

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
المدرسة العليا للعلوم الفلاحية
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE
EL- HARRACH- ALGER

THÈSE

*En vue de l'obtention du diplôme
de Doctorat en Sciences Agronomiques
Option : Sciences Alimentaires*

**Obtention et caractérisation d'une pepsine ovine.
Aptitude à la coagulation du lait**

Présentée par : SLAMANI Rosa

Devant le jury

Président :	M. MEKIMENE L.	Professeur (ENSA)
Promoteur :	M. BELLAL M.M.	Professeur (ENSA)
Examineur :	M. ABBAS K.	Directeur de recherche (INRAA)
Examineur :	M. BENAMARA S.	Professeur (UMBB)

Année Universitaire : 2017-2018

REMERCIEMENT

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au laboratoire de Biochimie de la Faculté de Biologie (USTHB) et au Laboratoire Central de la LFB (Boudouaou). Je tiens à remercier respectivement les deux directeurs Mme Laraba et M. Hamadou pour m'avoir accueilli dans ces laboratoires.

J'associe à ces remerciements M. Labadi, Ingénieur au Laboratoire de Sciences du Sol de l'ENSA, qui a largement contribué à l'aboutissement de ce travail. Qu'il soit assuré ici de ma plus sincère reconnaissance. Merci pour ton soutien technique et ta grande disponibilité, merci pour tes qualités humaines qui ont rendus notre relation si agréable.

J'exprime ma reconnaissance à M. Bellal, Professeur au Département de Technologie alimentaire, pour lequel j'éprouve un profond respect. Je le remercie grandement pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ma thèse sous sa direction. Je tiens à le remercier pour la grande liberté d'action qu'il m'a accordée au cours de cette thèse, mais également pour les commentaires éclairés et les suggestions pertinentes dont il m'a fait part durant la rédaction de ce document. Merci de votre confiance.

L'autonomie qu'il a su me donner tout au long de cette thèse m'a permis d'établir des collaborations avec d'autres chercheurs. Dans le cadre de ces collaborations, je tiens à remercier chaleureusement M. Brahim-Errahmani pour tout le temps qu'il m'a consacré, pour m'avoir considérablement aidé pour l'analyse statistique, l'arrangement des figures et la révision de l'article avant sa publication. Merci de m'avoir aidé dans un moment qui m'était si difficile.

Je tiens à remercier les membres du jury qui me font l'honneur d'y siéger. Je remercie tout particulièrement M.Mekimene, Professeur au Département de Technologie alimentaire, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je remercie sincèrement M.Abbas, Directeur de recherche à l'INRAA, et M.Benamara, Professeur à l'UMBB, pour avoir consacré du temps à lire et à évaluer ce travail.

Je suis très reconnaissante au M. Chahat, ancien Directeur de l'INRAA qui m'a fait bénéficier de liberté au cours de la période 2012-2016. Sans ça cette thèse n'aurait pas vu le jour.

Je désire également exprimer ma reconnaissance et mon profond respect à Mme Zouay, Directrice du laboratoire de Biologie moléculaire à l'INPV, pour la confiance qu'elle m'a

témoigné en mettant à ma disposition le support technique pour la réalisation des électrophorèses. Je remercie vivement Mme Zitouni, Ingénieur au laboratoire de parasitologie à l'IP, pour m'avoir initié à la technique d'électrophorèse.

Je tiens à exprimer, au nom de l'INRAA, un sincère remerciement à la direction de l'ITELV pour m'avoir accordé l'autorisation de faire des prélèvements de lait. Un merci particulier à Mme Cherragui et Monsieur Sebbagh ainsi que le personnel technique pour leur implication lors des prélèvements. Je ne peux oublier Yasmine, Soraya et Attif. J'en suis très reconnaissante.

Je ne saurais exprimer assez mes remerciements à tous les membres de l'équipe « Venin » du laboratoire de Biochimie. Vous m'avez tous si bien intégré malgré les allers-retours. Je suis particulièrement redevable à Hadjer Saidi pour m'avoir si bien épaulée. Un grand merci à Zola, Wassila et Sabrina. Je vous souhaite le meilleur.

Je remercie aussi chaleureusement les divers membres du laboratoire central de la LFB pour leur collaboration. Je garde d'excellents souvenirs avec l'ensemble du personnel ainsi que tous ceux qui j'ai pu croiser pendant ces années. Qu'il me soit permis de leur témoigner mon amical remerciement.

Mes remerciements sont également adressés à mes collègues de l'INRAA, les membres de la division Technologies Agro-alimentaires pour leur collaboration et leur amitié. Merci à tous.

Mes sincères remerciements vont à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse. Je citerai Mme Halladj et Fayza de l'UMBB, Fayrouz et Mme Bettach (PS), Mme Djebara (ENSA), Mme Hamdi (INPV) et Mme Azzaz de l'INSP.

Le dernier, mais pas le moindre de mes remerciements, est pour mes proches et mes amies, merci pour votre soutien. Je suis infiniment redevable.

À mes parents

*"Il reste toujours assez de force
à chacun pour accomplir ce dont il est convaincu"*
Goethe

SOMMAIRE

RESUME	i
ملخص	ii
ABSTRACT.....	ii
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	iii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	v
LISTE DES PUBLICATIONS	vi
INTRODUCTION	2
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. RAPPEL SUR LA TECHNOLOGIE FROMAGERE	7
1. Les étapes de fabrication d'un fromage	7
2. Composition et structure des caséines bovines	9
2.1. La caséine α_{s1} bovine.....	11
2.2. La caséine α_{s2} bovine	11
2.3. La caséine β	11
2.4. La caséine κ	12
3. Mode d'organisation des caséines bovines en micelles	14
4. Caractéristiques physicochimiques comparées des caséines bovines, caprines et ovines	21
5. Mécanisme de la coagulation enzymatique du lait	24
6. Particularités de la coagulation du lait de chèvre et de brebis	28
II. LES AGENTS COAGULANTS UTILISÉS EN FROMAGERIE.....	31
1. Les agents coagulant d'origine animale	32
1.1. La présure	34
1.2. L'extrait de pepsine bovine	38
1.3. La pepsine porcine	39
2. Les Coagulants d'origine microbienne	40
3. La chymosine produite par fermentation (FPC)	42
4. Les coagulants d'origine végétale	44

MATERIELS ET METHODES

1. Origine de la matière première	47
2. Enzyme coagulante	47
3. Processus d'obtention de la pepsine ovine purifiée	47
3.1. Préparation de l'extrait brut de pepsine ovine.....	48
3.1.1. Choix du procédé d'obtention de l'extrait de pepsine ovine.....	48
3.1.2. Optimisation des conditions d'extraction.....	49
3.2. Purification de la pepsine ovine	49
3.2.1. Chromatographie d'échange ionique.....	50
3.2.2. Chromatographie d'exclusion.....	50
3.2.3. Electrophorèse en gel polyacrylamide (SDS-PAGE).....	51
4. Caractérisation de l'extrait enzymatique de pepsine ovine purifiée	51
4.1. Détermination de l'activité coagulante.....	51
4.2. Détermination de la concentration en protéines.....	52
4.3. Facteurs affectant l'activité de l'extrait de pepsine ovine.....	52
4.3.1. pH	53
4.3.2. Température.....	53
4.3.3. Teneur en calcium	53
5. Évaluation de l'aptitude à la coagulation de l'extrait de pepsine ovine	53
5.1. Analyse du comportement rhéologique des gels obtenus par les laits emprésurés avec la pepsine ovine.....	53
5.1.1. Origine et prélèvement des échantillons de laits.....	53
5.1.2. Détermination de la composition chimique des échantillons de lait.....	54
5.1.2.1. Analyses physico-chimiques du lait.....	54
5.1.2.2. Composition chimique du lait.....	55
5.1.3. Suivi de la cinétique de coagulation.....	56
5.2. Test d'estimation du rendement fromager	56
5.3. Évaluation de l'activité protéolytique de la pepsine ovine sur les caséines laitières	57
5.3.1. Les caséines	58

5.3.2. Conditions de l'hydrolyse protéique	58
5.3.3. Analyse électrophorétique des hydrolysats de caséine	59
6. Analyse statistique	59

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : Préparation de l'extrait coagulant de pepsine à partir des caillottes d'ovins adultes

1. Choix de la méthode d'extraction.....	62
1.1. Influence de la nature de la solution d'extraction, effet de la clarification.....	62
1.2. Influence de la quantité de caillotte mise en œuvre.....	63
1.3. Influence de la concentration en HCl.....	63
1.4. Influence de la température et de la durée de macération.....	65
1.5. Conditions optimales d'extraction.....	67
2. Discussion	68

CHAPITRE II : Purification de l'extrait de pepsine ovine et influence de trois facteurs sur l'activité coagulante

1. Obtention de la pepsine ovine	70
1.1. Purification de la pepsine ovine	70
1.2. Mise en évidence de la pureté de l'enzyme par SDS PAGE	72
2. Facteurs affectant l'activité de la pepsine ovine	73
2.1. Effet de la température	74
2.2. Effet du pH	74
2.3. Effet de la teneur en calcium	74
2.4. Comparaison de l'activité coagulante de deux protéases	76

CHAPITRE III : Caractérisation des propriétés rhéologiques des coagulums obtenus sous l'action de la pepsine ovine

1. Caractérisation des laits de vache, de brebis et de chèvre	78
2. Comportement rhéologique des laits emprésurés par l'extrait de la pepsine ovine	82
2.1. Cinétique de coagulation	82
2.2. Caractéristiques rhéologiques des gels	84
2.3. Etude des relations entre les caractères physico-chimiques des laits et leur comportement vis-à-vis de la pepsine ovine en comparaison à la chymosine	86

3. Impact de la substitution de la chymosine par la pepsine sur le rendement fromager de laboratoire.....	86
4. La protéolyse des caséines par la pepsine ovine	88
4.1. Comportement des caséines α_s , β et κ bovines à la protéolyse pepsique	88
4.2. Comparaison de la protéolyse des caséines bovine, ovine et caprine	90
5. Discussion globale.....	93
CONCLUSION	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100
ANNEXE	vii

RESUME

Cette étude a pour objectif de caractériser le pouvoir coagulant d'une pepsine ovine en vue de son utilisation en fromagerie. Dans une première étape, l'extrait enzymatique brut, obtenu par macération de caillettes d'ovins adultes en milieu acide, a été purifié à homogénéité par deux méthodes chromatographiques : une échangeuse d'ions sur DEAE Cellulose et une filtration sur Sephadex G-100. La détermination des conditions optimales d'action de la pepsine ovine purifiée sur un lait standard (substrat de Berridge) a montré que son activité coagulante est comparable à celle de la chymosine (témoin) à l'exception du pH pour lequel la pepsine a présenté une sensibilité plus marquée. Son poids moléculaire a été estimé à 36 kDa par SDS-PAGE. Dans une seconde étape, le comportement rhéologique du lait lors de la coagulation sous l'action de la pepsine ovine a été étudié par le suivi de la cinétique de coagulation à l'aide d'un Gelograph. Les paramètres de coagulation déterminés (temps de coagulation, vitesses de raffermissement et fermeté maximale du gel) pour le lait de vache, de brebis et de chèvre ont montré que les gels pepsine présentaient des propriétés rhéologiques différentes de celles obtenues avec la chymosine. L'action protéolytique de la pepsine ovine vis-à-vis des caséines et de ses fractions α_s , β et κ , a permis d'expliquer l'effet distinct des deux enzymes sur les propriétés rhéologiques des caillés.

Mots clé : pepsine ovine, chymosine, coagulation du lait, propriétés rhéologiques

Figure 12. Influence de la durée de macération à 25 °C sur l'activité et du rendement d'extraction	65
Figure 13. Influence de la durée de macération à 30 °C sur l'activité et du rendement d'extraction	66
Figure 14. Influence de la durée de macération à 35 °C sur l'activité et du rendement d'extraction	66
Figure 15. Influence de la durée de macération à 35 °C sur l'activité et du rendement d'extraction	67
Figure 16. Purification de la pepsine ovine	71
Figure 17. Effet de la température d'emprésurage (a), du pH (b) et la concentration en CaCl ₂ sur l'activité coagulante de la pepsine ovine et de la chymosine	75
Figure 18. Courbes d'évolution de la fermeté des gels de lait de vache, de brebis et de chèvre	83
Figure 19. Electrophorèse en gel de polyacrylamide des produits de la réaction de protéolyse des caséines α_S (A), β (B) et k (C) par la pepsine et par la chymosine	89
Figure 20. Profils électrophorétiques en gel de polyacrylamide des produits de la réaction de protéolyse de la caséine entière bovine, de la caséine ovine et de la caséine caprine	91

LISTE DES ABREVIATIONS

AOC : Appellation d'origine contrôlée

AOP : Appellation d'origine protégée

EC 3.4.23 : EC Enzyme commission of classification, 3 groupe (hydrolases), 4 sous-groupe (peptidases), 23 (endopeptidases aspartique)

FPC : La chymosine produite par fermentation

IMCU : international milk clotting units = unité de mesure de la force d'une présure

Ratio C/P : rapport de l'activité coagulante (C) à pH 6.5, sur l'activité protéolytique moyenne (P) mesurée sur un substrat d'azocaséine au même pH

w/w : rapport poids sur poids

v/v : rapport volume sur volume

AC : activité coagulante de l'extrait enzymatique

Rt : rendement d'extraction de l'activité coagulante

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

AFNOR : recueil des normes françaises

TB : teneur du lait en matières grasses (Taux Butyreux)

Ca : teneur en calcium (T : total, S : soluble)

Pi : teneur en phosphore inorganique (T : total et S : soluble)

AT : teneur en azote total ; AS teneur en azote soluble et ANP teneur en azote non protéique

GU : unité de mesure de la fermeté du gel : Gel-Unité (1 mG = 1mPa.s à 25°C).

Ct : temps de coagulation en s

GRF : gel firming rate : vitesse de gélification ou de raffermissement du gel

Amax : fermeté maximale du gel

RFf : rendement fromager en frais

RFs : rendement fromager en matière sèche

LISTE DES PUBLICATIONS

Publication internationale

Slamani R., Labadi R., Errahmani M. B., Bellal M. M. (2018). Purification and characterisation of milk-clotting and caseinolytic activities of pepsin isolated from adult sheep abomasa. *Int J Dairy Technology*, V 71, N°3, 1-7.

Publication nationale

Slamani R. et Bellal M. M. (2015). Recherche de succédanés de présure dans un coproduit d'abattage : les caillettes ovines. *Recherche Agronomique*, N° 27, 130-138.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La première étape de la fabrication du fromage a pour but de concentrer la majeure partie des constituants « nobles » du lait (caséines, matière grasse). Cette concentration est obtenue par déstabilisation de la suspension micellaire des caséines. En pratique, ceci se traduit par la formation d'un coagulum ou caillé, dont les caractéristiques physico-chimiques vont évoluer au cours des différents stades de la fabrication pour aboutir finalement à un produit (le fromage) dont les attributs sensoriels et les qualités nutritionnelles sont très appréciés (**Martin, 2015**).

La déstabilisation de l'édifice micellaire est provoquée par l'action de la présure, qui déclenche le processus de coagulation, en hydrolysant spécifiquement une liaison peptidique de la caséine κ . La présure est un extrait enzymatique préparé à partir de caillettes de jeunes bovidés non sevrés. Elle contient essentiellement deux protéases : la chymosine, majoritaire, et la pepsine dont les proportions s'inversent avec l'âge de l'animal. Bien que la présure de veau ait été à la base de toutes les fabrications fromagères, en particulier ceux portant le label d'appellation d'origine contrôlée ou protégée (AOC ou AOP), de nombreuses préparations enzymatiques d'origine diverse et ayant la propriété de coaguler le lait sont utilisées de par le monde. En effet, consécutivement à une pénurie de présure suite à une diminution de l'offre liée au marché des caillettes de jeunes bovidés, les recherches ont été activement développées dans le but de trouver des enzymes coagulants le lait de façon analogue à la présure et qui puissent être exploitées en fromagerie (**Alais et Lagrange, 1972 ; Jarmul et al., 1982 ; García et al., 2012**)

L'extrait de pepsine bovine, coagulant obtenu à partir de caillettes de bovins adultes qui comporte en majorité de la pepsine et une faible quantité de chymosine, a constitué l'un des premiers succédanés de la présure. Les essais menés sur différents types de fabrication ont

montré que son utilisation permettait d'avoir des rendements comparables à ceux obtenus avec la présure, et n'engendrait pas de défaut organoleptique. Le goût des fromages « pepsine » quoique différent de celui des fromages « présure », était très apprécié (**Martin, 1984 ; Desmazeaud, 1990**). La pepsine bovine, qui est assez proche de la chymosine au plan de la structure primaire (**Foltman 1970**), est particulièrement utilisée en mélange avec la présure dans la fabrication de fromages à pâtes molles et à pâtes pressées à durée de vie limitée.

Les enzymes d'origine végétale représentées exclusivement par les cynarases isolées des fleurs de chardon (genre *Cynara*) sont utilisées, dans la péninsule Ibérique, dans la fabrication traditionnelle de fromages à base de lait de chèvre ou de brebis bénéficiant d'une AOC (**Llorente et al., 2014**). Enfin, les préparations enzymatiques obtenues à partir de microorganismes (*Endothia parasitica*, *Mucor meihei*) ont été commercialisées et employées en totalité ou en partie dans la fabrication de fromages de type Cheddar et Gouda aux USA.

Ainsi, la nature de la préparation coagulante affecte la qualité du produit final. Ce sont la composition et les caractéristiques propres de sensibilité au pH, à la température et ions calcium de chaque coagulant qui conditionnent son utilisation industrielle. En outre, La quantité d'enzyme nécessaire pour coaguler un volume de lait connu dépend de la composition du lait qui varie avec la saison et le stade de lactation de l'animal.

