141% de la masse totale initiale pour l'enzyme clarifié et d'environ 29% uniquement pour l'enzyme concentré.

#### Calcul du rendement :

$Rt = Ac \times P \text{ extrait} / P \text{ caillette}$

$Rt = 2398.79$

**Tableau 11:** Les volumes de l'EEB et l'EEC récupéré après les opérations d'extraction

		Volume de l'EE récupéré(ml)	Poids de l'EEB récupéré (g)	Volume de l'EE récupéré(ml)	Poids de l'EEB récupéré (g)
Caillettes	700,7	990,2	980,49	-	-
Volume de l'EEB utilisé pour l'EEC (ml)	150	-	-	44,4	44

### 1.2. Détermination de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut des caillettes ovines est de 1 /1714. Cette valeur est faible, comparativement à la pepsine de poulet 1/2579 et la présure commerciale de référence, dont la force est de 1/10 000, et supérieure à celle trouvée par **Hamzioui et Bariz (2008)**, qui est de 1/1224, ainsi que celle obtenue par **Outaleb (2006) et Benaicha et Sahi (2009)**, qui est de 1/1200. **Belhamich (2005)** au cours d'une étude réalisée sur l'extraction la purification et la caractérisation de la coagulase de *Mucor Pusillus* a obtenu une force de coagulation de 1/1200.

Les travaux réalisés par **Salmani (2003)**, montrent que l'activité coagulante et le rendement d'extraction varient relativement, de manière proportionnelle avec la quantité des caillettes mise en œuvre. En effet, une augmentation du poids des caillettes entraîne une augmentation de l'activité coagulante, et une diminution du rendement d'extraction. Cependant, selon le même auteur, au-delà de 80 g de caillette mise en œuvre, la variation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction est relativement faible.

À partir de 100g de proventricules nous avons obtenu un extrait clarifié de pepsine de poulet de force 2579 (Tableau 10). 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**).

L'extrait clarifié de pepsine obtenu selon le protocole de **Bohak, (1970)** est une solution de couleur jaunâtre. Ce résultat est comparable à celui rapporté par **Siar, (2014)**.

Il a la même couleur que celle d'une présure extraite par macération à partir des caillettes de veau (FAO, 1988), le rapport indiqué pour l'extraction de la présure est de 80 g de caillettes pour 1000 à 1600 ml de la solution de macération (Veisseyre, 1979 et Wangoh *et al.*, 1993).

Le protocole appliqué recommande 100g de proventricules de poulet pour 300 ml de la solution de macération. La teneur en protéines de l'extrait clarifié de pepsine de poulet obtenu est de 8,77 mg/ml. Ce résultat est inférieur à celui obtenu par Siar, (2014) qui est de 20,10 mg/ml et largement inférieur à celui obtenu par Nouani *et al.*, (2011) ayant une valeur de 147,3 mg/ml.

L'extrait clarifié de la pepsine de poulet a une activité coagulante de 15,08 U.P. Cette activité est supérieure aux activités obtenues par NOUANI *et al.*, (2011) évalué à 13,33 U.P., par Boughellout, (2007) estimé à 2,42 U.P, et Paez de leon *et al.*, (1995) qui ont obtenu 5,52 U.P. et inférieur à activité obtenue par Siar, (2014) qui est de 18,61 U.P.

En termes de force coagulante l'extrait de la pepsine que nous avons obtenu a une force de 1/2579. Ce résultat est inférieur à celui obtenu par Nouani *et al.*, (2011) évalué à 1/3200 et par Siar, (2014) estimé à 1/2579.

Par comparaison entre les deux extraits obtenus dans notre étude, nous remarquons que l'extrait des proventricules de poulet a une activité coagulante, une force coagulante et une teneur en protéines plus élevée comparé à l'extrait des caillettes d'ovins.

**Tableau 12:** Comparaison d'AC de l'EEB aux AC des AC de références bibliographiques.

Source s'enzyme	Activité coagulante	références
Pro-ventricules du poulet	1/4800	( Ait Amer Meziane.,2008)
Pro-ventricules de dinde	1/452.5	(Temizet al., 2008)
Caillettes de dromadaire	1/51470	(Boudjenah-haroun, 2012)
Caillette de chevreau	1/47.73	(kahlouche, 2018)
Couche de kaolin du poulet	1/60.71	(Hamidi, 2015)
Poisson	1/1200	(Maachou, 2004)

---

Gingembre	1/1411.76	(Yekhou et Mahammed, 2016)
Latex du figuier	1/40000	( Nouani et al., 2009)
Fleurs d'artichaut	1/400	(Nouani et al., 2009)
Mucor pusillus	1/36923.07	(Nouani et al., 2009)
Graines de melon	1/800	(FERNANI , 2003)
Présure liquide	1/10000	(Eck et Gilis, 1997)

---

### 1.3. Activité protéolytique

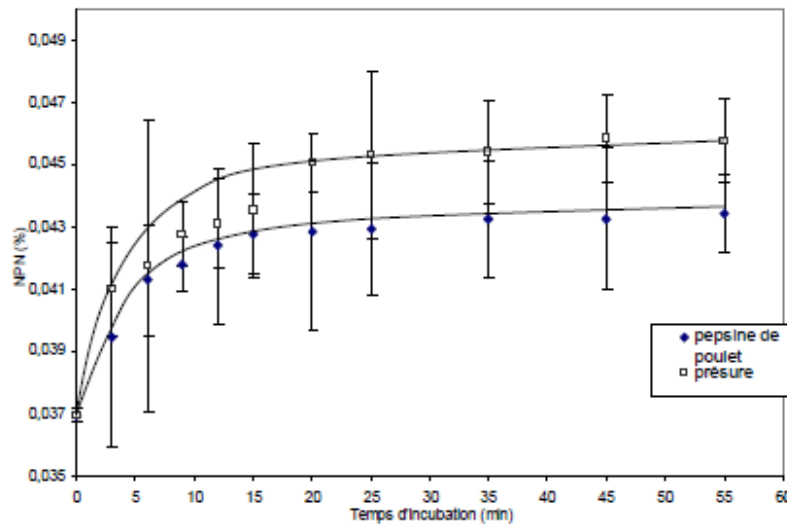
Toutes les enzymes coagulantes qu'elles soient d'origine animale, végétale ou microbienne, sont capables d'hydrolyser la caséine  $\kappa$ , provoquant ainsi la coagulation du lait.

En effet, au cours de la coagulation enzymatique du lait, l'hydrolyse de la liaison Phe105-Met106 de la caséine  $\kappa$  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. Toutefois cette condition est suffisante pour l'utilisation de ces enzymes en industrie fromagère (Alais, 1984), mais pour la production des fromages de qualité, il faut tenir compte de leur grande activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur donne le pouvoir d'hydrolyser les caséines  $\alpha$  et  $\beta$  (Vignola, 2002).

Cependant, pour assurer un bon rendement fromager et pour éviter certains défauts de goût et de texture qui peuvent apparaître au niveau des fromages, ces coagulases doivent présenter une faible protéolyse généralement.

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 min. L'évolution de la teneur en NPN du lait pour la pepsine de poulet et la présure est donnée par la figure 15.





**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). (Agrouche K.,2016)

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.