Depuis une vingtaine d'années, la chymosine produite par génie génétique s'est imposée sur le marché mondial par sa production illimitée, son prix stable et sa pureté. La chymosine ainsi obtenue est identique au niveau moléculaire à la chymosine de veau et par conséquent manifeste des propriétés coagulantes et des performances en fromagerie équivalentes à celles des présures industrielles (**Jacob et al., 2011**). Cependant, elle est sensiblement différente des présures traditionnelles. Son utilisation nécessite une augmentation de la dose, notamment sur

les laits acidifiés, et un paramétrage du processus afin de compenser en particulier le non apport de la pepsine bovine (**Grandy, 2015**).

Cette situation a permis de distinguer deux types de marché : le marché des fromages de grande consommation, réguliers et aux propriétés gustatives peu développées et celui des fromages traditionnels qui se caractérisent par leur singularité et leur authenticité.

Les partisans de la présure traditionnelle incitent aujourd'hui à préserver les savoir-faire ancestraux et à s'interroger sur la fonction des différents composants de la présure. Les présures "traditionnels" obtenues par macération lente de caillettes de jeunes bovidés, renferme en plus de chymosine, de la pepsine en faible quantité, et dont l'activité protéolytique conduit à la production de fromages ayant une texture douce et crémeuse, différente de celle des fromages obtenus avec la chymosine recombinante (**Jacob et al., 2011**).

Dans le cadre des recherches réalisées en vue d'explorer de nouveaux coagulants qui seraient plus adaptés à la situation de notre fromagerie, notre attention a été dirigée vers des extraits coagulants d'origine animale. Il s'agit d'obtenir un extrait enzymatique avec des caractéristiques différentes à partir d'une source locale et pouvant être favorablement exploitée. Les caillettes générées par l'abattage des ovins à l'âge adulte constituent une source potentielle d'enzymes à partir desquelles il est facile d'extraire des coagulases dont les propriétés et les utilisations en industrie restent à déterminer.

La présente étude a pour objectif principal d'obtenir une protéase coagulant le lait (la pepsine ovine) et de déterminer ses propriétés. Elle est réalisée en trois étapes :

- Isolement et purification de la pepsine ovine ;
- Caractérisation de son activité coagulante en fonction des facteurs du milieu (pH, température et ions Ca) sur un lait standard ;

- Détermination des propriétés rhéologiques des gels formés par l'action de la pepsine ovine sur les laits de vache, de brebis et de chèvre en comparaison avec les laits coagulés avec la chymosine ;
- Caractérisation électrophorétique de la protéolyse de la caséine entière et ses fractions α , β et κ .

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La présure ainsi que les coagulants de substitution sont l'élément déterminant de la formation d'un gel lors de la transformation du lait en fromage. Il nous semble donc important de rappeler au préalable les principes de la technologie fromagère, et plus spécifiquement la technologie de type caillé présure.

I - RAPPEL SUR LA TECHNOLOGIE FROMAGERE

1. Les étapes de fabrication d'un fromage

La fabrication d'un fromage, selon les procédés classiques, se déroule en trois étapes principales (Mietton *et al.*, 1994) représentées par la **figure 1**.

- la coagulation du lait avec formation du gel ou coagulum : le réseau protéique de caséines retient la matière grasse et la phase aqueuse (le lactosérum). Cette coagulation est réalisée par la combinaison de l'action des enzymes coagulantes contenues dans la présure (c'est la voie enzymatique) et des bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains (c'est la voie fermentaire). L'importance relative de ces deux principes (voies) détermine les propriétés du caillé obtenu et en conséquence l'intensité de l'égouttage, l'affinage et la taille du fromage.

- l'égouttage du gel conduisant à la formation du caillé ou caillebotte : le réseau protéique est concentré suite à l'expulsion spontanée du lactosérum par synérèse (contraction du gel de caillé). L'égouttage, réalisé sous presse, est associé à l'opération de moulage qui donne la forme au fromage.

- l'affinage du caillé : la matrice caséique subit une maturation enzymatique (présure et microflore lactique) qui impacte la texture et la flaveur du fromage.

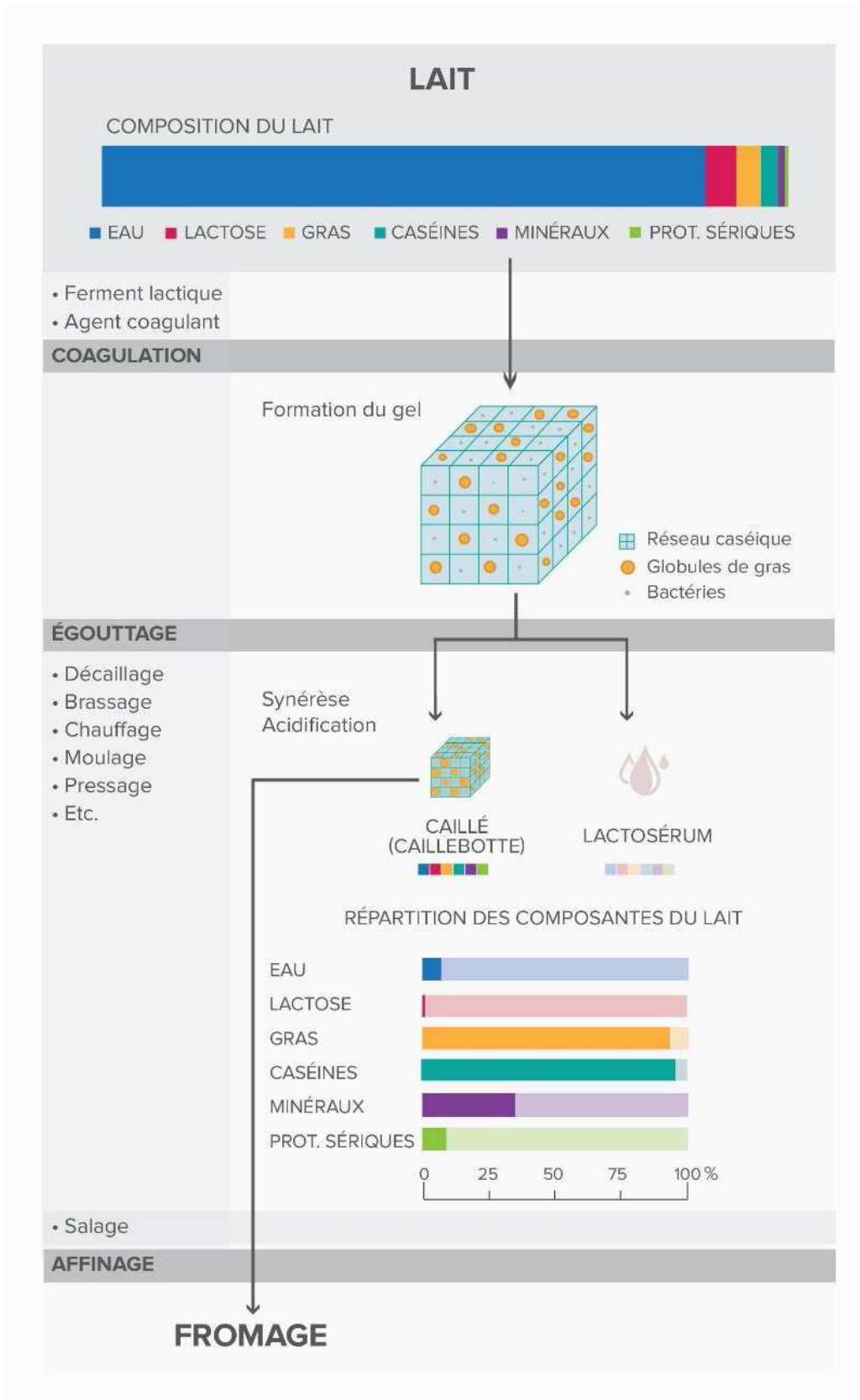


Figure 1. Représentation schématique de la transformation du lait en fromage (selon Mietton *et al.*, 1994)

Au cours de ce processus, la présure va gélifier le lait, permettre son égouttage après décaillage, et selon son origine et son mode de production, elle va plus ou moins fortement conditionner la qualité finale des fromages en intervenant notamment, sur l'affinage.

Les étapes de fabrication des différents types de fromages sont représentées par la **figure 2**. Les différences de technologies portent essentiellement sur le type de coagulation, la présence ou non de travail en cuve (décaillage, brassage, chauffage) et le mode de séchage et d'affinage. Selon la conduite de l'affinage (température, humidité de la salle d'affinage, soins des fromages) différents types de croûte peuvent se former.

Avant de présenter les mécanismes proposés actuellement pour expliquer la formation du gel présure, il convient de rappeler la composition et la structure des caséines : composants protéiques principales du lait impliqués dans le processus de gélification ; ainsi que le mode d'organisation de ces constituants micellaires.

2. Composition et structure des caséines bovines

Les caséines bovines, les plus étudiées parmi celles des laits de mammifères, constituent les protéines majeures du lait de vache, représentant 80% du contenu protéique. Elles sont isolées par ultracentrifugation sous leur forme native, par précipitation isoélectrique à pH 4,6 sous une forme dénaturée, ou par gélification du lait par la présure sous forme de complexe phosphocalcique, le caillé de fromagerie (**Cayot et Lorient, 1997**). On compte 4 principaux types de caséines : les caséines α_{s1} , α_{s2} , β , et κ et quelques fragments peptidiques de caséine γ issus de la protéolyse de la caséine β par la plasmine. Les quatre caséines sont des phosphoprotéines, la caséine κ possède en plus dans sa partie C-terminale une partie glucidique très hydrophile. Les caséines α_s et β sont dites « sensibles » au calcium puisqu'elles précipitent en la présence de ce dernier qui se lie à leurs résidus phosphosérines.

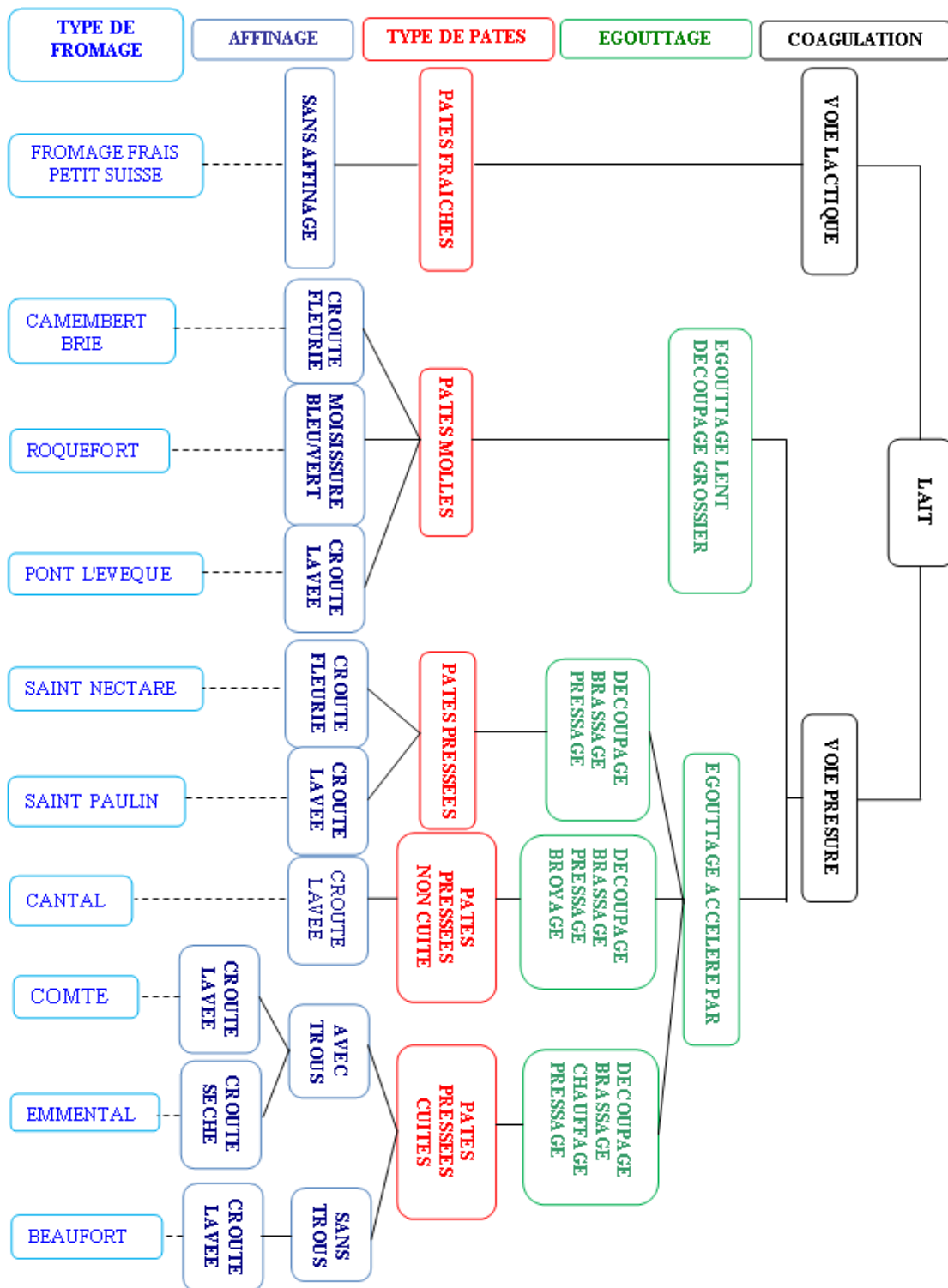


Figure 2. Classification des fromages (selon Lenoir *et al.*, 1983)

Les caséines sont des molécules à structure peu ordonnée, très dépliées avec des chaînes latérales polaires (phosphoséryle surtout et carboxylique) groupées du côté N-terminal ou apolaires du côté C-terminal (α_{s1} et β), cette répartition étant inversée pour la caséine κ (polaire du côté C terminal).

2.1. La caséine α_{s1} bovine

Elle représente plus de 40% des caséines totales. Elle est constituée de 199 résidus d'acides aminés et présente une masse molaire de 23 kDa. La caséine α_{s1} ne possède pas de résidus de cystéine. Elle possède deux extrémités hydrophobes, séparées par une région centrale hydrophile contenant les résidus phosphorylés (**Rollema, 1992**). Le modèle hypothétique tridimensionnel de la caséine α_{s1} établi par **Farrell et al. (1993)** la montre sous la forme d'un "chien assis" avec les résidus de phosphosérine présents dans un coude β , qui formeraient une région hydrophile séparée du reste de la protéine (**Fig. 3a**).

2.2. La caséine α_{s2} bovine

Elle constitue la caséine la moins abondante (10% des caséines totales) et la plus sensible au calcium. Elle contient 207 résidus d'acides aminés dont 2 résidus cystéine. Sa masse molaire est de 25 kDa. La caséine α_{s2} est le composant caséinique le plus phosphorylé avec un degré de phosphorylation variable allant de 10P à 13P. Elle se caractérise également par une hydrophobicité et une teneur en proline plus basses que les 3 autres caséines (**Swaisgood, 1992**).

2.3. La caséine β bovine

Elle contient 209 acides aminés dont cinq résidus phosphoséryles et possède une masse molaire de 24 kDa. C'est la plus hydrophobe des caséines (**Rollema, 1992**). Sa chaîne peptidique peut être hydrolysée par la plasmine, enzyme endogène du lait, au niveau des liaisons Lys₂₈-Lys₂₉, Lys₁₀₅-His₁₀₆ et Lys₁₀₇-Glu₁₀₈ ce qui génère les fragments 1-28, 1-105,

/1-107 et 29-105/107 appelés protéoses-peptones qui se retrouvent dans le lactosérum. Les fragments complémentaires sont les caséine- γ_1 [29-209], caséine- γ_2 [106-209] et caséine- γ_3 [108-209] qu'on retrouve dans la fraction caséinique car insolubles à pH 4,6 (**Eigel, 1977**). La structure de la caséine β est sous la forme d'une molécule asymétrique ressemblant à un "crabe" et dont la partie hydrophile se situe au niveau des "pinces" (**Fig. 3b**) qui contiennent également les sites d'hydrolyse par la plasmine (**Farrell et al., 2004**).

2.4. La caséine κ

C'est une phospho-glycoprotéine d'une masse molaire de 19 kDa. Sa structure primaire contient 169 résidus d'acides aminés dont deux résidus cystéine (**Rollema, 1992**). Elle est, après la caséine β , la plus hydrophobe des caséines. Elle comporte 1 à 3 groupements phosphoséryles. Les trois sites phosphorylés sont les résidus Ser₁₂₇, Ser₁₄₉ et Thr₁₃₅ ; le résidu Ser₁₄₉ est toujours phosphorylé tandis que le résidu Ser₁₂₇ ne l'est que partiellement. La forme comportant 3 groupements phosphoséryles est minoritaire (**Mercier, 1981 ; Mollé et Léonil, 1995 ; Holland et al., 2006**). Cette caséine se différencie des autres caséines par sa grande sensibilité à la chymosine, sa faible affinité pour le calcium et la présence de résidus glucidiques. Les chaînes glycanes constitués de résidus de N-acétylgalactosamine (GalNAc), de galactose (Gal) et d'acide N-acétyl neuraminique (NeuAc), sont fixées sur les résidus thréonyles de la région C-terminale (121, 131, 133, 136, 142 et 165) (**Pisano et al., 1994**). La forme non glycosylée de la caséine κ bovine (37% de la caséine κ totale) contenant deux résidus phosphoséryles (Ser₁₂₇ et Ser₁₄₉), appelée caséine κ_1 , coexiste avec les formes glycosylées qui, elles, possèdent un seul résidu de phosphosérine (Ser₁₄₉) (**Holland et al., 2006**). La structure de la caséine κ est sous la forme d'un "cavalier sur son cheval", où la paracaséine- κ correspond au "cheval" et le glycomacropéptide au "cavalier" (**Fig. 3c**).