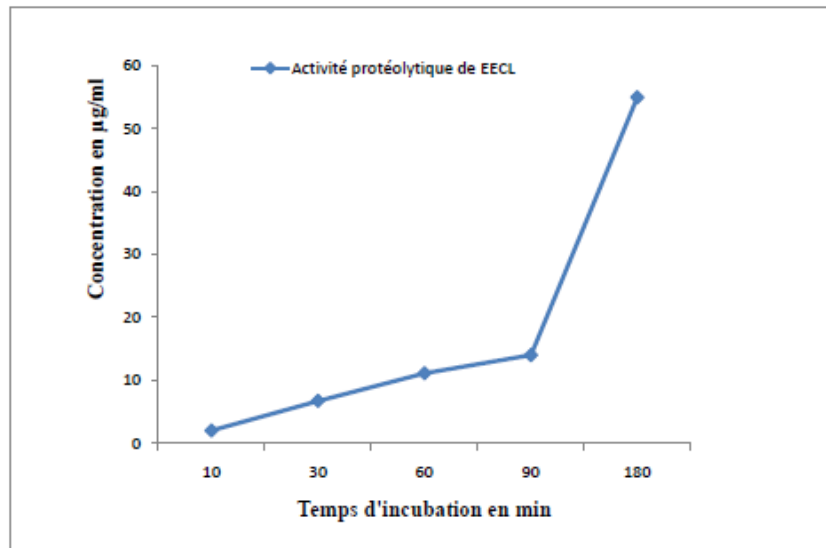
A partir de 20 min d'incubation l'NPN atteint un taux maximal qui tend vers une valeur constante (Figure 16). En effet, jusqu'à 55 min d'incubation, le dosage du NPN a donné des valeurs très rapprochées avec des différences non significatives ( $P = 0,966$ ).

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 ( $P = 0,987$ ).

Le taux de NPN final obtenu pour la pepsine de poulet n'a pas excédé celui obtenu par la présure (figure 15). 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 12). 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).

L'activité protéolytique de L'EEcl de la pepsine ovine a été mesurée selon la méthode de Green et Stackpoole (1975) en utilisant comme substrat la caséine du lait.



**Figure 17:** Evolution de l'activité protéolytique de l'EEcl. (Agrouche K.,2016)

L'évolution de l'activité protéolytique passe par deux phases, la première à lieu dans un intervalle allant de 10 à 90 min, elle se caractérise par une augmentation progressive de l'activité protéolytique due au prolongement du temps de contact entre le substrat et la coagulase.

Pour des temps supérieurs à 90 min l'activité protéolytique marque une augmentation importante, cette différence de l'intensité de l'activité protéolytique est due à l'action spécifique d'hydrolyse de notre EEB envers la caséine  $\kappa$  et l'action non spécifique envers les autres caséines du lait.

**Agoune et Amrane (2007)** ont montré que l'activité protéolytique des coagulases caprines est plus importante par rapport à celle de la présure.

Pour cela, nous avons étudié l'activité protéolytique de pepsine de poulet et pepsine d'ovins par comparaison à la présure animale par la méthode de **Green et Stackpoole (1975)**. Les résultats ont montré que l'activité protéolytique de pepsine d'ovins est très élevée que celle de la pepsine et de la présure.

Concernant la pepsine de poulet nous avons obtenu une activité protéolytique inférieure à celle de la présure. Ce résultat est confirmé par plusieurs auteurs qui ont signalé une activité protéolytique de la pepsine inférieure aux activités de la présure dans le fromage

Cheddar, **Adoui, (2007)** et **Boughellout, (2007)**, ainsi que Gordin et Rosenthal, (1978) . Par contre (Stanley *et al.*, 1980; Findlay *et al.*, 1984) ont signalé des activités protéolytiques de la pepsine +supérieur aux activités de la présure.

## 2. Conditions optimales de coagulation

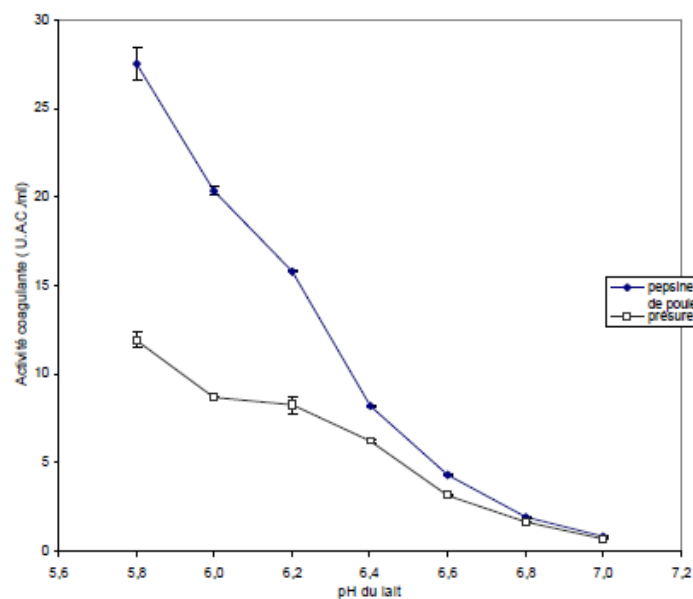
Plusieurs facteurs influent sur la coagulation tels que la concentration en enzymes, le pH du lait, la teneur en calcium, et la température (Jeantet *et al.*, 2008).

Dans le but de déterminer les conditions physico-chimiques optimales pour l'action de pepsine (poulet, ovins), nous avons essayé de voir l'influence de certains paramètres sur leur activité coagulante par comparaison à la présure.

### 2.1. Effet du pH du lait sur l'activité coagulante

L'effet du pH sur l'activité coagulante de pepsine de poulet, de pepsine d'ovins et de la présure a été étudié en ajustant le pH du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 5,2 à 7. La température d'incubation est fixée à 30 °C.

Le pH optimal de coagulation du lait est déterminé par observation du temps de floculation le plus court.



**Figure 18:** Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine de poulet et de la présure. 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 étudié.

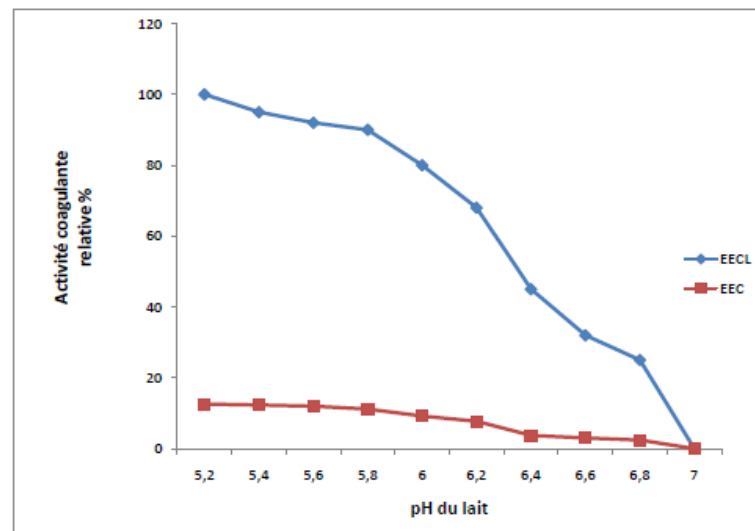
L'évolution de l'activité coagulante de la présure en fonction du pH suit une allure comparable à celle de la pepsine.

À 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).

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 Rosenthal (1978) ; El-Abbassy et Wahba, (1988).



**Figure 19:** Influence du pH sur l'activité coagulante de l'EECL et l'EEC (ovins). (Agrouche K.,2016)

La figure 19 indique clairement la diminution de l'activité coagulante des deux solutions enzymatiques avec l'augmentation de pH jusqu'à une presque inactivation à pH 7 pour l'enzyme clarifié et une inactivation complète de l'extrait concentré à la même valeur de pH. Sachant que le temps de coagulation le plus court a été observé à pH 5,2 pour les deux solutions.

Les résultats présentés par la figure 18 indiquent une diminution de l'activité coagulante des trois préparations enzymatiques au fur et à mesure que le pH du lait augmente.

Ces résultats confirment ceux de Nouani *et al.*, (2009) et Fadyloglu, (2001) qui ont estimé que le pH optimal d'activité pour la ficine est de 5.

**Gheryan et al. (1995)**, ont rapportés que l'acidification du lait favorise la réaction d'agrégation, par la suite la diminution de la stabilité des micelles, liées à la neutralisation des charges négatives et de la libération d'ions de calcium.

**Alias (2003)**, qui rapporte que la pepsine ne coagule plus le lait au-dessus de pH 6,7, contrairement à la chymosine qui reste active vers pH 7,5.

Nos résultats coïncident avec ceux de **Slamani (2003) et Outaleb (2006)**, au cours d'une étude sur la coagulase de pepsine ovine qui ont indiqués que le temps de coagulation est plus court à pH 5,5, de même que **Benaïcha et Sahi (2009)** qui ont indiqués le temps le plus court à pH 5,2 au cours de leur étude sur la même coagulase.

**Gamout et martin (1980)** ont signalé que le PH d'activité de la présure animale est compris entre 5.3 et 6.3, son optimum d'action est à PH 5.8, elle est inactivée à PH 7.5 et dénaturé à PH 8.0. Selon ces mêmes auteurs, La vitesse d'action de la présure et de la pepsine bovine croit en fonction de l'abaissement du pH. Au PH 6.8, l'activité de ces deux enzymes est minimum.

Selon **Ramet (1990)**, l'abaissement du pH de 7.0 à 5.2 provoque la diminution du temps de coagulation. En effet, l'acidification du lait favorise la réaction d'agrégation par suite à la diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges négatives et à la libération d'ions calcium.

**Morsli (1997)** a montré que la cynarase de l'artichaut et de la ficine du latex de figuier présentent une bonne activité coagulante jusqu'à PH 6,6 par contre, **Mouzali (2001)** indique un pH optimum d'action égale à 5,2 pour l'extrait brut de **Cardon et Fernani (2003)** a constaté une activité optimale au ph égale à 5,5 pour la protéase purifiée des graines de melon.

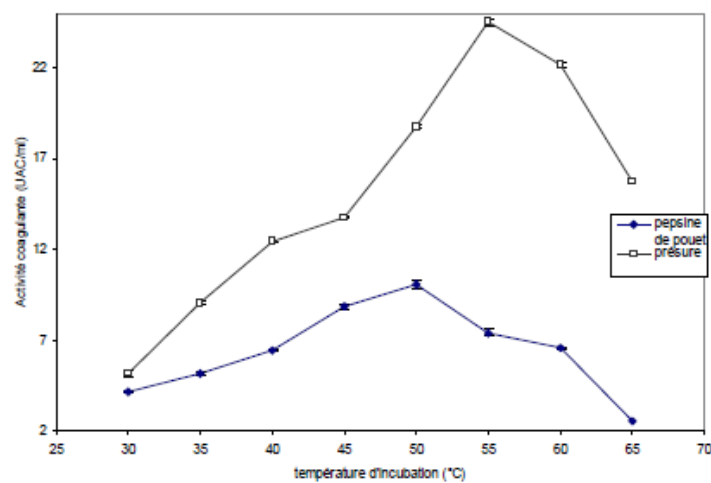
L'effet du pH sur l'activité coagulante est mis à profit en fromagerie. En effet, l'emploi de lait légèrement acidifié, lorsque le type de fromage le permet, est recommandé par les fabricants de préparations de pepsine de poulet afin de réduire la quantité d'enzyme utilisée (**Green et al. ,1984**).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

## 2.2. Effet de la température du lait sur l'activité coagulante

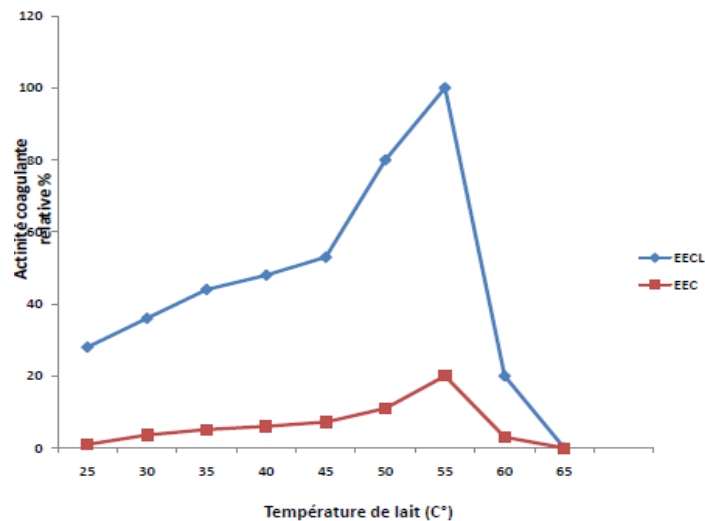
La détermination de la température optimale de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique obtenu ce fait en mesurant le temps de coagulation le plus court du lait, maintenue à différentes température allant de 25 à 70°C avec un intervalle de 5°C et ph =6.4.



**Figure 20:** Activité coagulante de la pepsine de poulet et la présure en fonction de la température du lait à pH 6,4. (**Adoui F.,2007**)

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'à plus de floculation (Figure 19). La présure a montré un maximum d'activité à 50 °C (pH 6,4) (Figure 19). La température optimale pour la coagulation du lait par la présure à pH 6,6 est d'environ 45 °C (**Lucey, 2002**).

L'augmentation de la température du lait entraine 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 entraine 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 21:** Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de pepsine d'ovins et de présure. (Agrouche K.,2016)

Les résultats indiquent que l'activité coagulante des deux solutions augmente progressivement avec la température jusqu'à atteindre un maximum à 55°C.

L'augmentation de l'activité coagulante est due à l'accélération de la réaction enzymatique par hydrolyse de la caséine  $\kappa$ .

L'activité coagulante diminue sensiblement à des températures supérieures à l'optimum enregistré pour les deux coagulases.

D'après les résultats de **Slamani (2003) et Outaleb (2006)**, l'activité optimale d'un extrait enzymatique purifié de la pepsine ovine est de 52°C avec une inactivation complète à 62°C, ce qui confirme nos résultats.

**Agoune et Amrane (2007)**, ont enregistré lors de leur caractérisation de l'extrait coagulant caprin, que l'activité coagulante s'accroît graduellement et elle est maximale à 46°C.

**Morsli (1996)** a mentionné une activité maximale à 40°C pour un extrait coagulant de la pepsine du poulet, il a aussi rapporté que celles des extraits végétale sont nettement supérieures, 80°C pour une protéase obtenue à partir de l'Artichaut et 70°C pour la ficine.

Selon **Garnot et martin (1980)**, la présure présente une activité coagulante à une température voisine de 40°C. **Bengana (2001)** a trouvé que l'optimum d'activité pour la chymosine et la pepsine bovine est à 45°C.

**Haard et al. (1982)** ont signalé que la température optimale de coagulation pour la pepsine de poisson est de 30°C, celle pour la pepsine bovine et porcine se situe entre 30-50°C.

**Morsli (1997)** indique un optimum d'activité à 40°C pour la pepsine purifiée de poulet .la pepsine purifiée d'ovine présente selon **Slamani (2004)** une température optimale d'action voisine de 52°C .**Maachou (2004)** a noté un optimum d'action à 55°C pour la pepsine purifiée de limon et cette dernière serait inactive à 60°C .