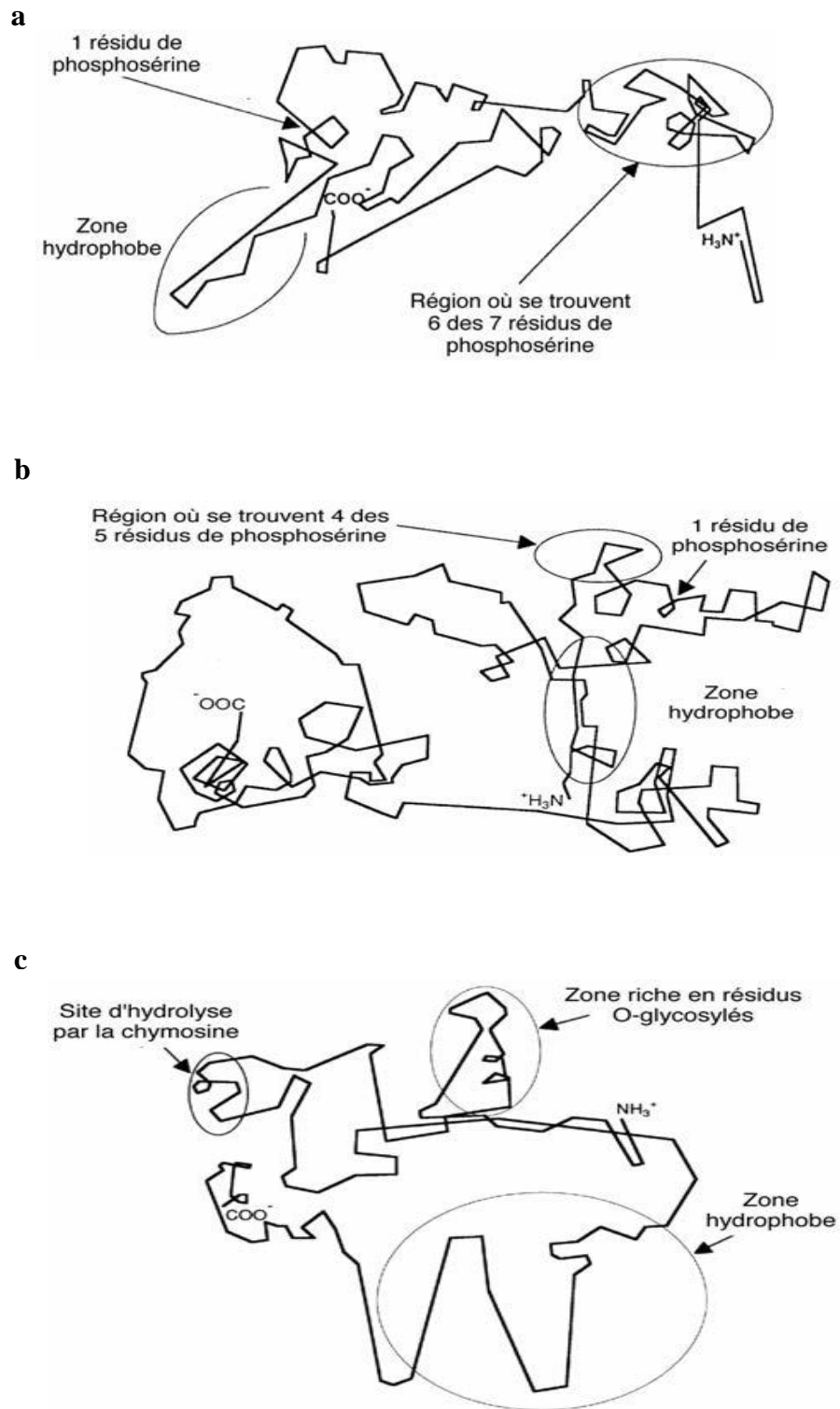


Figure 3. Modèle hypothétique de la structure tridimensionnelle de la caséine bovine α_{s1} (a), β (b) et κ (c) : d'après Farrel *et al.*, (1993). Figures reproduites d'après Cayot et Lorient (1998).

Les régions hydrophobes de la caséine κ seraient regroupées en feuillets β antiparallèles au niveau des régions représentant les "pattes du cheval", qui seraient le point d'association avec d'autres molécules de caséine κ et les caséines α_s et β (Farrell *et al.*, 1993).

3. Mode d'organisation des caséines bovines en micelles

Dans le lait, les molécules de caséines sont structurées sous forme de particules sphériques communément appelées micelles de caséines (Fig. 4), et dont le diamètre moyen se situe entre 150 à 200 nm. La micelle est composée de 92% de caséines en proportions variables et de 8% de minéraux. Les quatre caséines (α_{s1} , α_{s2} , β et κ) sont dans un rapport molaire respectif 4 ; 1 ; 3,5 et 1,5. La proportion des caséines α_s est relativement constante, le rapport caséine κ /caséine β est d'autant plus élevé que la taille des micelles est petite. La fraction minérale est constituée à 90% de phosphate de calcium, communément appelé phosphate de calcium colloïdal et à 10% d'ions magnésium et citrate (Walstra, 1990 ; De Kruif and Holt, 2003 ; Léonil *et al.*, 2013 ; Broyard et Gaucheron, 2015).

L'organisation des constituants protéiques et minéraux au sein de la micelles a fait l'objet de nombreuses études hypothétiques (Schmidts, 1980 ; Ono et Obata, 1989 ; Walstra, 1999 ; Horne, 2006 ; De Kruif *et al.*, 2012). Tous les modèles de structure micellaire qui ont été décrits reposent sur l'une des deux variantes: le modèle à sous-unités qui met en avant des structures sub-micellaires des caséines comme caractéristique prédominante et le modèle à «nanoclusters» qui propose une organisation sous forme d'amas de phosphate de calcium inorganique. Ces deux modèles opposés se rejoignent sur la localisation de la caséine κ à la surface de la micelle dont les chaînes C-terminales constituent une couche «chevelue» qui permet de stabiliser la micelle (Fig. 5).

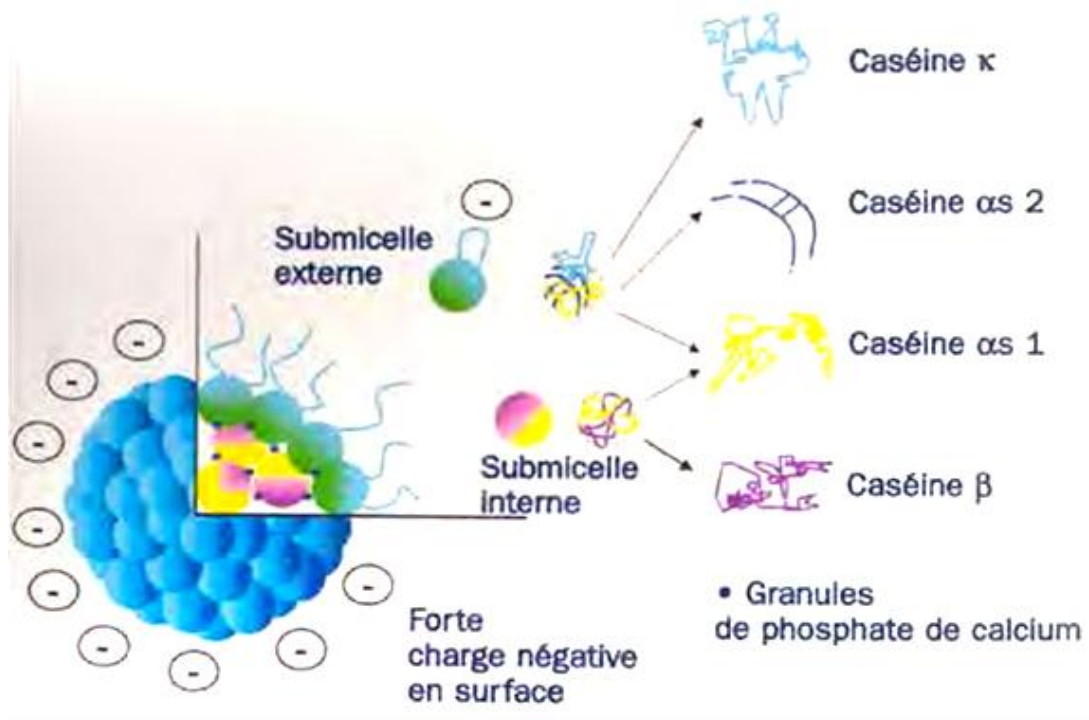
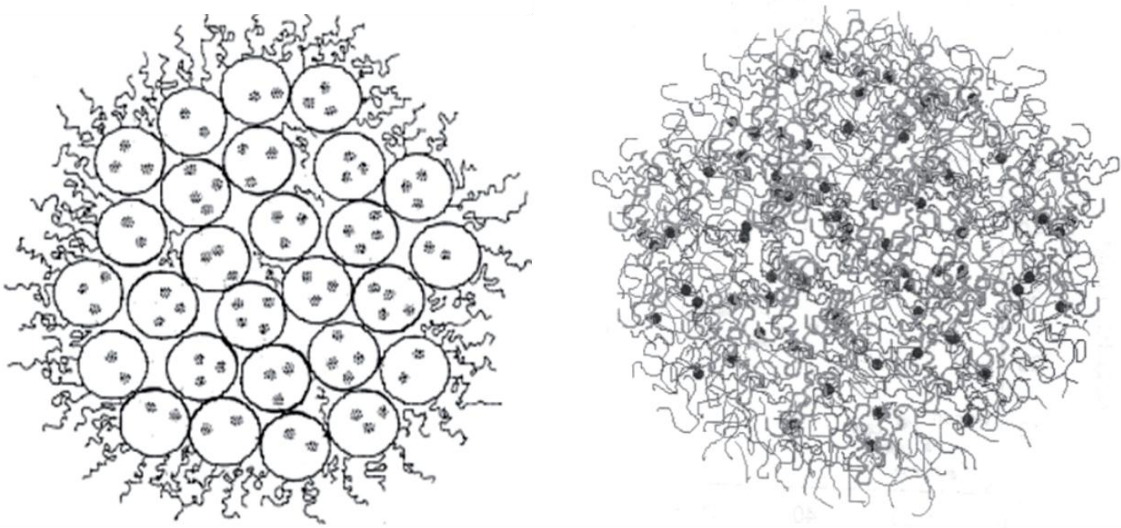


Figure 4. La micelle de caséine (rapporté par Neyers, 2013)



Modèle à sous-unités
(Walstra, 1999)

Modèle à structure ouverte
(De Kruif et Holt, 2003)

Figure 5. Les deux modèles proposés pour la structure de la micelle de caséine.

Le model proposé par Schmidt (1980) et complété par **Walstra (1999)** repose sur le principe d'une organisation modulaire. La micelle serait constituée d'un ensemble de sous-unités ou submicelles de nature protéique et de composition variable, qui s'associent par pontage phosphocalcique (**Fig. 6a**).

Les submicelles de forme sphérique ont un diamètre moyen de 10 à 20 nm et un poids moléculaire proche de 250 kDa ce qui correspond à une dizaine de monomères caséiniques. Elles sont constituées d'un cœur hydrophobe, formé par les parties apolaires des caséines, et une enveloppe hydrophile, formée des segments polaires avec, d'une part, les résidus phosphoséryles des caséines α_{s1} , α_{s2} , β , et d'autre part, la partie glucidique et carboxylique terminale de la caséine κ . Les caséines α_s formeraient un réseau dans lequel s'incrusterait les zones hydrophobes des caséines β et κ . Les submicelles constituées de caséines α_s et β possèdent une forte densité de résidus phosphoséryles en périphérie alors que l'enveloppe des submicelles constituées de caséines α_s et κ est pauvre en résidus phosphoséryls et contiennent des dérivés glucidiques. En conséquence, il existerait différents types de submicelles en fonction de leur position dans la micelle (**Fig. 6 b**). Les submicelles constituées de caséines α_{s1} et β , présentant de par leur densité en phosphosérine une forte réactivité vis-à-vis du calcium, sont essentiellement localisées à l'intérieur de la structure micellaire, alors que les submicelles comportant plus de caséines κ sont localisées en périphérie et auraient une taille plus importante (**Ono et Obata, 1989**). **Walstra (1997 ; 1999)** propose une variante au modèle classique de la micelle : le phosphate de calcium, sous la forme de granules, serait situé au cœur des submicelles qui seraient liées entre-elles par des interactions hydrophobes et du "ciment" protéique de la caséine κ .

Les sous-unités micellaires riches en caséine κ et pauvres en phosphosérine sont préférentiellement localisées à la périphérie de la micelle, jouant un rôle à la fois de limitation dans la croissance de la micelle et de maintien de celle-ci en suspension dans le lait (**Léonil et**

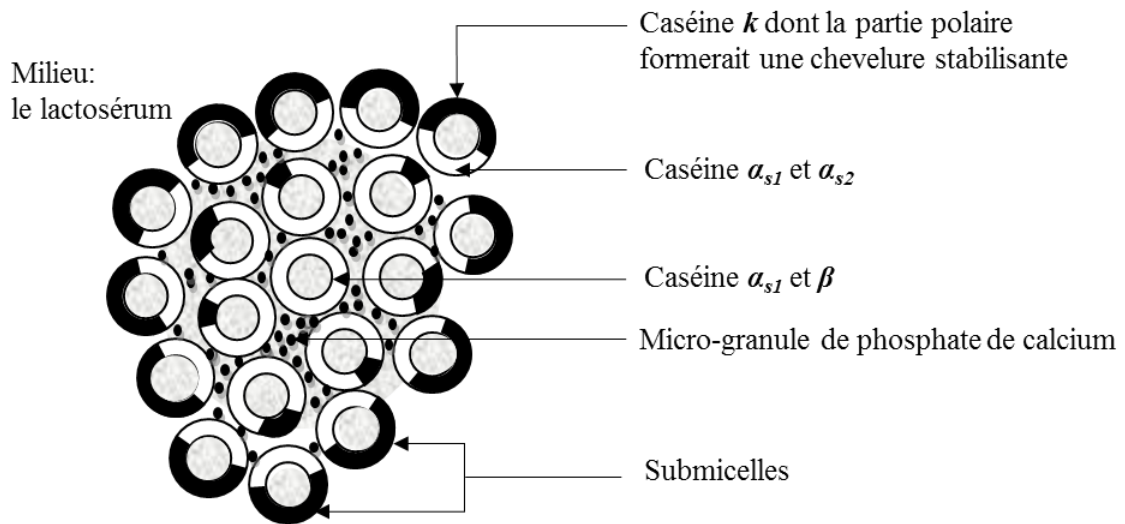


Figure 6 a. Structure de la micelle de caséine (selon Schmidt, 1982)

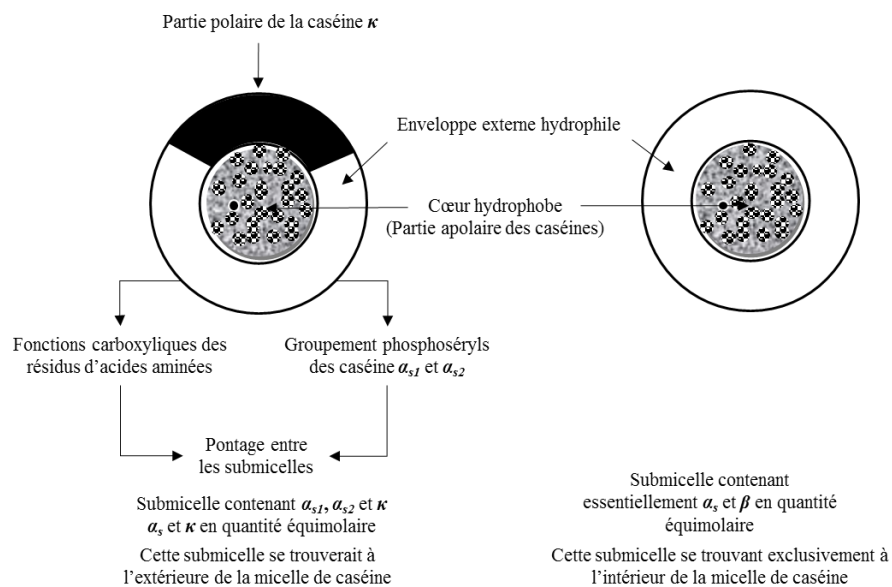
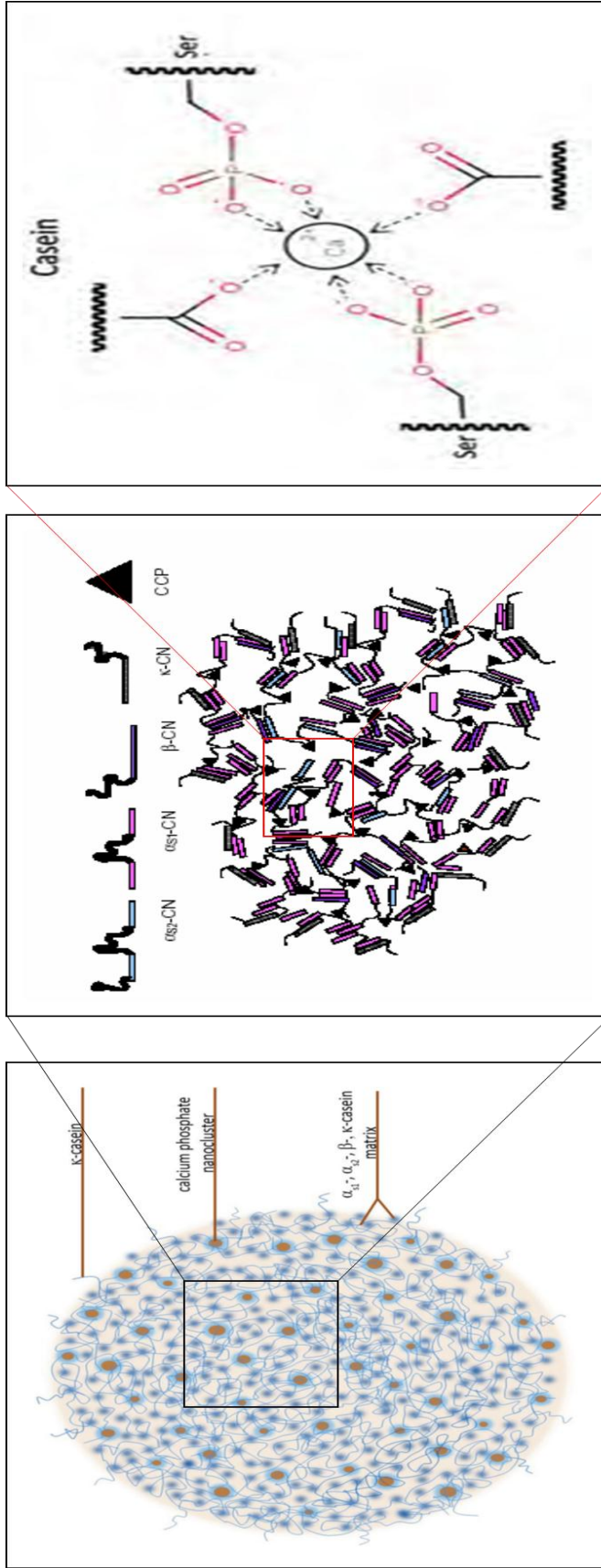


Figure 6 b. Structure des submicelles (selon Ono et Obata, 1989)

al., 2007). Les chaînes peptidiques flexibles analogues à des cheveux, correspondant à l'extrémité C-terminale de la caséine κ , assurent la répulsion entre les différentes micelles qui, au pH normal du lait (6.6 – 6.8), sont dispersées dans le lait. Leur libération par hydrolyse enzymatique provoque l'agrégation de ces micelles.