Les coagulases d'origine végétale et microbienne présentent en général une température optimale d'activité plus élevée par comparaison aux protéases d'origine animale.En effet,**Morsli (1997)** a noté que l'optimum d'action pour la cynarase de l'artichaut est à 60°C et celui de la ficine du latex de figuier est à 80°C. L'optimum d'activité coagulante pour l'extrait brut de fleurs de cardon est obtenu, selon **Mouzali (2001)**, à une température optimale de coagulation de la protéase purifiée des graines de melon est de 70°C.

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.

### **2.3. Effet de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante**

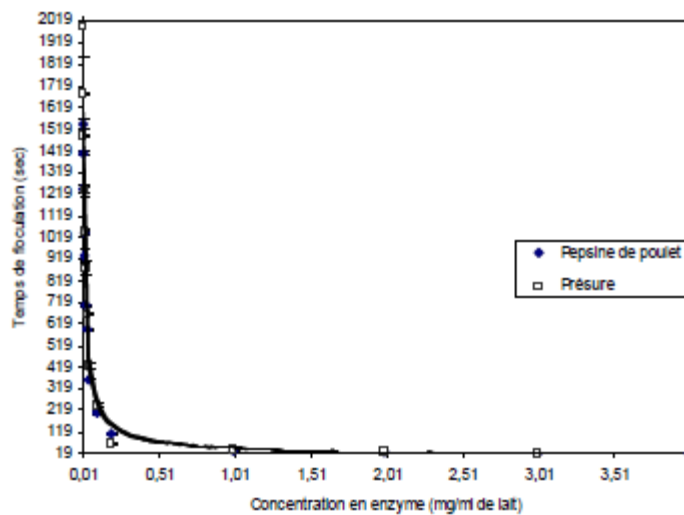
L'influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante est déterminée en faisant varier la concentration en enzyme par des dilutions du 0.002 à 0.1.

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 21 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. 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.



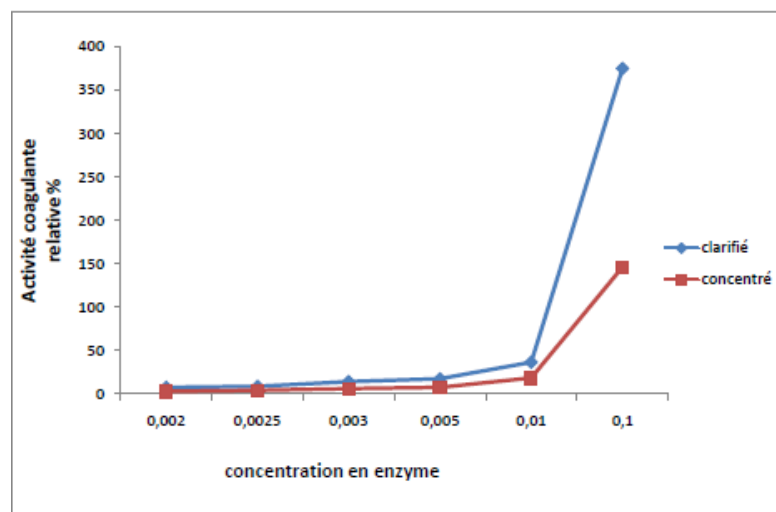
**Figure 22:** Effet de la concentration en pepsine de poulet et en présure sur le temps de floculation du lait (à pH 6,4 et 30°C). (Adoui F., 2007)

Les résultats rapportés par la figure 22 indiquent que l'activité coagulante des deux formes de coagulase (enzyme clarifiée et concentrée d'ovins) augmente avec la concentration en enzyme et le temps de coagulation est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme utilisé. Ce qui est en accord avec la théorie de **Payens (1979)**, qui stipule que la coagulation du lait dépend de la vitesse de protéolyse de la caséine  $\kappa$ , qui est en fonction de la concentration en enzyme (**Eck, 1987**).

Dans tout l'intervalle de concentration, on remarque que l'activité coagulante de l'extrait enzymatique concentré est plus faible comparativement à l'extrait enzymatique clarifié.

Cependant, dans l'intervalle (0.002 à 0.005), la figure 22 montre que l'activité coagulante est relativement faible, au-delà de cette valeur, elle augmente de manière remarquable. Ce résultat coïncide avec celui d'**Ait Amer Meziane (2008)** qui a observé cette proportionnalité entre

l'activité coagulante et la concentration en extrait enzymatique du poulet, du poisson et de la présure, sans pallier de saturation dans l'intervalle de concentration utilisée.



**Figure 23:** Influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante de pepsine d'ovins et de présure. (Agrouche K., 2016)

Les travaux de **Garnot et Martin (1979)** ; **Sbadio et al., (1997)**, ont montré que la vitesse d'action enzymatique (chymosine, pepsine) croît linéairement en fonction de sa concentration, lorsque celle-ci est faible, ce qui correspond aux doses employées en fromagerie, pour des concentrations plus élevées en enzyme, la vitesse d'action enzymatique tend vers une limite.

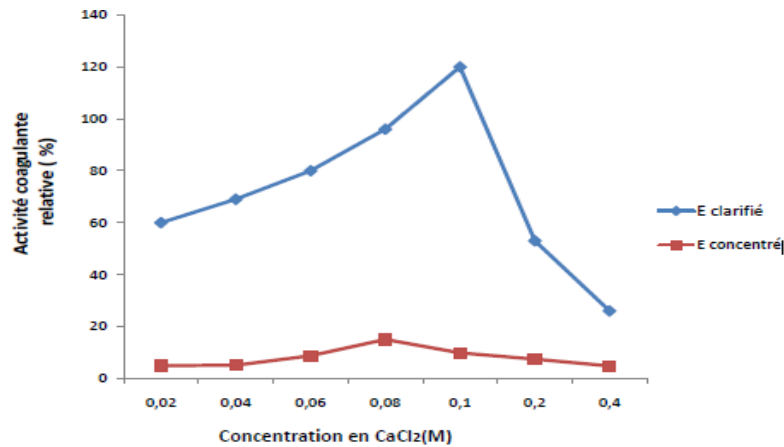
**Morsli (1996)**, nota un comportement différents des enzymes d'origine animale et végétale, mais manipulant des faibles doses en extrait enzymatique, ainsi, il ne parvient pas à remarquer un pallier pour ce qui concerne la présure.

**Belhamiche (2005)**, nota un accroissement de l'activité coagulante en fonction de la concentration en extrait enzymatique fongique, cependant dans l'intervalle de concentration allant de 0.25 à 0.3 mg/ml, elle nota un pallier de saturation en enzyme ce qui n'est pas le cas pour la présure en raison des faibles concentrations utilisées.

#### 2.4. Influence de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante

Pour corriger les variations des teneurs en calcium du lait au cours du stade de lactation ou les modifications de l'équilibre du calcium provoqué par les traitements thermiques, les industries ajoutent du CaCl<sub>2</sub> à une dose de 80 à 200 mg.l<sup>-1</sup> améliorant ainsi l'aptitude à la coagulation du lait (**Jeantet et al. 2008**).

La figure 24 représente l'influence de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante de l'EE clarifié et concentré



**Figure 24:** Influence de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante de l'EE

D'après la figure 24, on a constaté que l'activité coagulante des extraits enzymatiques concentrés et clarifiés de la pepsine ovine augmente avec l'addition du CaCl<sub>2</sub> jusqu'à une concentration de 0.08 mol et 0.1mol, respectivement, au-delà, une baisse d'activité est enregistrée.

**Nouani et al., (2009)** ont trouvé que l'optimum d'activité pour la préparation coagulante purifiée de poulet est de **0,02 M** tandis que pour l'extrait enzymatique de limon et de la présure animale, l'optimum d'activité est marqué à **0,04 M**. Au delà de ces deux optimums, l'activité coagulante baisse, ces résultats confirme ceux obtenus dans nos essais.

Selon **Temiz et al., (2007)**, l'activité coagulante de la pepsine de dinde est optimale à une concentration en CaCl<sub>2</sub> de **0.035M**. Ce résultat corrobore celui obtenu par l'EEB de dinde ce qui laisse suggérer la présence de pepsine dans notre extrait enzymatique.

Le rôle du calcium ionique qui est très influent sur le temps de coagulation et la fermeté du gel pourrait s'expliquer par le masquage de groupements chargés et l'accroissement de l'hydrophobicité qui intervient dans le phénomène de réticulation (**Eck et Gillis, 1997**).

Selon **Nôel et al., (1989)**, l'addition de calcium à pH constant n'a pas d'influence sur la réaction d'hydrolyse enzymatique mais elle accélère la réaction d'agrégation des micelles hydrolysée, ainsi il est bien établi que la phase de gélification est purement chimique, et elle dépend étroitement de la teneur en calcium.

En revanche, l'excès de calcium provoque une inhibition de la coagulation, du fait qu'il bloque certains sites réactifs indisponibles pour la réticulation des molécules de para caséine, induisant ainsi une précipitation partielle des caséines du lait (**Baumy et Brulé, 1986 ; Mc**

**Mahon et al., 1984**).



# **Conclusion et perspectives**

### Conclusion et perspectives

Notre travail a porté sur une étude comparative relative à l'extraction de la pepsine à partir de proventricules de poulet, et l'extraction de la pepsine à partir de caillettes de l'ovines. L'étude de ces propriétés coagulantes et protéolytique.

Ce travail visait sur la collecte et la synthèse des travaux bibliographiques en se basant sur la caractérisation des deux agents coagulants proposés et tester la possibilité de leur utilisation dans la fabrication de fromages. Notre démarche a comporté sur deux aspects. Premièrement, Les scientifiques ont basé sur la récupération des matières premières renferment les systèmes enzymatiques recherchés, l'extraction des enzymes (pepsine de poulet et des ovines). Deuxièmement sur la caractérisation des extraits de point de vue activité et force coagulante et conditions optimales d'activité (température, ph, concentration en enzyme). En outre, l'étude de l'activité protéolytique.

L'étude comparative de l'activité coagulante de la présure industrielle et de deux de ses succédanés extraits successivement de proventricules de poulet et de caillettes de l'ovins a montré des vitesses de coagulation sont différentes lorsque, la température et le pH varient.

Nos analyses bibliographiques des différents résultats qui ont été réalisé, par plusieurs études scientifiques ont confirmé que les deux pepsines d'origine animale, coagulant le lait, ont été obtenues par macération de pro ventricules de poulet et de la caillette de l'ovin. Ces deux enzymes se caractérisent par une force coagulante de l'ordre de  $1/2579$  pour l'extrait enzymatique brut de poulet et de  $1/1714$ . Pour celui des caillettes ovines donc la pepsine de poulet présente une meilleure activité coagulante que celui de les ovines. Ces deux enzymes sont relativement stables dans l'intervalle de  $30^{\circ}\text{C}$  à  $40^{\circ}\text{C}$  après 30 min d'incubation. Ces propriétés sont relativement similaires à celles de la présure.

Pour conclure, on peut dire que les résultats obtenus semblent intéressants d'autant qu'ils montrent la possibilité d'obtention des extraits enzymatiques capables de remplacer la présure dans l'industrie fromagère .Cependant, elle nécessite la connaissance et la bonne maitrise principalement de la concentration en enzyme, du pH et de la température liés à son action coagulante et protéolytique sur les caséines. Cet ensemble de connaissance permettrait de savoir à quel niveau faut-il intervenir pour pouvoir diminuer de son activité protéolytique signifiante et considérable. Ces extraits sont obtenus à partir de matières assez disponibles et inexploitable.



*Références*

*Bibliographiques*

### A

**Alais, C. (1974)** Science du lait ; principes des techniques laitières, 3ème ed., Publicité Sep, 807p

**Alais, C., (1984).** Science du lait, Principes des technologies laitières.

**Alais, C., Linden, G., et Miclo, L. (2003).** Biochimie alimentaire. 5ème édition de l'abrégé. Dunod, Paris.

**Alimentarius, C. C. (1978).** Codex Stan 283-1978: general standard for cheese, rev. 1-1999, amd. 3-2008. Codex Alimentarius—International Food Standards, Rome.

**Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P., et Simpson, R. (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. Science et technologie du lait, 1-74

**Andren A. (2002).** Rennets and coagulants pp281-286 in Encyclopedia of Dairy Science. Roginski H.,Fuquay J. Fox P. Elsevier

**Anifantakis, E., et Green, M.L. (1980)** Preparation and properties of rennets from lamb's and kid's abomasa. Journal of Dairy Research. 47: 221-230

**Apfelbaum, M., Perlemuter, L., et Nillus, P. (1981).** Dictionnaire pratique de diététique et

**Association française d'organisation (1988). Lambert, J., C.** La transformation laitière au niveau villageois. Etude FAO production et santé animales. 69p

**Association française d'organisation . (2007).**Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine sur : <http://www.fao.org/docrep.T4280F.htm>

### B

**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.

**Beal, C., et Sodini, I. (2003).** Fabrication des yaourts et des laits fermentés. Techniques de l'ingénieur. Bioprocédés (F6315).

**Beka, R. G. (2011).** Une alternative végétale en fromagerie: préparation d'un extrait coagulant à partir des fruits de *Balanites aegyptiaca*: étude biochimique et application technologique. Lille 1

**Bohak, Z. (1969)** Purification and characterisation of chicken pepsinogen and chicken pepsin J. biological chemistry.Vol. 244, N°.17: p.4638-4648.

**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.

**Bonfoh, B., Zinsstag, J., Farah, Z., Simbé, C. F., Alfaroukh, I. O., Aebi, R., Rehberger, B. (2005).** Raw milk composition of Malian Zebu cows (*Bos indicus*) raised under traditional system. Journal of Food Composition and Analysis, 18(1), 29-38.

**Boyaval, P., Corre, C., Dupuis, C., et Roussel, E. (1995).** Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria. Le lait, 75(1), 17-29

**Brisabois A, Lafarge V, Brouillard A, de Buyser ML, Collette C, Garin-Bastuji B et Thorel MF. (1997).** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 16 (1). pp: 452-471.

**Brown, R. J., Ernstrom, C., et Johnson, M. E. (1988).** Milk-clotting enzymes and cheese chemistry. In Fundamentals of dairy chemistry (pp. 609-654): Springer

**Brulé, G., Lenoir, J., et Remeuf, F. (1997).** La micelle de caséine et la coagulation du lait. Le Fromage, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 7-41.

### C

**Cheftel, J.-C., Cuq, J.-L., et Lorient, D. (1985).** Proteines alimentaires; biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimiques

**Chilliard Y et Lamberet G. (1984).** La lipolyse dans le lait : les différents types, mécanismes, facteurs de variations, signification pratique. Le lait 64.pp : 544-578.

**Collin, J.-C. (2015).** Présures et coagulants de substitution: Comment faire le bon choix? : Editions Quae.

**Cuq JL. (2007).** Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du Languedoc. Université de Montpellier. pp: 20-25.

### D

**DalgleIsh, D. G., Brinkhuis, J., et Payens, T. A. (1981).** The coagulation of differently sized casein micelles by rennet. European Journal of Biochemistry, 119(2), 257-261  
de nutrition.

**Delacroix-Buchet, A., Lefier, D., et Nuyts-Petit, V. (1993).** Kappa-casein polymorphisms and milk rennet coagulation ability. Lait, 73(1), 61-61.