Le modèle à « nanoclusters » ou à structure ouverte décrit par **Holt (1992)** et complété par **Horne (2002)**, décrit la micelle comme un édifice poreux dans lequel s'est formé un réseau de caséines α_{s1} et α_{s2} où s'insère la caséine β . La caséine κ interagit avec les autres caséines par son segment hydrophobe. Ce réseau est construit à partir d'un point de nucléation qui s'est développé grâce aux interactions entre le calcium colloïdal et les groupements phosphoséryles des différentes caséines sous forme de "nanocluster" par l'intermédiaire des cations divalents associés aux phosphosérines (ponts phosphocalciques). Ces substructures de 2 à 3 nm de diamètre constituent des points de jonction entre les caséines qui se lient par des interactions non covalentes (**Fig. 7**)

L'incorporation des nanoclusters de phosphate de calcium, au niveau des clusters de phosphosérine, permettrait la neutralisation des charges négatives et l'établissement de liaisons entre les régions hydrophiles des protéines. Les nanoclusters rendent alors les interactions hydrophobes majoritaires dans la micelle. Les caséines α_s disposant de nombreux sites phosphosériques peuvent être impliquées dans plusieurs nanoclusters simultanément et de ce fait assurent le développement du réseau en trois dimensions. La caséine β n'a la possibilité de se lier qu'à un seul nanocluster à la fois. La caséine κ ne possédant pas de clusters de phosphosérine ne peut pas se lier au phosphate de calcium colloïdal. Elle interagit avec les autres caséines par son unique segment hydrophobe et limite donc le développement du réseau micellaire. Elle formerait une couche chevelue à la surface de la et micelle participerait à la stabilisation de la structure colloïdale comme dans le cas du modèle



Présentation des monomères de caséines sous forme de filaments et les nanoclusters de phosphate de calcium sous forme de cercles noirs (d'après Holt, 2004).

Présentation des interactions caséine-caséine qui ont lieu entre les régions hydrophobes (rectangle) tandis que les régions hydrophiles (boucles) lient les clusters de phosphate de calcium (triangle). La caséine κ est monomérique et en surface (d'après Horne, 2006).

Figure 7. Organisation moléculaire et supramoléculaire de la micelle de caséine (d'après Farrell *et al.*, 2006).

submicellaire (**De Kruif et Holt, 2003**). Le nombre de nanoclusters est compris entre 2000 et 3000 par micelle.

Plus récemment décrit, un nouveau modèle dit **structure « en éponge »** a été proposé par **Bouchoux et al. (2010)**. Ces chercheurs ont exploré la structure interne de la micelle de caséine en suivant, par diffusion de rayons X aux petits angles (Small Angle X-rays Scattering), l'évolution de sa structure interne en cours de compression osmotique. L'environnement physico-chimique de la micelle reste inchangé et seule sa réponse à une sollicitation mécanique (= déformation de la micelle) est suivie. Les résultats obtenus suggèrent que la micelle est un matériau hétérogène constitué de régions denses, qui résistent à la compression, et de régions "molles" ou de vides très hydratés (76% d'eau en volume), qui se contractent voire s'effondrent quand la micelle est déformée justifiant ainsi l'appellation en « éponge » (**Fig. 8**).

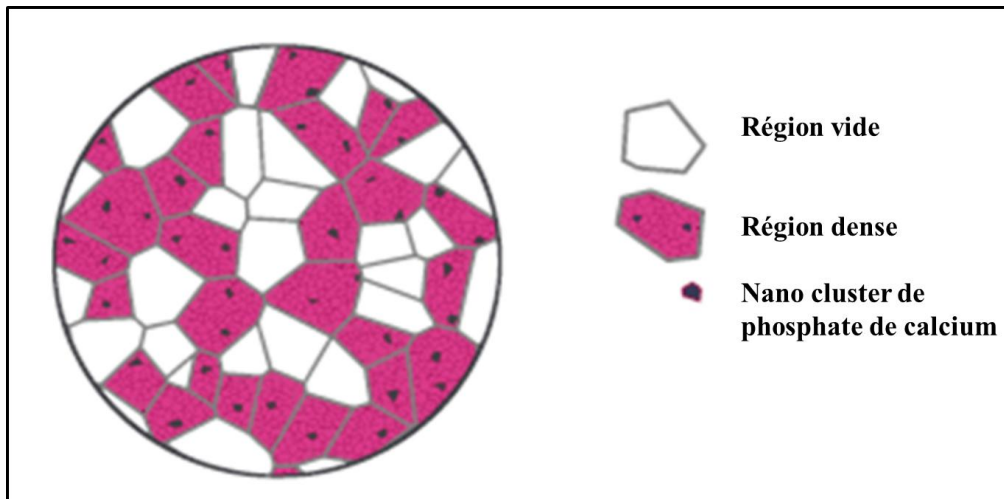


Figure 8. Structure « en éponge » de la micelle de caséine sous compression osmotique (d'après **Bouchoux et al., 2010**).

Cette proposition contraste avec les modèles existants déjà et constitue selon ces auteurs une avancée importante du point de vue fondamental. L'étude de la structure interne de la micelle de caséine et de son organisation moléculaire et supramoléculaire devrait permettre de

comprendre le rôle déterminant de ces agrégats protéiques dans de nombreux procédés de transformation des industries alimentaires (**Bouchoux et al., 2010**).

4. Caractéristiques physicochimiques comparées des caséines bovines, caprines et ovines

Le lait de chèvre et de brebis comprend au même titre que celui de vache, une association complexe des quatre protéines, les caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ en suspension micellaire mais dans des proportions différentes. Ainsi, l'abondance de la caséine α_{s1} observée dans le lait de vache est fortement réduite dans le lait caprin. Inversement, la concentration de la fraction caséinique α_{s2} est plus élevée dans le lait caprin. Cependant, Il existe une forte variabilité individuelle de la teneur en caséine α_s dans le lait de chèvre qui, selon **Grosclaude et al. (1987, 1994)** et **Mora-Gutierrez et al., (1991)**, est liée à l'existence d'un **polymorphisme génétique**. La part de la caséine β importante dans le lait de vache, est majeure pour les laits de chèvre et de brebis. Les proportions de la caséine κ sont particulièrement plus élevées dans le lait caprin et dans le lait ovine (**Boulangier et al., 1984; Kaminarides et Anifantakis, 1989; Ould eleya et al., 1995**). Le **tableau 1** montre la distribution des différentes fractions des caséines des laits de vache, de chèvre et de brebis.

Les études consacrées à l'analyse des séquences de caséines ovines et caprines ont montré de très fortes identités avec leurs homologues bovins. En dépit de l'existence d'une multitude d'iso-formes pour chaque caséine, les homologies des séquences entre espèces bovine et caprine ou ovine apparaissent toutes supérieures à 80%.

Il existe de fortes homologies de structure entre les protéines du lait des différentes espèces : 85 % entre lait de vache et lait de brebis ou de chèvre, 97 % entre le lait de brebis et le lait de chèvre. Ainsi, le degré de similarité de la structure primaire de la caséine κ avoisine les 85%. La caséine κ caprine compte 171 résidus contre 169 pour son homologue bovine,

consécutivement à l'insertion d'un dipeptide Val-His entre les résidus Thr₁₃₁ et Ser₁₃₂. Le tiers C-terminal de la molécule, correspondant à la région la plus hydrophile de la molécule (caséinomacropéptide) diffère de son homologue bovin par 16 substitutions d'acides aminés. Par ailleurs, la para-caséine κ présente 8 substitutions.

Les différences entre les séquences α_s et β caprine et bovine se traduisent généralement par un nombre limité de substitution/délétion disséminé sur l'intégralité de la séquence protéique. Ainsi, on note la présence d'un résidu d'acide aminé supplémentaire (Asn) localisé entre les résidus isoleucyle 14 et 15 dans la séquence de la caséine α_{s2} caprine, et la délétion du dipeptide Pro₁₇₉-Tyr₁₈₀ dans la séquence de la caséine β caprine. Les homologies des séquences sont encore plus prononcées entre les caséines ovines et caprines qui selon **Masoodi et Shafi (2010)**, s'élèvent à 99% pour α_{s1} et α_{s2} caprine et ovine.

Au niveau ultra structural, les micelles de caséine de la plupart des espèces apparaissent très semblables (**Mora-Gutierrez, 2007**). Cependant les micelles caprine et ovine présentent des caractéristiques qui les distinguent nettement des micelles bovines, notamment au plan de la dimension, de la minéralisation et de l'hydratation micellaire (**Tab. I**).

Les micelles ovine et caprine présentent un degré de minéralisation phosphocalcique élevé, ce qui entraîne l'établissement de liaisons protéines-minéraux plus important et le renforcement de la cohésion micellaire. Parallèlement, la réduction du nombre de sites de fixation disponibles pour les molécules d'eau se traduit par un degré d'hydratation moindre à celui de la micelle bovine (**Raynal- Ljutovac et al., 2007**).

En ce qui concerne les dimensions micellaires, les micelles caprines ont une taille moyenne nettement supérieure à celle des micelles bovines. Les micelles ovines ont une dimension intermédiaire mais plus proche des micelles bovines (**Brulé et al., 1997**).

Tableau I. Caractéristique micellaires comparées des laits de vache, de chèvre et de brebis (Remeuf *et al.*, 1991 , 1989 ; Pelligrini *et al.*, 1994)

		Vache	Chèvre	Brebis
Proportions relatives des caséines (% caséines totales)	$\alpha_{s1} + \alpha_{s2}$	48	27	36
	$\beta + \gamma$	40	55	50
	κ	12	18	14
Diamètre moyen des micelles (nm)		175	255	202
Degré d'hydratation micellaire (g eau/g MS)		1.9	1.75	1.83
Minéralisation des micelles (mg/g)	Calcium/caséines	29	36	33
	Phosphore inorganique/caséines	12	15	13

Les micelles bovines ont une distribution de taille polydisperses allant de 50 à 500 nm avec un diamètre moyen qui se situe autour de 150 et 200 nm (Dalglish et Corredig 2012, Léonil *et al.* 2013). Il est bien établi que la composition des micelles du lait de vache détermine leurs dimensions. Aussi, le diamètre moyen est inversement proportionnel au contenu de la micelle en caséine κ . Quoique le contenu en calcium et en phosphore micellaire augmente avec l'augmentation du diamètre micellaire, il ne contrôle pas la taille des micelles. La quantité de caséine κ est le facteur déterminant (Dalglish *et al.*, 1989, Marchin *et al.*, 2007).

Corrélativement et dans le lait de chèvre, des études ont montré que les micelles caprines ont une distribution de taille large, avec des particules de 40 nm de diamètre et d'autres, dont le diamètre moyen dépasse 250 nm (Richardson *et al.*, 1974). Les dimensions micellaires seraient selon Remeuf *et al.* (1989) liées aux proportions relatives des caséines α_s et β par l'intermédiaire du rapport α_s / β . Ainsi, la détermination de la taille des micelles de caséine dans deux laits provenant de chèvres de génotype différent par la caséine α_{s1} , a montré que le diamètre moyen des micelles dans le lait exempt de caséine α_{s1} était de 280 nm, alors que lait riche en caséine α_{s1} était de 199 nm, soit une valeur inférieure de 29% à la première. Le lait

exempt de caséine α_{s1} a une large dispersion des volumes micellaires de 20 à 270 nm et une grande proportion de la caséine à l'état de grosses micelles. Au contraire, le lait à forte teneur en caséine α_{s1} présentait une répartition uni-modale nette, qui se démarque fortement de l'autre lait. L'analyse chimique des laits (caséine totale, caséines individuelles, minéraux totaux, solubles) ne montrait aucune différence notable entre les deux, si ce n'est la présence de caséine α_{s1} dans l'un d'eux. Ces résultats ont conduit les auteurs à conclure que le type de caséine α_{s1} a un effet marqué sur les dimensions des micelles de caséine (**Remeuf, 1993 ; Pierre et al., 1995**).

Les micelles ovines présentent une taille intermédiaire entre les micelles bovine et caprine, avec un diamètre micellaire moyen de 193 nm (**Balthazar et al., 2017**). Le suivi des caractéristiques micellaires du lait de brebis collecté dans la région de Roquefort au cours de la période de lactation a permis de mettre en évidence un accroissement significatif de la taille des micelles, dont le diamètre passe de 175 nm à près de 200 nm durant les 120 premiers jours de collecte, qui se stabilise par la suite autour de cette valeur (**Pellegrini et al., 1994**)

5. Mécanisme de la coagulation enzymatique du lait

Dans le modèle de coagulation enzymatique, la déstabilisation de la suspension colloïdale stable de micelles de caséines par l'action d'enzyme coagulante aboutit à la formation d'un gel homogène, très poreux et très contractile, occupant tout le volume initial et emprisonnant les autres composants (sérum et matière grasse) du lait. Ce gel, une fois tranché et égoutté donne un caillé dit présure. Cette technologie est utilisée pour la majorité des fromages au lait de vache et au lait de brebis.

Le mécanisme d'action des enzymes coagulantes lors de la coagulation du lait est bien établi (**Fig. 9**). Il comporte deux phases (**Claverie-Martín et Vega-Hernández, 2007**) :

Une phase primaire dite enzymatique qui correspond à la réaction d'hydrolyse proprement dite de la fraction caséine κ au niveau de la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Cette hydrolyse libère le glycomacropéptide qui est la partie 106-169 à caractère hydrophile, chargée négativement et responsable des répulsions électrostatiques. La partie qui reste intégrée à la micelle (1-105), c'est la partie N-terminal à caractère hydrophobe désignée paracaséine- κ . La perte du pôle le plus hydraté des micelles induit une diminution importante de la charge nette négative des micelles et les répulsions électrostatiques sont amoindries. Il s'ensuit une diminution sensible de l'enveloppe d'hydratation car les possibilités de fixation d'eau à la surface des micelles se trouvent fortement limitées.

La réaction d'hydrolyse enzymatique est dépendante de nombreux facteurs physicochimiques : la concentration en enzymes, la température et le pH.

La concentration en enzyme et plus particulièrement le rapport enzyme/substrat affecte la vitesse de la réaction enzymatique. Lorsque la dose en enzyme augmente, l'hydrolyse des caséines κ sera plus complète.

La température d'emprésurage influence fortement la coagulation en agissant sur l'activité de la protéase. Elle est très lente entre 0 et 10 °C, sa vitesse augmente rapidement aux températures supérieures, elle triple lorsque l'élévation de température est de 10 °C. En fromagerie classique, les températures du lait au moment de l'emprésurage se situent dans la fourchette 20 – 40 °C, et le plus souvent entre 30 et 35° C ; dans cette gamme, des variations faibles de température influencent beaucoup la vitesse de coagulation.

Au pH du lait frais (pH 6,6 – 6,8), l'activité des enzymes coagulantes est modérée car leur optimum d'activité varie de pH 2 à 5 selon le substrat (**Dunn *et al.*, 1987**). En fromagerie, le lait est généralement acidifié jusqu'à pH 6,4 – 6,5 ; l'activité de l'agent coagulant croît sensiblement, quoique cette baisse de pH ne soit pas compatible avec tous les types de fabrication, notamment celle des fromages à pâte cuite.