**E**

- Eck, 1987.** Le fromage. Paris, Lavoisier, pp. 339-539. (Techniques et documentations).
- Eck, 1987.** Le fromage. Paris, Lavoisier, pp. 339-539. (Techniques et documentations).
- Eck, A., et Gillis, J.-C.** (1997). Le Fromage de la science à l'assurance-qualité
- Emmons, D. B., and Binns, M.** (1990) Cheese yield experiments and proteolysis by milk-clotting enzymes J. Dairy sci. 73: 2028-2043
- Essalhi M.** (2002). Relation entre les systèmes de production bovine et les caractéristiques du lait .Mémoire d'ingénieurs. Institut Agronomique et vétérinaire, Hasan II, Rabat .104p.

**F**

- 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 (chysosin) In: Milk proteins, chemistry and molecular biology. Ed., H.A. Mc Kenzie V. II, Academic press, 217-252.
- Fox, P. F., Law, J., McSweeney, P., et Wallace, J.** (1993). Biochemistry of cheese ripening. In Cheese: Chemistry, physics and microbiology (pp. 389-438): Springer.
- Frédot, E.** (2005). Connaissance des aliments: bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Technique et Documentation. In (pp. 424pp150): Lavoisier

**G**

- Garnot P., et Martin P., 1979.** La présure : Composition détermination de l'activité, son rôle en fromagerie.Technique laitière, vol. 930, n. 3, p. p. 27-30.
- Garnot P.,et ., 1980.-** Présure , composition ,activité et son rôle en fromagerie Technique Laitière , 930(3) : 27-30
- Gelais, et Tirard, C. (2009).** Fromage : Science et technologie du lait transformation du lait. Canada: ED/ISBN. Canada. P 345.
- Gordin, S., et Rosenthal, I.** (1978) Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme Journal of food Protection 41:684-688
- Guiraud J. et Galzy P.** (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires.
- Guiraud JP.**(2003). Microbiologie Alimentaire. Edition Dunod. Paris. pp : 136-139.

**H**

**H., Okumus, E., Aykut, U., Dervisoğlu, M., et Yazici, F.** (2008). Partial purification of pepsin from turkey proventriculus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1851-1855

**Hamrani, L., 2008.** Étude comparative de deux protéases coagulant le lait, extraites de proventricules de poulet (*Gallus gallus*) et d'estomacs de limon (*Seriola* sp.). INA,

**Heuchel V, Chatelin YM, Breau S, Sobolewski F, Blancard N, Baraton YetAyerbe A.** (2003). Lipolyse du lait de vache et qualité organoleptique des produits laitiers. *Renc. Tech. Ruminant* n°10.pp : 223-226.

**Horne David S , A.** (1993). Casein Micelle Structure and Stability. In (pp. 176). Scotland: Formerly Hannah Research Institute.

**Horne, D., et Muir, D.** (1994). Genetic polymorphism of kappa-casein and rennet coagulation time. Effects of serum phase components. *Milchwissenschaft* (Germany).

**J**

**Jay JM.** (2000). Taxonomy, role, and significance of microorganisms in food. Dans *Modern Food Microbiology*, Aspen Publishers, Gaithersburg MD. pp :13.

**Jeantet, R.** (2006). *Science des aliments: biochimie, microbiologie, procédés, produits*: Tec & Doc.

**K**

**Kon, S. K.** (1972). lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. FAO Etudes de nutrition de la FAO fre no. 27.

**Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., et Batish, V.** (2010). Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical reviews in biotechnology*, 30(4), 243-258.

**L**

**Lamontagne Michel Claud P, Champagne J, Reitz A, Sylvain M, Nancy G, Marysel, Julie J et Ismail F.**(2002).*Microbiologie de lait. Science et technologie de lait* École polytechnique de Montréal.

**Lapointe-Vignola, C.** (2002). *Science et technologie du lait: transformation du lait*: Presses inter Polytechnique.

**Leyral G et Vierling É.** (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4e édition Biosciences et techniques.87p

**Libouga, D. G., Jiwoua, C. N., et Kouebou, C. P.** (2001). Etudes du lait de Zebu (*Bos Indicus*) obtenu à Ngaoundéré (Adamaoua, Nord Cameroun. *Journal of the Cameroon Academy of Sciences*, 1(1), 14-21.

**Lovett J.** (1989). *Listeria monocytogenes*. In *Foodborne, bacterial pathogens* (M.P. Doyle, Edit.). Marcel Dekker Inc.,New York, pp: 288-310.

**Lucey, J.** (1995). Effect of heat treatment on the rennet coagulability of milk.

**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.

### M

**Mahaut, M., Jeanet, R., et Brulé, G.** (2003). *Initiation à la technologie fromagère*. [Introduction to cheese making technology]. Tec et Doc, Paris

**Mahon, M., et Brown, R.** (1985). Chymosine, présure, protéases microbiennes et pepsine. Effet du type d'enzyme sur la coagulation du lait. *J. of Dairy Sci*, 68(3), 628-632.

**Marcel, M. e.** (2007). Milk clotting protease : structure, fonction ;Milk (Vol. 35).

**Mietton, B., Desmazeaud, M., De Roissart, H., et Weber, F.** (1994). Transformation du lait en fromage. *Bactéries lactiques*, 2, 55-132.

**Mocquot, G., Alais, C., et Chevalier, R.** (1954). Étude sur les défauts de coagulation du lait par la présure. *Ann. Teehnol. agric*, 1, 1-44.

**Morsli A.,** Recherche sur les activités protéasiques des extraits de *Cynara scolymus* de latex de ficus caria et du pro ventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère .Thèse Mag .sces agro., Inst..Nati Agro EL Harrach, 181p.

**Mouzali.,2001.-** Extraction enzymatique et caractérisation de l'agent coagulant de la fleur de cardon sauvage (*cynara cardunculus* L) Mémoire Mag .Sces agro., Inst .Nati .,Agro., El-Harrach .84p.

### N

**Nájera, A.,** De Renobales, M., et Barron, L. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chem*, 80(3), 345-352.

**Nouani, A., Belhamiche, N., Slamani, R., Belbraouet, S., Fazouane, F., et Bellal, M. (2009).** Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization. *International journal of dairy technology*, 62(1), 112-117.

### O

**Outaleb T., 2006.** Aptitude à la coagulation du lait par la pepsine ovine. *Mém.Ing.Agr.*, Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 54p.

### P

**Park, Y., Juárez, M., Ramos, M., et Haenlein, G. (2007).** Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small ruminant research*, 68(1-2), 88-113.

**Payens, t. A. J. Wiersma, A.K, and Brinkhuits, 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

**Pernodet G. (1984).** Le fromage. Edition: Lavoisier. Paris, France, pp. 219-248

**Pougheon, S., et Goursaud, J. (2001).** Le lait et ses constituants caractéristiques physicochimiques. DEBRY G. *Lait, nutrition et santé*. Paris: Technique et documentation, 52.

### R

**Ramet J.P., 1990 .** -les agents de transformation du lait. In : Eck A .(coord) *Fromage . Ed .TCE .Doc , 2<sup>ème</sup> éd.*, Lavoisier , paris ,pp.101-105.

**Ramet J.P.1997.**Les agents de transformation du lait. In : *Le fromage ; de la science à l'assurance qualité*. Paris, Lavoisier, pp. 165-193. (Tech. Et Doc).

**Ramet, J. (1985).** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture ed.): Organisation des nations unies pour L'Alimentation et L'Agriculture.

**Ramet, J., et Weber, F. (1980).** Contribution à l'étude de l'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le lait*, 60(591-592), 1-13.

**Remana, F. (2013).** Contribution à l'étude microbiologique et physico-chimique de la fabrication de lait fermenté. khemis -Miliana,

**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.

**Roupas, P., et Mead, D. (2001).** Whey proteins and cheese pizza cheese. Dairy industries international, 66(9), 16-18

**Ruettimann, K., et Ladisch, M. (1987).** Casein micelles: structure, properties and enzymatic coagulation. Enzyme and Microbial Technology, 9(10), 578-589.

**S**

**Simal, S., Sánchez, E., Bon, J., Femenia, A., et Rossello, C. (2001).** Water and salt diffusion during cheese ripening: effect of the external and internal resistances to mass transfer. Journal of food Engineering, 48(3), 269-275.

**Singh, H., et Fox, P. (1989).** Heat-induced changes in casein. Bull Int Dairy Fed, 238, 24-30

**Slamani R., 2003.**Optimisation d'une méthode d'extraction de la pepsine ovine. Essai de purification et de caractérisation. Mém.Mag.Agr., Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 43p.

**Sousa, M. J., et Malcata, F. X. (2002).** Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. Le lait, 82(2), 151-170.

**Sousa, M., Ardö, Y., et McSweeney, P. (2001).** Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. International Dairy Journal, 11(4-7), 327-345

**St-Gelais, D., et Tirard-Collet, P. (2002).** Chapitre 6: Fromage. Science et Technologie **du Temiz,**

**T**

**Temiz, H., Okumus, E., Aykut, U., Dervisoğlu, M., et Yazici, F. (2008).** Partial purification of pepsin from turkey proventriculus. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(9), 1851-1855.

**Thomas, C., Romain, J., et Gérard, B. (2008).** Fondements physicochimiques de la technologie laitière: Lavoisier p.144.

**V**

- Vallas, M., Bovenhuis, H., Kaart, T., Pärna, K., Kiiman, H., et Pärna, E.** (2010). Genetic parameters for milk coagulation properties in Estonian Holstein cows. *Journal of dairy science*, 93(8), 3789-3796
- Varnam AH et Sutherland P.** (2001). *Milk and Milk Products: Technology, Chemistry, and Microbiology*. Volume 1 Food products series. An Aspen Publication. New York. pp: 35-37
- Veisseyre, R.** (1975). *Technologie du lait: constitution, recolte, traitement et transformation du lait*
- Veisseyre, R.** (1979) *La technologie du fromage*, 3ème ed., la maison Rustique, Paris, 714
- Vétier, N., Banon, S., Ramet, J.-P., et Hardy, J.** (2000). Hydratation des micelles de caséine et structure fractale des agrégats et des gels de lait. *Le lait*, 80(2), 237-246.
- Vierling, E.** (1999). *Aliments et boissons: filières et produits*: Doin éditeurs.
- Vignola, L. C.** (2002). *Science et technologie du lait : transformation du lait, fondation de technologie* (Tec 8 Doc ed.).

### Y

- Yamamoto, A.** (1975). *Proteolytic enzymes*: Academic Press: New York



*Annexes*

## Annexe 01

### Préparation du substrat de Berridge :

#### I. Le constituant du substrat de berridge.

##### 1.1 Le lait en poudre :

Le lait en poudre utilisé est de type LOW-HEAT obtenue à partir d'un lait écrémé pasteurisé de bonne qualité microbiologique (-5000 germes /ml). C'est une poudre n'ayant subi qu'un chauffage faible qui entraîne un respect de l'état physico-chimique de protéines solubles du sérum, elle est conservée dans des sachets en plastique à +4°C

##### I.1 Solution de Ca Cl<sub>2</sub>

La solution de CaCl<sub>2</sub> de qualité anhydre utilisée à une concentration de 0,01M, elle est préparée à partir d'une solution mère de CaCl<sub>2</sub> 1M. Conserver à 4°C.

#### II Mode opératoire :

Pour préparer 100 ml du substrat de berridge, on dissout 12g de lait en poudre dans 100ml de CaCl<sub>2</sub> à 0,01M. on verse tout d'abord une petite quantité de solution sur la totalité de la poudre humer manuellement avec un agitateur de façon à obtenir un bouillie homogène, le reste de la solution de CaCl<sub>2</sub> est alors ajouté sur cette bouillie, puis agité avec un agitateur magnétique pendant 30mn en évitant une agitation trop violente susceptible de produire une mousse. Puis vitrifié le pH de la solution obtenue est l'ajusté s'il y a lieu à 6.4 par l'ajout d'une solution de HCl ou de NaOH 0.1N. La température du substrat est ramenée à 35°C afin de mesurer le temps de coagulation, qui correspond à l'apparition des premiers flocons sur les parois internes du tube dans les conditions de réaction



## Annexe 02

## Dosage des protéines totales (lowry et al, 1951)

## • Solutions :

- **Solution(A)** : 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ,2g dans 100ml de NaOH (0.1N).

-**Solution(B)** : 0.5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in sodium-potassium tartrate à1% (50mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à0.5%+100mg de tartrate de sodium- potassium à1%) dans 100mg d' H<sub>2</sub>O

-**Solution(C)** : 50ml de (A) +1ml de (B).

(Réactif de lowry) –

-**Solution(D)** : Na OH (0.1N).(4g /1l H<sub>2</sub>O).

-**Solution (E)** : Réactif de folin-ciocalte au dilué1/2l

-**Solution (F)** : B.S.A : 2mg dans 20ml d'H<sub>2</sub>O.

## • Mode opératoire

Ajouter 1ml de l'extrait enzymatique (clarifié et concentré) à 5ml de réactif de lowry, agitation (10min) puis on ajoute 0.5ml de réactif de Folin, en suit on incube le mélange pendant 30min à l'obscurité après une agitation rapide.

## • Courbe d'étalonnage :

Préparation des solutions diluées croissantes : 10, 25, 50,75et 100 mg/ml à partir de la solution mère de B.S.A (200mg/ml).

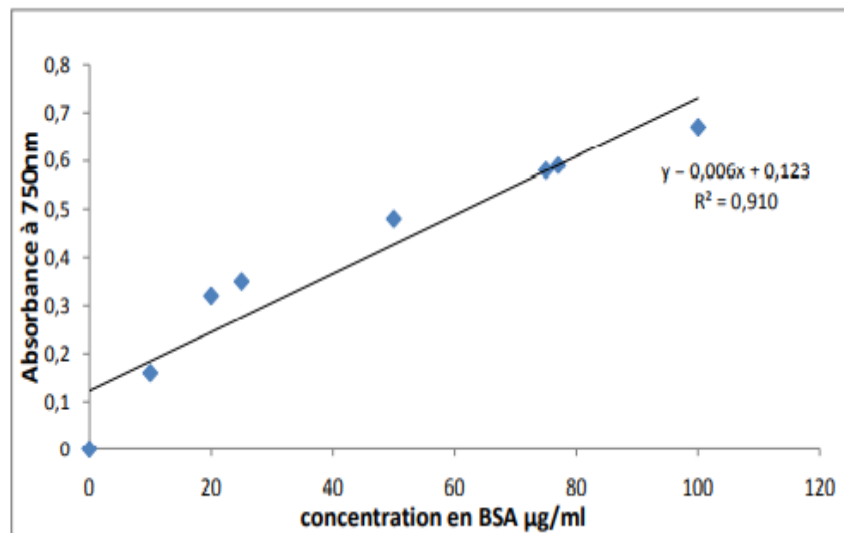
Le tableau suivant explique les étapes de préparation :

**Tableau 1** : Préparation des solutions diluées croissantes

	Témoin	01	02	03	04	05
[ ] BSA $\mu\text{g/ml}$	0	10	25	50	75	100
Solution filles BSA ( $\mu\text{l}$ )	0	100	250	250	750	1000
H <sub>2</sub> O distillée ( $\mu\text{l}$ )	1000ml	900	750	500	250	0
Réactif de lowry (ml)	5	5	5	5	5	5

On agite et on attend 10min, en suite on ajoute 0.5ml de réactif de Folin pour chaque tube .on agite encore une fois puis on met les tubes à l'obscurité au minimum 30 min. Une coloration bleue se développe correspondant à la réaction du cuivre.