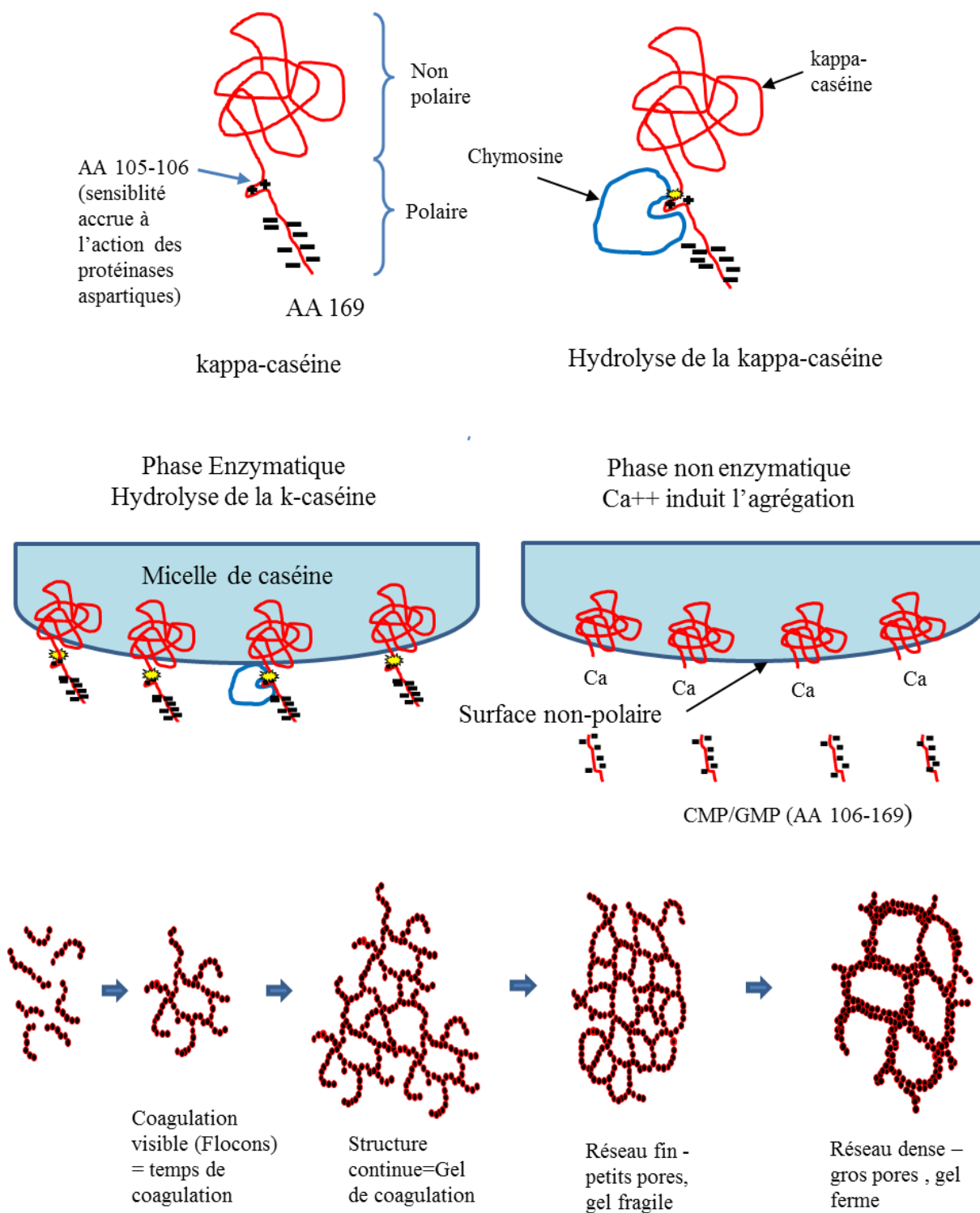


Figure 9. Mécanisme de Coagulation (Kindstedt, 2011)

La phase secondaire, dite d'agglomération, se caractérise par l'agrégation puis la réticulation des micelles déstabilisées qui ont perdu leur capacité de répulsion à la suite de la scission de la partie hydrophile de la caséine κ . Cette phase d'agglomération débute lorsqu'au moins 80% de la caséine κ est hydrolysée. Les paracaséines vont se lier entre elles par des liaisons hydrophobes, ce qui crée la coagulation (**Risso *et al.*, 2007**). Elle commence d'abord par l'agrégation des petites micelles, puis se complète par l'agrégation des grosses micelles pour former le gel de paracaséine ; Il s'en suit une structuration tridimensionnelle des micelles de caséines superficiellement déshydratées. Les ions calcium s'uniraient à la partie chargée négativement des micelles, diminuant ainsi les répulsions électrostatiques auxquelles elles sont soumises et favoriseraient la formation des ponts phosphocalciques entre les paracaséines. Les ponts d'accrochages ne sont pas répartis uniformément à la surface des micelles mais sont localisés, formant des chaînes isolant des vacuoles contenant du lactosérum. Un gel beaucoup plus ferme, très poreux et très minéralisé en résultera, se créant dans les trois dimensions de l'espace en retenant la phase aqueuse et la matière grasse dans ces mailles (**Lucey *et al.*, 2000**).

La présence du calcium soluble à l'état ionisé est indispensable à l'accomplissement de cette phase. Dans le lait cru, la présence de calcium est suffisante pour permettre une bonne coagulation. Au contraire, dans les laits dits « lents » très pauvres en calcium et dont le rapport Calcium/Azote est inférieur à 0,20 M (dans un lait normal ce rapport est égal à 0,23) ou dans les laits pasteurisés où le chauffage a insolubilisé le calcium, il est nécessaire de restaurer la charge en ions calciques par un apport de chlorure de calcium. Cet apport de calcium soluble modifie les équilibres salins vers les formes insolubles (**Ramet, 1985**).

Par ailleurs, cette phase secondaire de floculation est très sensible aux variations de température. En effet, l'augmentation de la température diminue fortement le temps d'agrégation alors qu'au-dessous de 10°C, l'agrégation des micelles de caséines même

totallement dépourvues de la partie C-terminale de la caséine κ ne se produit pas. Dans la pratique, l'augmentation de la température va jouer sur l'établissement des liaisons au sein du caillé et un accroissement significatif de la contraction du grain et de l'expulsion de sérum (Vétier *et al.*, 2003).

6. Particularités de la coagulation du lait de chèvre et de brebis

Le mécanisme de la coagulation enzymatique est commun aux laits bovins, caprins et ovins. D'une espèce à l'autre, la liaison peptidique 105-106 de la caséine κ ainsi que les séquences environnantes sont conservées. Cependant, les différences entre les laits de vache, de brebis et de chèvre, notamment en matière d'équilibres phosphocalciques et de caractéristiques micellaires font que leur comportement vis-à-vis de la présure est différent (Story *et al.* 1983 ; Remeuf *et al.* 1989 ; Pellegrini *et al.* 1994 ; Ramos et Juarez, 2003).

Ainsi, Le lait de chèvre, caractérisé par des teneurs en caséines totales plutôt faibles, des proportions relatives de caséines différentes de celles du lait de vache et des teneurs en calcium assez élevées, se distingue en transformation fromagère par un temps de coagulation relativement court et aboutit à un gel-présure moins ferme que celui obtenu avec le lait de vache. Le lait de brebis particulièrement riche en caséines et en calcium micellaire, se singularise par un temps de coagulation comparable à celui du lait de chèvre et une fermeté de gel deux fois supérieure à celle du lait de vache.

La différence de taille des micelles de caséines explique en partie les écarts de comportement à la coagulation des différents laits. Leur diamètre moyen est de 160-180 nm pour le lait de vache, 250-260 nm pour le lait de chèvre et de 193 nm pour le lait de brebis. Il est essentiellement déterminé par la quantité de caséine κ : plus elle est élevée, plus les micelles ont une taille réduite. La taille des micelles impacte essentiellement la vitesse d'agrégation, qui augmente avec le nombre de micelles. Pour une même teneur en caséines le temps de

gélification diminue, alors que la fermeté du gel essentiellement dépendante du taux de caséine α_s , n'est pas affectée (Mietton, 2015).

Le polymorphisme génétique des lactoprotéines explique, à même taux de caséine, les écarts de comportement à la coagulation des laits de vache, chèvre et de brebis. Le lait caprin et dans une moindre mesure le lait ovin, contrairement au lait bovin, diffèrent considérablement par leur contenu en caséine α_{s1} . Ces différences rendent compte des caractéristiques physico-chimiques particulières des caséines caprines (structure micellaire, équilibres salins...) et ovines et expliquent en grande partie les différences du comportement technologique des laits caprins, ovins et bovins.

Le lait de chèvre se caractérise par un polymorphisme génétique de la caséine α_{s1} qui a un effet quantitatif très marqué sur la synthèse protéique, donnant lieu à 4 classes alléliques associées à des quantités de caséine α_{s1} qualifiées de «fort», «intermédiaire», «faible» et «nul», cette dernière classe n'exprimant pas la protéine. Les chèvres porteuses d'allèles forts produisent des laits plus riches en protéines qui se traduisent par une augmentation de la fermeté des gels et des rendements fromagers. Les cinétiques de coagulation enzymatique montrent que les laits à variant fort présentent une vitesse de raffermissement et une fermeté de gel finale bien supérieures à celles des laits à variant intermédiaire et faible. D'autre part, les laits contenant le variant à forte proportion de caséine α_{s1} présentent une taille moyenne des micelles plus petite, ce qui favorise une fermeté de gel plus importante pour ces laits. En revanche, les allèles faibles donnent un goût «chèvre» un peu plus fort. Cette association entre la caséine α_{s1} et les caractéristiques organoleptiques serait liée vraisemblablement à la composition fine des acides gras associée aux différents génotypes puisque les génotypes caséine α_{s1} forts et faibles ont des profils d'acides gras différents (Remeuf, 1993 ; Barbieri *et al.*, 1995 ; Chilliard *et al.*, 2006 ; Manfredi et Ådnøy, 2012).

Chez les ovins, il existe un polymorphisme de la caséine α_{s1} qui est également associé au taux de synthèse de caséines et qui se traduit par un effet significatif sur l'aptitude du lait à la coagulation par la présure et sur la fermeté du caillé (**Lopez-Galvez *et al.*, 1993 ; Pirisi *et al.*, 1999**). Toutefois et compte tenu de la richesse du lait de brebis en caséine, les conséquences de ce polymorphisme sur le rendement fromager semblent beaucoup moins importantes comparativement au lait de chèvre (**Barbieri *et al.*, 1995**).

II- LES AGENTS COAGULANTS UTILISÉS EN FROMAGERIE

Les agents coagulants sont des enzymes protéolytiques qui interviennent, en fabrication fromagère, pour faire coaguler le lait via l'hydrolyse de la caséine κ . Elles appartiennent au groupe des protéases à aspartates ou aspartyl protéases antérieurement dénommées protéases acides (EC 3.4.23). Ce sont des endoprotéases dont le poids moléculaire est voisin de 35 kDa. Elles présentent un point isoélectrique compris entre 1.5 et 5.5. Leur pH optimum d'action se situe dans une zone acide compris entre pH 2 et 6. Leur température optimale d'action est voisine de 45°C. Ces aspartyl-protéases sont toutes inhibées par la pepstatin (**Kocabiyik et Özel, 2007**).

Du point de vue structural, **Claverie-Martín et Ega-Hernández (2007)** mentionnent que les protéases aspartiques sont constituées d'une chaîne polypeptidique avec un nombre d'acides aminés (350 à 380 résidus) possédant un pro-segment situé du côté N-terminal et constitué de 35 à 49 acides aminés qui stabilise la forme inactive de l'enzyme en bloquant l'accès du substrat à son site actif. A ce stade, les molécules sont dénuées d'activité protéolytique et sont sous forme de précurseurs inactifs connus sous le vocable « zymogènes ». L'étude de la structure tridimensionnelle par diffraction aux rayons X de plusieurs protéases a montré que leur structure tertiaire est disposée en une conformation à deux lobes homologues. Le site catalytique est localisé entre les deux lobes et contient une paire de résidus d'aspartate, un dans chaque lobe.

Les aspartyles protéases utilisées en fromagerie comme agents coagulants ont été extraites à partir de tissus animaux et végétaux, et plus récemment par fermentation de microorganismes (**Tab. II**).

Tableau II. Présure et coagulants communément utilisés, et leurs enzymes (**Harboe et al., 2010**)

Groupe	Origine	Exemples: présure et coagulants	Enzyme Active
Animal	Caillette bovine	Présure de veau, extrait de pepsine bovine	<i>chymosin A, B and C, pepsin A and gastriscin</i>
	Caillette ovine	Présure en pâte Présure d'agneau, extrait de pepsine ovine	<i>idem, plus lipase chymosine et pepsine Ovine</i>
	Caillette caprine	Présure de chevreau, Extrait de pepsine caprine	<i>chymosine et pepsine Caprine</i>
Microbien	<i>Rhizomucor miehei</i>	Coagulant Miehei	<i>Rhizomucor miehei</i> proteinase aspartique
	<i>Cryphonectria parasitica</i>	coagulant Parasitica	<i>Cryphonectria parasitica</i> apartic proteinases
FPC : chymosine produite par Fermentation	<i>Aspergillus niger</i> <i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i>	CHY-MAX TM CHY-MAX TM M Maxiren ®	Chymosine bovine B Chymosine de chameau Bovine chymosin B Chymosine bovine B
Vegetal	<i>Cynara cardunculus</i>	Fleur de chardon	Cyprosine 1, 2 et 3 / cardosine A et B

1. Les agents coagulant d'origine animale

Ce sont des extraits coagulants provenant de la muqueuse gastrique des mammifères. La principale matière première utilisée pour la préparation de ces extraits est les abomasums ou les caillettes de jeunes ruminants (veaux, chevreaux et agneaux). Celles de veaux sont les plus employées dans le monde du fait d'une grande disponibilité liée à la présence de cette espèce animale dans de nombreux pays à travers le monde. À la fin des années 1960, la diminution de l'offre liée au marché des caillettes de jeunes bovidés concomitante à l'accroissement de la

production fromagère mondiale a encouragé l'exploitation de caillettes de bovins adultes et d'estomac de porc (**Ramet, 1997**).

La caillette ou abomasum est la quatrième poche de l'estomac des ruminants, il est physiologiquement l'équivalent de l'estomac du monogastrique. La cavité abomasale comporte deux régions : la zone fundique et la zone pylorique, séparées par une constriction. Les glandes gastriques de la région fundique sont essentiellement constituées de trois types de cellules : les cellules pariétales, productrices d'acide chlorhydrique (HCl), les cellules à mucus (crypte) et les cellules principales qui produisent les zymogènes (pro-enzymes). Les glandes de la région antro-pylorique comportent également des cellules endocrines, siège de la synthèse de gastrine, hormone peptidique qui stimule la sécrétion d'HCl.

Cette sécrétion abomasale qui a la propriété de coaguler le lait est obtenu par macération de caillettes sèches découpés ou broyés dans une solution adéquate. Selon le procédé de chaque producteur, la macération dure de quelques heures à plusieurs semaines. Les extraits sont ensuite traités par floculation suivie de filtrations. Ils sont standardisés et leur pH est ajusté de façon à obtenir des préparations commerciales répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités.

En fonction de la durée de macération des caillettes, deux méthodes d'extraction sont à distinguer : la méthode dite « lente » qui est à la fois la plus ancienne et la plus traditionnelle, et la méthode dite « rapide » ou industrielle. La méthode d'extraction lente permet d'enrichir la composition de l'extrait enzymatique en acides aminés, en peptides court et en lipases qui contribuent au typage des fromages. Dans le cas de la méthode d'extraction qualifiée de rapide, couramment utilisée par les industriels, son procédé se caractérise par une étape de séparation des composants du jus brut par chromatographie sur colonne suivie d'une deuxième étape qui consiste à mélanger les fractions purifiées de nouveau dans des proportions parfaitement prédéfinies. Cette particularité permet de proposer des mélanges

adaptés à chaque demande d'utilisateur, mais dont l'environnement enzymatique communément appelé « support » est appauvri en certains sels minéraux, en peptides, polypeptides et en lipases qui confèrent à la préparation coagulante des propriétés spécifiques (**Germonville, 2003 ; Grandy, 2015**). A noter que la composition et la teneur en enzymes coagulantes des préparations enzymatiques abomasales dépend de la qualité des caillottes mise en œuvre.

Durant les 130 dernières années, parmi tous les coagulants d'origine animale, la présure de veau a été le coagulant du lait par excellence et a été à la base de tous les fromages.

1.1. La présure

La présure est l'extrait obtenu par macération des caillottes de jeunes bovidés tenus au régime du lait. Les principales présures commercialisées sont des présures uniquement à base de caillottes de veaux. Elles sont utilisées dans toutes les technologies fromagères quel que soit le type de lait. En revanche, les présures à base de caillottes de chevreaux ou d'agneaux sont généralement réservées aux technologies basées sur les laits des espèces animales concernées. La réglementation française sur les enzymes de la coagulation du lait précise que le terme de présure est réservé à la présure animale et doit provenir exclusivement d'animaux pré-ruminants tandis qu'à l'échelle européenne, une présure doit provenir de la macération de caillottes de jeunes bovidés, dont l'âge ne peut pas dépasser 8 mois en ce qui concerne les veaux (**Grandy, 2015**).

La composition de la présure renferme principalement deux enzymes différentes : d'une part la chymosine qui est majoritaire et d'autre part une proportion non négligeable de pepsine. Selon la réglementation française, le rapport de concentration de chymosine sur pepsine bovine actives dans la présure doit être supérieur ou égal à 1.38 (**Martin, 1984**).

L'évolution de la concentration en chymosine et en pepsine est fonction de l'âge de l'animal et de son régime alimentaire. Le taux de chymosine est maximal à la naissance. Dès le troisième mois le taux de pepsine augmente et croît continuellement pour se substituer en grande partie à la chymosine à l'âge adulte. A environ 8 mois, alors que l'animal consomme à la fois du lait et du fourrage et que ce dernier devient majoritaire, les quantités en chymosine et en pepsine s'inversent. Le taux de pepsine s'accroît de façon progressive pour atteindre son maximum vers 13-14 mois. Le retour à une alimentation lactée chez des veaux récemment sevrés conduisait à une reprise de la sécrétion de chymosine (**Andrèn, 2002 ; Grandy, 2015**).

La chymosine (EC 3.4.23.4), principale enzyme de coagulation du lait présente dans la présure, hydrolyse spécifiquement la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caséine κ , mais aussi de nombreuses liaisons de la caséine β et α_{s1} notamment la liaison Phe₂₃-Phe₂₄ (**Carles et Ribadeau-Dumas, 1984**).