**Lecture :** La lecture des densités optique ce fait au spectrophotomètre après étalonnage à 750 nm contre un blanc contenant 0.5ml d'eau distillée



**Figure n°1 :** courbe étalon de B.S.A.

### Annexe 03

#### Mesure de l'activité protéolytique (GREEN et STACKPOOLE, 1975).

##### I. Mode opératoire :

###### Condition d'hydrolyse :

1ml de la solution de caséine à 2% dans le tampon acétate de sodium (0.1N, PH5) (Annexe 02) est additionné à 1ml d'extrait enzymatique dilué. Le mélange ainsi obtenu est incubé pendant 10, 30, 60, 90, 180 min à 35°C.

Après l'incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 5ml d'une solution trichloracétique (T.C.A) à 12%(p/v), suivie d'un temps de repos ne dépassant pas 15min.

Le précipité blanc qui se forme est séparé par centrifugation à 6200T /min pendant 10min.

###### · Préparation de l'échantillon :

1ml de filtrat (surnageant obtenu) sont additionnés à 5ml de la solution(C).

On mélange puis on laisse incubé pendant 10min dans le bain marie à 30°C. Chaque tube reçoit 0.5ml de réactif de Folin, on agit immédiatement et on continue l'incubation pendant 20min.

###### Préparation de témoin (blanc) :

1ml de la solution caséinique à 2% sont additionnés à 5ml de T.C.A à 12% (pour empêcher la réaction enzymatique) puis on ajoute 1ml d'extrait enzymatique dilué. Le mélange ainsi préparé est traité de la même façon que précédemment.

##### II. Courbe étalon de tyrosine :

Préparer des solutions diluées croissantes : 20, 40, 60, 80 et 100mg/ml. Le tube témoin contient 1ml d'eau distillé.

Selon le tableau suivant les principales étapes sont résumées comme suite :

Tube	Témoin	1	2	3	4	5
[ ] de tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	20	40	60	80	100
Solution fille de tyrosine ( $\mu\text{l}$ )		200	400	600	800	1000
Eau distillé (ml)	5	5	5	5	5	5

-Ajouter dans chaque tube 5ml de la solution (C).

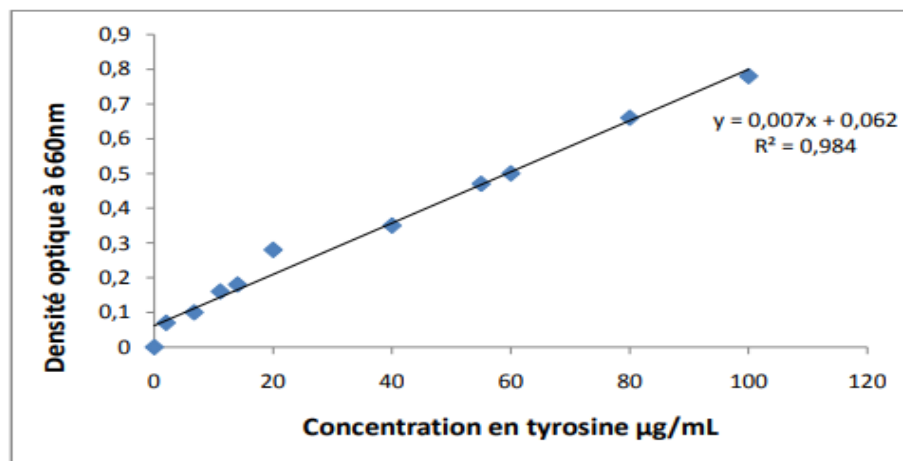
-Incuber pendant 10min à  $35^{\circ}\text{C}$  au bain marie.

-Ajouter dans chaque tube 0.5ml de la solution (D) et agiter fortement

-Laisser incuber 20min à  $35^{\circ}\text{C}$ .

• **Lecture de l'absorbance :**

La lecture de la densité optique se fait au spectrophotomètre après étalonnage à une longueur d'onde 660nm.



**Figure n°2 :** courbe étalon de tyrosine.



# **Résumés**

## **Résumé**

Etude comparative des protéases de coagulation du lait du pro ventricule de poulet et de la caillette d'ovine a été assurée. Ces travaux confirment que deux pepsines poulet et ovine, coagulant le lait, ont été obtenues par la macération de pro ventricules de poulet et de caillette d'ovine. Ces deux enzymes se caractérisent par une force de coagulation de l'ordre de  $1/2579$  pour l'extrait enzymatique brut de poulet et de  $1/1714$  pour celui la caillette. Pour la zone de pH étudié est variée entre (7,0-5,2), ce qui prouve que l'abaissement du pH du lait favorise l'activité coagulante des deux pepsines et la présure. Concernant la température du lait, les études montre qu'elle bascule entre (50 - 55°C) pour la pepsine de poulet et 55 °C pour la pepsine d'ovine. A propos de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  du lait l'ordre de 0.02 M pour la pepsine de poulet et 0.1 M de pepsine d'ovine.

**Mots- clés :** Pepsine ; Poulet (pro ventricules) ; Ovine (caillette) ; Coagulation ; Présure ; Lait

## **Abstract**

Comparative study of milk-clotting proteases of chicken proventriculus and veal abomasum. Two milk-clotting pepsins (chicken and veal), were obtained by macération of chicken proventriculus and abomasum. These two enzymes show a clotting strength about 1/2579 for chicken crude extract and 1/1714 for veal extract. Decrease milk pH between 7.0-5.2 is favourable for milk clotting activity of two pepsins and trade calf rennet. A temperature of 50 - 55°C for chicken pepsin and 55°C of veal pepsin. A 0.02M for chicken pepsin and 0.1M for veal pepsin CaCl<sub>2</sub> concentration of milk

**Key- Words** : Pepsin ; Chicken (proventriculus) ; veal (abomasum) ; Milk- Clotting ; Rennet ; milk

## الملخص

اجريت دراسة مقارنة لبروتياز التخثر لحليب البطين المؤيد والدجاجة ، وتؤكد هذه الدراسات أنه تم الحصول على قطعتين من بيبسين الدجاج والأغنام ، تخثر الحليب ، عن طريق نقع الدجاج و نقع معدة الاغنام . يتميز هذان الإنزيمان بقوة تجلط تبلغ حوالي 2579/1 لخلاصة إنزيم الدجاج النيء و 1714/1 من أجل معدة الاغنام. بالنسبة لنطاق الأس الهيدروجيني المدروس ، يتراوح بين (5.2-7.0) ، مما يثبت أن خفض الرقم الهيدروجيني للحليب يعزز نشاط التخثر لكل من البيبسين والمنفحة. فيما يتعلق بدرجة حرارة الحليب ، تشير الدراسات إلى أنها تتراوح بين (50 - 55 درجة مئوية) لبيبسين الدجاج و 55 درجة مئوية لبيبسين الاغنام. وفيما يتعلق بتركيز  $CaCl_2$  في الحليب ، فإن ترتيب 0.02 م لبيبسين الدجاج و 0.1 م لبيبسين الأغنام.

**الكلمات المفتاحية:** بيبسين. دجاج (معدة) ؛ معدة الاغنام ؛ تخثر الحليب ؛ المنفحة ؛ حليب