Cette enzyme est sécrétée sous forme de pro-enzyme inactive appelée pro-chymosine (365 acides aminés, 40.5 kDa) puis activée par l'acidité stomacale en chymosine (323 amino acids, 35.6 kDa) par hydrolyse de l'extrémité N-terminale de la molécule. Trois iso-enzymes (isoforms) A, B et C ont été identifiées pour la chymosine. Les isoformes A et B diffèrent au niveau de leur séquence par un seul résidu d'acide aminé à la position 244 ; le zymogène A possède un résidu d'acide aspartique, contre un résidu glycine pour le zymogène B. L'iso-enzyme B est la forme la plus abondante et la plus stable, alors que la chymosine C n'est que le produit de dégradation de la forme A (**Foltmann et al., 1977 ; Donnelly et al., 1986 ; Rampilli et al., 2005**).

L'activité protéolytique de la chymosine est fortement influencée par les facteurs du milieu en particulier le pH. Son maximum d'activité sur la caséine κ est aux pH 5.3- 5.5 (**Fox, 2003 ; Kageyama, 2002**). L'étude de la spécificité d'action de la chymosine en fonction du pH a

montré que sur les douze liaisons qui sont sensibles à l'action de la chymosine à pH 5.2, sept seulement le demeurent à pH 6.5 (**McSweeney et al., 1993**).

Il convient de noter que les travaux de **Foltmann (1987)** et par la suite ceux de **Houen et al. (1996)** ont montré que la chymosine était présente dans l'estomac du porc alors qu'on la croyait spécifique aux ruminants. La chymosine semble donc, être présente chez tous les jeunes mammifères, qui reçoivent des immunoglobulines via le lait de leurs mères. À ces fins, ils ont besoin d'une enzyme possédant une faible activité protéolytique qui ne dégrade pas les immunoglobulines présentes dans le lait (**Harboe et al., 2015**).

La pepsine (EC 3.4.23.1) est le constituant mineur de la présure et dont la sécrétion ne devient prépondérante qu'après le sevrage. Elle est synthétisée sous forme de pré-pepsinogène de 386 résidus d'acides aminés dont les 15 premiers résidus N-terminaux correspondent au peptide signal. Les 45 résidus suivants constituent le peptide d'activation dont le clivage produit la forme active de l'enzyme : la pepsine A bovine qui comporte 326 résidus d'acides aminés. Le pepsinogène et la prochymosine présentent des caractéristiques communes au niveau de leur structure (55 % d'identité avec la séquence de la chymosine) et de leur mécanisme d'activation (Kageyama, 2002).

La pepsine A bovine se présente sous de multiples formes qui sont structurellement identiques et qui se différencient uniquement par leur teneur en résidus phosphate. Cinq iso-formes présentant de 0 à 3 groupements phosphates par molécule ont été décrits, chacune d'entre elles possédant des propriétés enzymatiques et des stabilités différentes. Les proportions relatives de ces iso-formes varient en fonction de l'âge de l'animal. Les formes présentant le plus haut degré de phosphorylation (2 à 3 résidus de phosphate par molécule) deviennent majoritaires chez l'animal adulte. (**Martin, 1984 ; Martin et Corre, 1984 ; Rampilli et al., 2005**). La présence de ces groupements phosphates et la densité de charges négatives qu'ils

procurent semblent s'accompagner d'un accroissement de la stabilité de la pepsine A bovine, à pH acide (**Martin, 1984**). Comparativement à la chymosine, la pepsine est moins efficace vis-à-vis de la caséine κ . Ceci est vraisemblablement lié à l'effet de la phosphorylation de la pepsine A à travers les répulsions électrostatiques entre les charges négatives présentes respectivement au voisinage du site actif de la pepsine et sur la partie C-terminale de la caséine κ .

L'activité enzymatique optimale de la pepsine se situe entre le pH 2 et 5 (selon la nature du substrat utilisé) et montre un caractère légèrement plus protéolytique (**Kageyama, 2002**). Par ces deux propriétés la pepsine bovine, en faible quantité dans la présure de veau, joue un rôle dans l'hydrolyse des caséines et par conséquent influe sur les caractéristiques gustatives finales du fromage. Cette influence est dépendante du rapport chymosine/pepsine. (**Collin, 2015**).

Le principal apport animal dans l'approvisionnement en présure n'exclut pas l'usage d'autres sources autre que le veau. Dans les pays du pourtour méditerranéen, ce sont les caillottes de chevreaux qui prédominent du fait de la présence en grand nombre de chèvres, et il en est de même pour les brebis. Cet état de fait est lié aux conditions climatiques plutôt chaudes et propices à l'élevage des petits ruminants rustiques notamment le caprin. En pratique, la présure de veaux est utilisée dans toutes les technologies fromagères quel que soit le type de lait. Par contre, les présures à base de caillottes de chevreaux ou d'agneaux sont réservées aux technologies utilisant les laits des espèces animales concernées, en particulier les fromages AOP et fabriqués exclusivement avec du lait de chèvre ou de brebis (**Addis et al, 2008 ; Granday, 2015**). Cette présure dite artisanale provient de caillottes de chevreaux ou d'agneaux alimentés uniquement avec du lait et abattus après l'allaitement. De fait, ce type de présure diffère significativement de la présure de veau par son spectre enzymatique complexe. Outre la chymosine et la pepsine, elle contient des enzymes lipolytiques (**Tab.III**) qui

hydrolysent la matière grasse du lait induisant la formation d'acides gras libres (**Bustamante et al., 2000; Virto et al., 2003**). Cette particularité de la présure de chevreaux ou d'agneaux est à l'origine des saveurs piquantes donnant au fromage un caractère original typé. Il en résulte une gamme de produits fromagers AOP dans de nombreuses régions du Sud de l'Europe : Le Pecorino Siciliano (fromage à pâte dure au lait de brebis cru), le Pecorino Romano (fromage à pâte pressée cuite au lait de brebis entier) et du Fiore Sardo (fromage à pâte dure non cuite au lait de brebis de la race Sarde) en Italie (**Mucchetti et al., 2009**). Le Majorero, (fromage de chèvre à pâte pressée), Roncal (fromage au lait de brebis de races Lacha), Idiazabal (fromage à pâte pressée non cuite au lait de brebis des races Latxa et Carranzana) et le Cabrales (fromage à pâte persillée au lait de vache ou mélange de deux ou trois sortes de lait (vache, brebis et chèvre) en Espagne (**Bustamante et al., 2003**). Le Feta (fromage caillé en saumure produit à partir de lait de chèvre ou de brebis) et Kefalotyri en Grèce (**Anifantakis et Kandarakis, 1983**)

Tableau III. Caractéristiques biochimiques des enzymes lipolytiques de la présure animale (**Harboe et al., 2010**)

Enzymes	Poids moléculaire (kDa)	pH optimal d'activité	Température optimale d'activité (°C)	Espèce animale
Pré gastriques	49 – 172	5.3 – 7.5	30 – 40	Veau
	168	5.5 – 8.6	30 – 40	Chevreau
	150	5.9 – 6.6	30 – 40	Agneau
Gastriques	/	7	45	Veau

1.2. L'extrait de pepsine bovine

L'extrait de pepsine bovine est obtenu à partir de caillettes de bovidés adultes. Il contient, majoritairement, de la pepsine et une faible quantité de chymosine. Selon la réglementation française, l'extrait de pepsine bovine doit contenir un ratio de concentration chymosine sur pepsine égal ou inférieur à 0.154, ce qui correspond à une activité pepsine bovine supérieur à 75%.

L'activité coagulante de la pepsine bovine est sensiblement inférieure à celle de la présure, et par conséquent, dans les conditions de la technologie fromagère et selon le type de fabrication (type pâte pressée cuite au lait de vache), il est nécessaire d'utiliser une quantité d'extrait de pepsine bovine quatre fois plus élevée pour obtenir un temps de coagulation comparable à celui obtenu avec la présure de veau (**Martin, 1984**). Par ailleurs, l'extrait de pepsine bovine a montré une meilleure affinité pour coaguler particulièrement le lait de dromadaire par rapport à la présure de veau et à la chymosine. Les essais de coagulation réalisés par **Ramet (1993)** ont montré que le temps de floculation était 5 fois plus court dans le lait de dromadaire comparativement à celui enregistré dans le cas du lait de vache en présence de pepsine bovine.

L'extrait de pepsine bovine commercialisé est utilisé généralement, en mélange avec la présure (mélange 2/2 ou 3/1) dans certaines fabrications de fromages de pâtes molles et de pâtes pressées en France. Il est, par ailleurs, employé en mélange avec l'enzyme de *Rhizomucor miehe* dans la technologie des pâtes pressées en Europe de l'Est. Actuellement en France, elle est préférablement employée par les présuriers, pour standardiser le ratio chymosine/pepsine de leurs présures tout en respectant les valeurs de ratio permises (**Grandy, 2015**).

1.3. La pepsine porcine

La pepsine porcine (EC 3.4.23.2) est extraite de la muqueuse stomacale du porc sous forme inactive et elle est activée à pH 2. Elle est formée d'une seule chaîne polypeptidique composée de 326 résidus d'acides aminés. Son poids moléculaire est de 34.5 kDa et son pH isoélectrique est de 3.10 (**Ernstrom, 1983**). Quatre formes de pepsinogènes sont dénombrées actuellement et désignées pepsinogènes A, B, C et D. Le plus important étant le pepsinogène A purifié par **Foltmann et al., (1992)**. Le pepsinogène B a une homologie en acides aminés

de 40 % avec le pepsinogène A et 51 % avec la chymosine. Il est caractérisé par une faible activité protéolytique vis-à-vis de l'hémoglobine comparativement avec la pepsine A.

La pepsine porcine est employée de par le monde mais d'une manière distincte. Le principal inconvénient est que son activité coagulante est fortement dépendante du pH. Aux valeurs de pH voisin de 6,5 et à une température voisine de 30°C, utilisées couramment en fromagerie, la pepsine porcine est partiellement dénaturée. Dans ces conditions, elle perd plus de la moitié de son activité (**Andrèn, 2002**). Pour y remédier, elle est habituellement associée à la présure en mélange (50/50) dans la production d'importants fromages aux Etats-Unis et au Canada. En Bosnie, cette enzyme est utilisée pour la fabrication du fromage blanc de Bosnie. Tandis qu'en France son emploi n'est pas autorisé.

2. Les coagulants d'origine microbienne

Ce sont des protéases d'origine fongique issus principalement de trois genres de moisissures : *Rhizomucor miehei* (moisissure thermophile du sol chaud et humide), *Rhizomucor pusillus* (moisissure mésophile du sol) et *Endothia parasitica* (désormais dénommée *Cryphonectria parasitica*, moisissure parasite du châtaignier). Leurs extraits coagulants ont des spécificités d'action (pH, température, doses) et sont caractérisés par une activité protéolytique marquée (**Goursaud, 1999**).

La production industrielle se fait en milieu liquide (milieu semi-solide pour *R.pusillus*) submergé dans un fermenteur. Le microorganisme est introduit en pleine croissance. Les enzymes extracellulaires libérées dans le milieu sont récupérées par filtration et/ou centrifugation. Le filtrat concentré subit une filtration stérilisante puis un conditionnement sous forme liquide ou séché en micro-granulés après standardisation à un niveau d'activité commerciale (**Germonville, 2003**).

La protéase aspartique de *R. miehei* se présente sous forme d'une seule chaîne polypeptidique dont la structure tridimensionnelle ressemble considérablement à celle de la chymosine (**Chitpinyol et Crabbe, 1998**). Cette protéase a un poids moléculaire de 40.5 kDa, une activité coagulante optimale à pH 5.6 (**Preetha et Boopathy, 1997**). Toutefois, cette enzyme montre une thermostabilité plus grande qui affecte la vitesse de protéolyse dans les fromages au cours de la maturation. Actuellement, ce coagulant fongique est produit à partir d'une souche modifiée génétiquement (par un traitement spécifique de sensibilisation thermique) qui montre une thermostabilité meilleure, une sensibilité au pH plus grande et une protéolyse légèrement moins importante. Sous cette forme, cette enzyme répond mieux aux besoins des fromagers. Certaines fabrications de pâtes pressées cuites nécessitent une variante du même coagulant fortement thermolabile avec une sensibilité au pH accrue et une protéolyse sensiblement réduite très proche de celle de la présure. Sous ces différentes formes de thermosensibilité et de pureté, c'est le coagulant le plus commercialisé. En revanche, la commercialisation du coagulant issu de *R. pusillus* a diminué en de sa grande similitude avec son homologue *R. miehei*.

L'extrait coagulant de *Cryphonectria parasitica* contient une enzyme thermolabile, qui hydrolyse plutôt la liaison Ser₁₀₄-Phe₁₀₅ de la caséine κ . Elle est caractérisée par son action protéolytique plus prononcée et sa moindre sensibilité aux variations de pH. Ces propriétés font que ce coagulant fongique est préférentiellement, utilisé dans la fabrication de fromages à pâte cuite type Emmental.

Bien que l'action de ces trois protéases fongiques sur les caséines α_s et β soit considérablement différente de celle de la chymosine, elles permettent d'obtenir des fromages de qualité acceptable. L'utilisation des protéases fongiques était largement répandue aux USA avant l'introduction de la chymosine fermentaire

3. La chymosine produite par fermentation (FPC)

La chymosine produite par fermentation (chymosine fermentaire ou recombinante) a été introduite pour la première fois sur le marché en 1990. Elle représente actuellement plus de 50 % des enzymes coagulantes utilisées en fromagerie. Elle est produite par fermentation d'un micro-organisme hôte qui a été modifié de façon à ce qu'il exprime le gène de la chymosine bovine (A ou B). Trois hôtes différents sont utilisés pour la production de la chymosine à savoir : la bactérie *Escherichia coli* (Pfizer), la levure *Kluyveromyces lactis* (Gist-brocades) et le champignon *Aspergillus niger* var. *awamori* (Hansens). Le choix de la chymosine B au détriment de la chymosine A (qui a pourtant une activité supérieure de 25% par rapport à la chymosine B) se justifie par sa plus grande stabilité. La chymosine A est, en effet, relativement instable et se dégrade par autolyse à bas pH (nécessaire pour l'activation de la prochymosine) et à des teneurs élevées en NaCl, indispensable à l'extraction et la conservation des préparations (**Grandy, 2015**).

Les processus de production de la chymosine fermentaire varient en fonction de l'organisme hôte utilisé et du fabricant. Pour toutes les FPC, on utilise habituellement une souche hôte non pathogène et non toxique ; de plus, on utilise des matières premières de qualité alimentaire comme milieu pour la fermentation. Le procédé de production de cette chymosine nécessite après fermentation, un traitement acide pour détruire les cellules, l'ADN et l'ARN microbiens résiduels, et activer le zymogène inactif (prochymosine). Une étape de purification par chromatographie est réalisée après la séparation physique des cellules pour éliminer toute trace d'une éventuelle activité secondaire. La chymosine purifiée est formulée avec du chlorure de sodium et finalement standardisée à la force désirée en Unité Internationale de coagulation du lait (International Milk-Clotting Units : IMCU/ml) (**Harboe et al., 2015**).

La chymosine fermentaire est identique en poids moléculaire, séquence d'acides aminés, et profil chromatographique à la chymosine de veau. Les études portant sur la production

fromagère ont montré que le rendement et la qualité des fromages sont les mêmes que ceux obtenus avec la chymosine de veau. Par ailleurs, la chymosine recombinante est pratiquement impossible à distinguer de la chymosine présente dans la présure naturelle et par conséquent le mélange de la FPC avec les autres agents de coagulation du lait est légalement interdit (**Barbano et Rasmussen, 1992 ; Broom et al., 2006**).

En 2008, la chymosine cameline produite par fermentation est introduite dans le marché. Elle possède de remarquables propriétés coagulantes pour le lait de chamelle mais également pour le lait de vache, lait pour lequel elle se révèle même supérieure à la chymosine bovine, longtemps considérée comme l'enzyme de référence. La chymosine cameline a une activité spécifique, exprimée en IMCU/mg, deux fois supérieure sur le lait de vache, comparée à la chymosine de veau. La FPC cameline montre un pouvoir gélifiant supérieur à la présure de veau. À activité coagulante identique moins de 25% de FPC cameline est nécessaire pour obtenir des temps de prise et de raffermissement du caillé identique à ceux obtenus avec la FPC bovine. La FPC cameline catalyse de manière très spécifique l'hydrolyse des caséines ce qui permet d'obtenir des rendements fromagers élevés sans engendrer des défauts organoleptiques. La comparaison de la chymosine de chameau avec celle de veau au cours de plusieurs tests de fabrication de fromage puis de dégustation a montré que l'emploi de la chymosine de chameau diminue la sensation d'amertume défavorable. Il a été également démontré que la caséine β , qui est responsable de l'amertume, était moins dégradée par la chymosine de chameau (**Kappeler et al., 2006 ; Bansal et al., 2009 ; Harboe et al., 2015**). Si l'on se réfère au ratio C/P (L'activité coagulante (C) à pH 6.5, exprimée en IMCU/ml sur l'activité protéolytique moyenne (P) mesurée sur un substrat d'azocaséine au même pH), la chymosine cameline est cinq fois plus spécifique que la chymosine de veau. Signalons par ailleurs, que plus le ratio C/P est élevé, plus l'enzyme est spécifique.

Avec l'arrivée sur le marché des coagulants obtenus par fermentation, l'utilisation de présure animale a décliné au cours des années. 20% de la production mondiale de fromages utilisent encore la présure animale destinée particulièrement au segment des fromages AOP/AOC, tel que le fromage italien « Parmigiano Reggiano » et le fromage français « le Comté », dont les cahiers de charge mentionnent l'obligation de l'utilisation de présure animale. Par ailleurs, Il convient de signaler que l'introduction de la FPC cameline a permis de contester le postulat selon lequel la chymosine bovine constitue la référence en termes d'efficacité coagulante du lait bovin, ouvrant ainsi la voie à de nouveaux coagulants et à de nouvelles pistes de recherche (Harboe *et al.*, 2015).

4. Les coagulants d'origine végétale

Ce sont des extraits aqueux obtenus à partir des différentes parties (fleurs, feuilles, tige) de plantes supérieures. La fleur de *Cynara cardunculus*, plante de la famille des Astéracées comme l'artichaut, est la plus fréquemment citée comme source potentielle de coagulant végétal. Verissimo *et al.* (1996) étaient parvenus à préparer l'extrait coagulant de la fleur de *Cynara cardunculus* et à le caractériser. Il est composé de deux protéases nommées cardosine A et cardosine B. La structure de ces protéases se présente sous forme de deux chaînes polypeptidiques renfermant une grosse sous-unité (31 à 34 kDa) et une petite sous-unité (15 à 14 kDa, respectivement). Ces deux cardosines sont semblables respectivement de par leur spécificité et leur activité à la chymosine et à la pepsine. Elles hydrolysent la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caséine κ qui entraîne la coagulation du lait mais, elles diffèrent par leur activité protéolytique. La cardosine B exprime une activité protéolytique plus intense envers la caséine que la cardosine A qui montrent un maximum d'activité à pH 5.

L'utilisation de ce coagulant reste toutefois restreinte, si on la compare avec l'utilisation des coagulants d'origines microbienne et animale. Elle se limite à certaines régions

géographiques, dans la péninsule Ibérique, où le coagulant issu de *Cynara cundunculus* est utilisé pour la fabrication de fromages traditionnels. Il est particulièrement utilisé au Portugal dans la fabrication d'un fromage AOC, le « Serra da Estrela » un fromage à pâte molle fabriqué à partir de lait de brebis (**Grandy, 2015**).

L'usage limité des coagulants végétaux est souvent attribué aux défauts de texture et d'amertume qu'ils engendrent dans les produits fromagers largement commercialisés. La production industrielle des extraits coagulants végétaux se heurte à la variabilité de concentration de ces enzymes dans le fragment végétal utilisé et qui est tributaire des conditions de culture : le climat, la nature du sol et l'âge de la plante.

En conclusion, chaque coagulant commercial possède des caractéristiques enzymatiques et physico-chimiques propres. Certains d'entre eux peuvent être utilisés pour tous types de fromages, d'autres sont plus spécialement réservés à certains types de fabrications. Selon le type de fromage, pâte molle, pâte pressée et pâte pressée cuite, le fromager devra choisir l'enzyme la mieux adaptée techniquement et réglementairement à son procédé de fabrication tout en prenant en considération les impératifs économiques.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Origine de la matière première

Le coproduit d'abattage « abomasum ou caillette » est prélevé sur la chaîne de découpe des moutons abattus à l'âge adulte (> 6 mois), au niveau de l'abattoir d'El-Harrach. Les caillettes ovines sont acheminées rapidement au laboratoire dans une glacière pour éviter la dégradation et la putréfaction de la matière protéique.

Les caillettes sont vidées, partiellement dégraissés, lavées légèrement à l'eau courante à faible jet, puis débarrassées de leurs parties pyloriques. Elles sont broyées pour les réduire à l'état de pâte à l'aide d'un hachoir, puis stockées après homogénéisation dans des récipients au congélateur à -20 °C, jusqu'à utilisation.

2. Enzyme coagulante

La chymosine fermentaire commerciale CHY-MAX[®] Powder Plus NB (Chr.Hansen, Denmark) est utilisée comme enzyme de référence lors de cette étude. Cette préparation est fournie sous forme de poudre lyophilisée 100% pure chymosine. Elle est produite par fermentation en milieu végétal submergé avec *Aspergillus niger var. awamori*, et présente une activité de 1400 IMCU/g.

Afin de travailler avec le même lot de chymosine durant toute la série d'expériences, celle-ci est diluée au 1/100^e dans de l'eau distillée, répartie par fractions de 5 ml puis congelée à -20°C.

3. Processus d'obtention de la pepsine ovine purifiée

La préparation de l'extrait enzymatique de pepsine ovine fait intervenir deux étapes unitaires. Dans cette partie, on expose l'enchaînement de ces étapes, leurs conditions opératoires ainsi que les techniques utilisées.

3.1. Préparation de l'extrait brut de pepsine ovine

3.1.1. Choix du procédé d'obtention de l'extrait de pepsine ovine

Les procédés d'obtention des préparations coagulantes sont nombreux. Ils diffèrent selon le mode d'extraction caractérisé par la solution de macération.

Trois méthodes sont employées dans cette étude :

- Macération dans une eau additionnée de benzoate à 1% (**O'Leary et Fox, 1975**) ;
- Macération dans une solution d'eau salée à 6-10% (**Anifantakis et Green, 1980 ; Goursaud, 1999**) ;
- Macération dans une eau acidifiée à 0,2 M de HCl (**Valles et Furet, 1977**).

Le principe de l'extraction consiste à macérer un poids de caillettes broyées dans un poids égal d'une solution d'extraction (w/w), pendant 1 heure à une température de 25°C. Le jus d'extraction est séparé de la masse biologique (débris de caillettes) par filtration et/ou une centrifugation. L'activation du pepsinogène (forme inactive de la pepsine) contenu dans le jus brut est réalisée par abaissement du pH à 2 à l'aide de l'acide chlorhydrique, puis neutralisation par ajustement du pH à 5.8-6.0 par l'emploi de phosphate di-sodique. La clarification du jus obtenu est réalisée par addition de 1% (v/v) d'une solution de sulfate d'aluminium 1M et 5% (v/v) d'une solution de sulfate di-sodique 1M. Les matières protéiques en suspension dans cet extrait précipitent en formant une boue organique qui est séparé du surnageant par filtration.

La méthode donnant le meilleur rendement d'extraction de l'activité coagulante sera préconisée pour la suite de l'étude.

Le rendement d'extraction (Rt) est défini par la quantité d'enzyme récupérée à partir d'un poids donné de matière première mise en œuvre. Il est exprimé en unité d'activité coagulante pour 1g de caillette (**Valle et Furet, 1977**).

3.1.2. Optimisation des conditions d'extraction

La méthode de **Valle et Furet (1977)** basée sur une macération en milieu acide est retenue comme méthode de référence pour obtenir l'extrait enzymatique brut. Les conditions optimales d'extraction ont été recherchées en considérant l'influence de différents paramètres sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut et sur le rendement d'extraction du procédé.

Les paramètres concernés par l'optimisation sont :

- La quantité de caillette mise en œuvre : l'influence de ce paramètre sur le rendement d'extraction de l'activité coagulante a été déterminée en variant le poids de caillette utilisé de 5g à 120g.
- La concentration en HCl de la solution extractive : la concentration en HCl optimale d'extraction est déterminée en variant la concentration du HCl des solutions extractives de 0,1M à 0,6M.
- La température et de la durée de macération : l'influence de la température et de la durée de macération sur l'activité coagulante et le rendement d'extraction est déterminée en portant les macérations acides à des températures variables de 25°C à 40°C, pendant des temps allant de 2h à 96h.
- **Effets de la clarification** : optimisation des différents paramètres cités en dessus, l'effet de la clarification sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut était vérifié, en comparant à un témoin non clarifié.

3.2. *Purification de la pepsine ovine*

L'extrait coagulant brut de pepsine ovine obtenu selon les conditions optimisées (Slamani et Bellal, 2015) est purifié selon un protocole classique faisant intervenir deux techniques de

chromatographie sur colonnes : une échangeuse d'ions suivie d'une filtration sur gel (O'Leary et Fox, 1975).

Les protéines sont détectées tout au long du processus de purification par mesure de leur absorbance à 280 nm.

3.2.1. Chromatographie d'échange ionique

Cette technique chromatographique permet de séparer les protéines en fonction de leur différence de charge à un pH donné.

L'extrait enzymatique lyophilisé, dissous dans un minimum de tampon phosphate de sodium (0,02 M, pH 6), est déposé en haut d'une colonne contenant le gel de DEAE-cellulose (20 x 2.5 cm) préalablement équilibré avec le même tampon. Le débit d'élution est fixé et maintenu constant à 80 ml/h et des fractions de 5 ml sont collectées.

Lorsque l'absorbance de l'éluât à 280 nm est revenu au niveau basal, Les particules fixées sur le gel sont éluées en utilisant un gradient croissant de NaCl de 0.3 M à 0.6 M dans le tampon phosphate à pH 6 (conditions optimales obtenues après plusieurs essais). Les fractions douées d'activité coagulante sont rassemblées et concentrées par un concentrateur centrifuge sous vide.

3.2.2. Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion ou gel-filtration est une technique de purification qui permet de séparer les protéines en fonction de leur taille.

Les fractions protéiques concentrées, précédemment obtenues, sont éluées à travers une colonne de gel Sephadex G-100 (50 x 1.5 cm) équilibrée avec du tampon phosphate 0.02 M, pH 6. Le débit d'élution est fixé et maintenu à 10 ml/h, et des fractions de 2 ml sont collectées. Les fractions les présentant une activité coagulante sont rassemblées, dialysées et concentrées.

Après chaque étape de purification, l'activité coagulante et la quantité totale de protéines de l'extrait enzymatique ont été déterminées afin d'évaluer le rendement et le facteur de purification.

3.2.3. Electrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'évaluation de la l'homogénéité de la pepsine ovine purifiée et l'estimation de sa masse moléculaire a été réalisée par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) sur gel d'acrylamide à 12% (**Laemmli, 1970**).

Après chaque séparation chromatographique, les fractions douées d'activité sont solubilisées dans une solution chauffée à 100°C, tamponnée au pH 6,8 par du Tris-HCl et contenant du sodium dodécyl sulfate (SDS) et du β -mercaptoéthanol. La migration est réalisée dans un système d'électrophorèse discontinu (Mini Protean III, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) constitué de deux gels de polyacrylamide de porosité différente et tamponnés à des pH différents. Les gels sont coulés et polymérisés dans un système vertical « en sandwich » entre 2 plaques de verre. Les échantillons déposés au-dessus du gel de concentration à 4% (stacking gel) tamponné au pH 6,8 par du Tris-HCl sont concentrés puis séparés suivant leur taille dans le gel de séparation à 12%. (Running-gel) tamponné à pH 8,8. Une fois l'électrophorèse effectuée, les différentes protéines présentes sur le gel sont révélées par coloration au bleu de Coomassie R-250.

4. Caractérisation de l'extrait enzymatique de pepsine ovine purifiée

4.1. Détermination de l'activité coagulante (AC)

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique est mesurée par la méthode de **Berridge (1952)**, utilisant un lait reconstitué standard (substrat de Berridge).

Le substrat standard est un lait en poudre reconstitué avec une solution de chlorure de calcium, à raison de 12 g de poudre de lait écrémé de type basse température, solubilisés à

l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 min, dans 100 ml de solution de CaCl₂, 0,01 M. Ce substrat dont le pH est ajusté à 6.5, est placé dans un bain-marie régulé à 30 °C pendant 30 min avant les mesures.

Le principe de la mesure repose sur la détermination, à 32 °C, du temps de coagulation qui est l'intervalle séparant l'ajout de 1 ml d'extrait enzymatique à 10 ml de lait et l'apparition des premiers flocons de caillé de lait sur la paroi du tube mis en rotation.

Une unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour former un caillé en 10 min dans les conditions décrites précédemment. L'activité coagulante est exprimée en IMCU/ml.

4.2. Détermination de la concentration en protéines

La quantité totale de protéines des extraits enzymatiques (fractions brute et purifiées obtenues après chaque étape de purification), est estimée par la méthode de **Lowry *et al.* (1951)**.

Cette mesure permet de calculer l'activité spécifique, c'est-à-dire le rapport de l'activité coagulante par la quantité totale de protéine présente dans la préparation enzymatique. Elle est exprimée en IMCU/mg de protéines.

4.3. Facteurs affectant l'activité de l'extrait de pepsine ovine

Un coagulant de remplacement doit être stable et actif dans les conditions physico-chimiques des laits habituellement transformés en fromagerie. Pour cette raison, l'influence de ces facteurs (teneur en calcium, température, pH) sur l'activité coagulante des deux protéases (pepsine ovine et chymosine) a été comparée. Chaque paramètre est étudié indépendamment et les résultats sont exprimés en activité résiduelle, calculée en pourcentage par rapport à l'activité maximale.

Les extraits de pepsine ovine purifiée et de chymosine sont dilués 10 min avant leur emploi dans de l'eau distillée à partir des solutions stocks préalablement décongelées. La

concentration de chaque enzyme est telle que la coagulation de 10 ml de substrat de Berridge (0.01 M de CaCl₂, pH 6.5) à la température de 32 °C a lieu après environ 10 min.

4.3.1. pH

Les essais sont réalisés sur le substrat standard de Berridge (0,01 M CaCl₂) à 32 °C dans la gamme de pH comprise entre 5,7 et 7. Le pH final du substrat est ajusté lors de la reconstitution, par une solution d'acide chlorhydrique ou de soude (1 M).

4.3.2. Température

Pour chaque essai, le substrat standard (0,01 M CaCl₂, pH 6.5) est maintenu à différentes températures avant emprésurage. La gamme de températures testées est comprise entre 25 et 60 °C. Après exposition, l'activité coagulante est mesurée dans les conditions standardisées.

4.3.3. Teneur en calcium

La coagulation est suivie à la température de 32° C, sur le substrat de Berridge additionné de doses croissantes de CaCl₂ (0 – 0.05 M). Le pH est ajusté à 6.5 par addition de NaOH 0.1 M.

5. Évaluation de l'aptitude à la coagulation de l'extrait de pepsine ovine

L'évaluation des propriétés coagulantes de la pepsine ovine comparativement à la chymosine a été appréhendée sur la base de deux approches : une approche rhéologique à travers le suivi de la cinétique de coagulation du lait sous l'action de la pepsine ovine ; et une approche biochimique par l'étude de la protéolyse du substrat spécifique du lait « caséines ».

5.1. Analyse du comportement rhéologique des gels obtenus par les laits emprésurés avec la pepsine ovine

5.1.1. Origine et prélèvement des échantillons de laits

Les échantillons de lait de vache, de brebis et de chèvre de petit mélange de la traite manuelle du matin d'animaux en début de lactation, ont été collectés auprès de la station expérimentale

de l'Institut Technique de l'Élevage (ITELV de Baba Ali, Alger). Les prélèvements ont été effectués trois fois par mois sur une période Janvier-Février-Mars de l'année 2017. Ils sont transportés immédiatement dans une glacière au Laboratoire Central de la Laiterie Fromagerie de Boudouaou (LFB) pour analyse.

Chaque échantillon d'environ 1l de lait a été fractionné en 2 ; Une partie est destinée à la détermination des caractéristiques physico-chimiques, et l'autre partie est réservée au suivi de la cinétique de coagulation.

5.1.2. Détermination de la composition chimique des échantillons de lait

5.1.2.1. *Analyses physico-chimiques du lait*

Les analyses élémentaires faites sur le lait dès l'arrivée des échantillons au laboratoire (moins d'une heure après le prélèvement) ont été réalisées selon les protocoles des méthodes normalisées décrites par AFNOR (1980)

- Le pH du lait a été mesuré à l'aide d'un pH mètre ;
- L'acidité du lait a été déterminée par titration à la soude (N/9) en présence de phénophtaléine et est exprimée en degrés Dornic ;
- La densité du lait était déterminée au moyen d'un thermo-lactodensimètre ;
- La teneur du lait en matières grasses (Taux Butyreux, TB) a été déterminée par la méthode acido-butyrométrique de Gerber, qui consiste en une attaque du lait par l'acide sulfurique et séparation par centrifugation en présence d'alcool iso-amylque de la matière grasse libérée ;
- La teneur en matière sèche est estimée par évaporation à 102 °C jusqu'à poids constant.

5.1.2.2. *Composition chimique du lait*

Les dosages de protéines, de caséines et de protéines sériques ainsi que les différentes formes de calcium (Ca total, Ca soluble) et de phosphore inorganique (Pi total et Pi soluble) ont été effectués dans les conditions décrites par **Remeuf *et al.* (1989)**.

- La teneur en azote total (AT), en azote soluble (AS) et en azote non protéique (ANP) a été déterminée par la méthode Kjeldahl (AFNOR, 1980) dont le principe consiste à transformer l'azote organique contenu dans l'échantillon en azote minéral (ammoniac), par minéralisation à 400 °C des échantillons, suivi d'une distillation à la vapeur. Les différentes fractions azotées étaient préparées selon le protocole préconisé par **Rowland (1938)**. Les teneurs en protéines et caséines, exprimées en g de protéines par litre de lait, sont calculées à partir des valeurs en azote protéique (AT-ANP) et azote caséique (AT-AS) corrigées par le facteur de conversion 6,38 ;
- La teneur en phosphore total et soluble a été déterminée à l'aide d'une méthode colorimétrique basée sur la formation, en milieu acide, d'un complexe coloré de phospho-molybdate d'ammonium. La DO est mesuré à 630 nm. Une gamme étalon a été établie avec une solution de dihydrogenophosphate de potassium (KH_2PO_4) contenant 1g de phosphore /l (solution 1000 ppm)
- Le calcium a été dosé par photomètre à flamme. Sa fraction totale (CaT) était déterminée sur le lait et sa fraction soluble (CaS) sur le filtrat (sérum) obtenu de l'action du TCA (12%) sur le lait. Une gamme étalon a été établie avec une solution de CaCl_2 contenant 1g Ca/ L de solution.

5.1.3. Suivi de la cinétique de coagulation

Les cinétiques de coagulation enzymatique ont été suivies pendant 60 minutes à 32 °C en utilisant un Gelograph (Gel Instrument, Suisse) selon la méthode proposée par **Nàjera *et al.* (2003)**.

Cet appareil est muni d'une sonde constituée d'une lame métallique rectangulaire, qui est immergée dans le lait. Elle est animée d'un mouvement pendulaire de très faible amplitude donnant naissance à une tension induite qui est fonction de la résistance du milieu (lait). Le signal obtenu est amplifié puis envoyé sur un millivoltmètre. La fermeté du gel au cours de la coagulation est exprimée en Gel-Unité (GU) qui est une unité arbitraire (1 mG = 1mPa.s à 25°C).

Les analyses sont réalisées en double. Au début de chaque analyse, l'activité coagulante de la pepsine et de la chymosine a été standardisée à une dilution finale permettant d'obtenir un temps de coagulation de 10 min sur le substrat de Berridge.

La coagulation enzymatique est réalisée sur 50 ml de lait ajusté à pH 6.5 (par addition d'acide lactique 1 M), placé dans un tube à essai maintenu à 32°C dans un bain marie thermostaté, et emprésuré avec de 2 ml d'extrait de pepsine ovine (ou de chymosine).

A partir de la courbe du suivi rhéologique de la coagulation, sont calculés les paramètres suivants :

- le temps de coagulation (CT) : laps de temps s'écoulant entre l'emprésurage et le début du raffermissement. Il est exprimé en secondes ;
- la vitesse de gélification ou de raffermissement du gel (GRF) : le rapport entre la différence de fermeté enregistrée entre le temps de tranchage (deux fois le temps de coagulation) et le temps de coagulation sur la différence de temps entre ces deux points. elle exprimée en GU/s ;

- la fermeté maximale du gel (A_{max}) : l'ordonnée maximale de la courbe exprimée en GU.

5.2. Test d'estimation du rendement fromager

Ce test est réalisé par centrifugation d'un caillé obtenu à partir d'un échantillon de lait entier, emprésuré à pH 6.5. Cette analyse, qui permet d'avoir une bonne estimation des rendements réels obtenus en cuve, a été réalisée selon la méthode décrite par **Hurtaud *et al.* (1991)**. Le rendement frais correspond au poids du caillé rapporté au poids de lait mis en œuvre. Le rendement en matière sèche est le rendement frais multiplié par l'extrait sec du caillé.

Le rendement fromager en frais (RFf) est obtenu par pesée du caillé :

$$\text{RFf} = \text{poids caillé} / \text{poids de lait}$$

Le rendement fromager en matière sèche (RFs) est calculé à partir de la détermination des teneurs en matière sèche du lait (MSL) et du lactosérum (MSLA), des poids de lait (PL) et de lactosérum (PLA) : $\text{RFs} = (1 - ((\text{PLA} \times \text{MSLA}) / (\text{PL} \times \text{MSL}))) \times 100$

5.3. Evaluation de l'activité protéolytique de la pepsine ovine sur les caséines laitières

L'action de l'enzyme coagulante se manifeste d'une manière spécifique sur la caséine κ mais aussi sur les caséines α et β . Au cours du processus de coagulation, les agrégats protéiques produits par l'action de l'enzyme coagulante sur ces caséines affectent les propriétés rhéologiques des gels.

La spécificité d'action de la pepsine ovine a été étudiée en utilisant comme substrat la caséine entière bovine et ses fractions α , β et κ , ainsi que les caséines entières caprine et ovine.

L'analyse, comparée des hydrolysats de caséines obtenus par action de la pepsine et de la chymosine est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

5.3.1. Les caséines

5.3.1.1. Caséine entière bovine et ses fractions α , β , et κ

La caséine entière bovine et ses composants α , β et κ employés pour l'étude de la protéolyse sont des caséines commerciales fournies à l'état lyophilisé type Sigma, Aldrich.

5.3.1.2. Caséines caprine et ovine

Les caséines ovine et caprine ont été préparées à partir du lait cru de chaque espèce, prélevé d'une seule femelle laitière provenant du troupeau de l'ITELV. La séparation de la caséine du lait est réalisée par centrifugation après précipitation à l'acide chlorhydrique selon la méthode décrite par **Egito et al. (2002)**.

Le lait préalablement écrémé par centrifugation (30 min, 25°C, 3500 x g), est additionné d'HCl 1M jusqu'à pH 4,2. Le caillé obtenu est centrifugé (20 min, 20°C, 3500 x g), et le culot est récupéré. Il est lavé deux fois avec de l'eau distillée puis dissout sous agitation dans une solution de NaOH (1M, pH 7). Ce cycle précipitation-lavage-dissolution est répété trois fois afin d'épuiser les constituants protéiques et non protéiques du lactosérum. Les caséines entières obtenues sont dialysées puis lyophilisées et conservées à -20°C.

5.3.2. Conditions de l'hydrolyse protéique

L'hydrolyse des caséines est réalisée selon la méthode décrite par **Muñoz et al. (2004)**. Les caséines sont dissoutes dans une solution tampon phosphate 0.1M, pH 6.5 à la concentration finale de 2 mg/ml, puis additionnées de l'extrait enzymatique dans un rapport 1/10 (v/v) et maintenues dans un bain marie à 32°C pendant une nuit pour les caséines α , β et κ et pendant 24 h pour les caséines entières de chaque espèce. L'extrait de pepsine ovine et celui de chymosine ont été dilués dans le même tampon à une concentration telle que le temps de coagulation soit égale à 10 min avec le substrat de Berridge.

Des fractions aliquotes du mélange réactionnel des caséines entières sont prélevées à des intervalles de temps adéquats (2, 6 et 24 heures), puis chauffées à 100°C pendant 5 min pour stopper la réaction d'hydrolyse.

5.3.3. Analyse électrophorétique des hydrolysats de caséine

Les hydrolysats de caséines obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) suivant la méthode de **Laemmli (1970)**.

Les échantillons à analyser préalablement dilués au 1/10 dans de l'eau distillée sont dissouts (v/v) dans un tampon échantillon (Tris-HCL 0,125 M, pH 6,8 contenant 2% (v/v) de SDS et 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol, 50% (v/v) de glycérol et 0,01% (m/v) de bleu de bromophénol) puis chauffées à 100°C pendant 5 min avant d'être analysés par SDS-PAGE.

L'électrophorèse a été effectuée avec un appareil Mini-Protean (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilisant un gel de concentration à 4% d'acrylamide en tampon Tris, pH 6,8, et un gel de séparation à 15 % d'acrylamide en tampon Tris, pH 8,8.

Les teneurs en protéines et en peptides des hydrolysats analysés sont déterminées en comparant leur mobilité avec celle d'un marqueur de PM connus.

6. Analyse statistique

La comparaison des moyennes des diverses variables (*DM, protein, casein, Soluble proteins, Total Ca, Colloidal Ca, Total P, Colloidal P, Fat*) a été établie par ANOVA de Friedman qui est l'équivalent du t-test de Student pour échantillons appariés avec plus de 2 échantillons (3 dans notre cas : cow milk, ewe milk et goat milk).

La comparaison des paramètres rhéologiques (*Ct, GFR et Amax*) en fonction de l'enzyme "ovine pepsine" ou "chymosine" a été établie par des tests de Student pour échantillons appariés sur des données chronologiques allant de début janvier à fin mars 2017. Nous avons aussi recherché les corrélations éventuelles positives ou négatives entre ces diverses variables

(2 à 2) pour les différents laits (vache, brebis et chèvre) en utilisant les coefficients de corrélation « r » de Bravais-Pearson qui peuvent mettre en évidence l'évolution conjointe de 2 variables.

L'analyse statistique a été établie sur Statistica 10 de Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA. Les résultats sont donnés comme moyenne et écart-type (SD : standard deviation). Les différences sont considérées significatives pour $p < 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I

Préparation de l'extrait coagulant de pepsine à partir des caillottes d'ovins adultes

Ce chapitre a pour objectif l'obtention de l'extrait de pepsine ovine à partir d'un coproduit d'abattage des ovins adultes. Le procédé d'obtention préconisé dans cette étude devra permettre de valoriser au mieux les caillottes ovines.

1. Choix de la méthode d'extraction

Les méthodes d'extraction des préparations enzymatiques coagulante citées dans la littérature, se différencient principalement par la nature de la solution extractive. Cette dernière conditionne la teneur en enzyme de l'extrait coagulant, son activité et le rendement d'extraction.

Trois solutions de macération ont été préconisées : de l'eau distillé additionnée de benzoate à 1% (**O'Leary et Fox, 1975**), une solution d'eau salée à 6-10% de NaCl (**Anifantakis et Green, 1980 ; Goursaud, 1999**) et une eau acidifiée à 0,2 M de HCl (**Valles et Furet, 1977**).

1.1. Influence de la nature de la solution d'extraction, effet de la clarification

Le taux d'extraction de l'enzyme varie en fonction du milieu de macération. Cette variation relativement faible lorsque la macération est conduite dans de l'eau ou dans la saumure, elle est notable lorsque la macération est conduite dans une solution 0,2 M de HCl (**Tableau IV**).

L'ajout de NaCl à l'eau facilite l'extraction et permet d'avoir des extraits plus actifs mais les rendements d'extraction sont plus faibles en raison de la viscosité élevée de l'extrait qui rends la filtration difficile.

Le jus de macération obtenu avec l'eau et la saumure est d'une couleur brun rougeâtre. La clarification permet d'éliminer les protéines en suspension en formant une boue organique et de corriger la couleur de l'extrait qui devient jaune d'or. Cependant, cette opération n'est pas sans conséquence sur l'activité de l'extrait. Une perte d'activité particulièrement notable est enregistrée avec le jus de la macération en saumure.

Tableau IV : Variation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction en fonction du milieu de macération. Effet de la clarification.

<i>Solution d'extraction</i>	<i>H2O + 1% de benzoate de Na</i>	<i>6 -10% de NaCl + 1% Benzoate de Na</i>	<i>HCL 0,2 M</i>
pH du milieu	6	5,4 -5,8	~ 1
AC (IMCU) avant activation	0,3	0,35 - 0,4	/
AC (IMCU) après activation	0,8	0,8	2,27
Rt (IMCU/ g de caillette)	0,68	0,5 - 0,65	0,96
AC (IMCU) (après clarification)	0,69	0,19-0,24	1,72
Rt (IMCU / g de caillette)	0,53	0,10 - 0,18	0,73

Conditions de macération : Poids de broyat de caillette = 100g ; poids de la solution extractive = 100 g ; Température d'incubation = 25°C ; Temps de macération = 60 minutes.

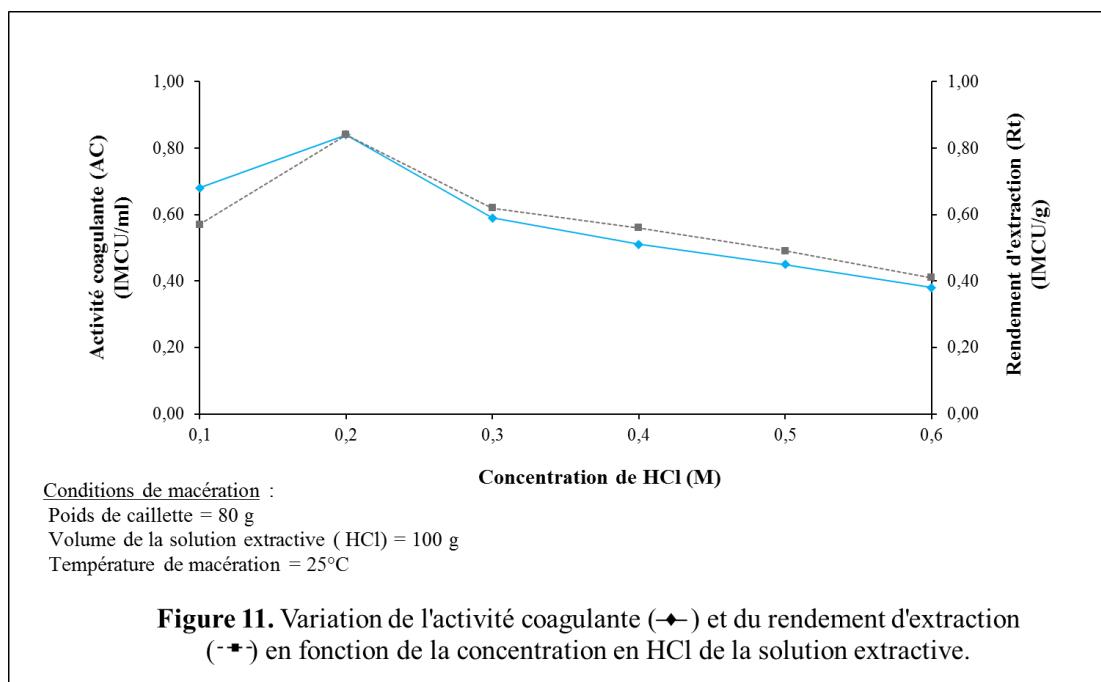
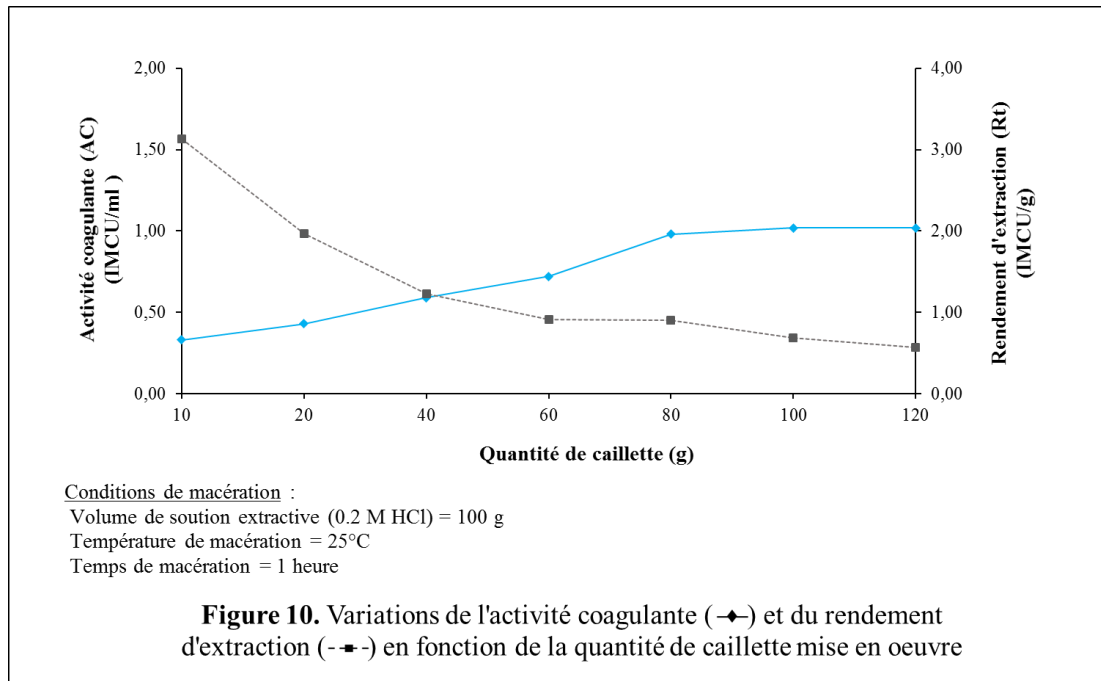
1.2. Influence de la quantité de caillette mise en œuvre

L'activité coagulante et le rendement d'extraction varient relativement, de manière proportionnelle avec la quantité de caillette mise en œuvre (**Fig. 10**). L'augmentation du poids de caillette entraîne une augmentation de l'activité coagulante et une diminution du rendement d'extraction. Au-delà de 80 g de caillette, cette variation est relativement faible.

1.3. Influence de la concentration en HCl

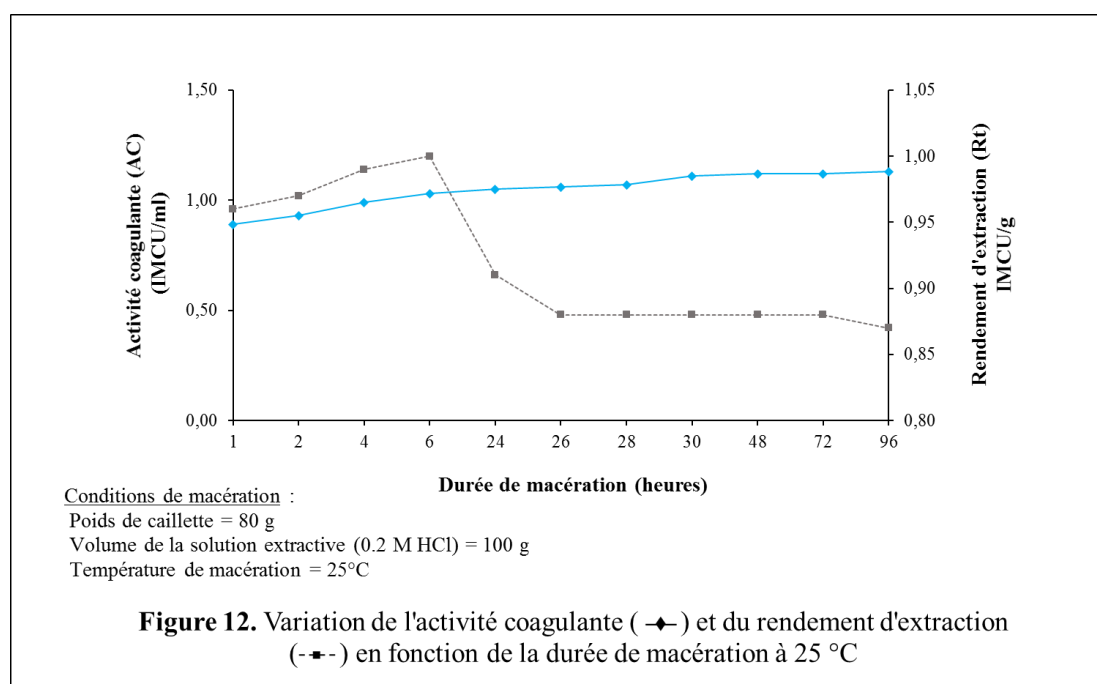
L'augmentation de la concentration en HCl entraîne une augmentation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction jusqu'à la concentration de 0,2 M. Au-delà de cette

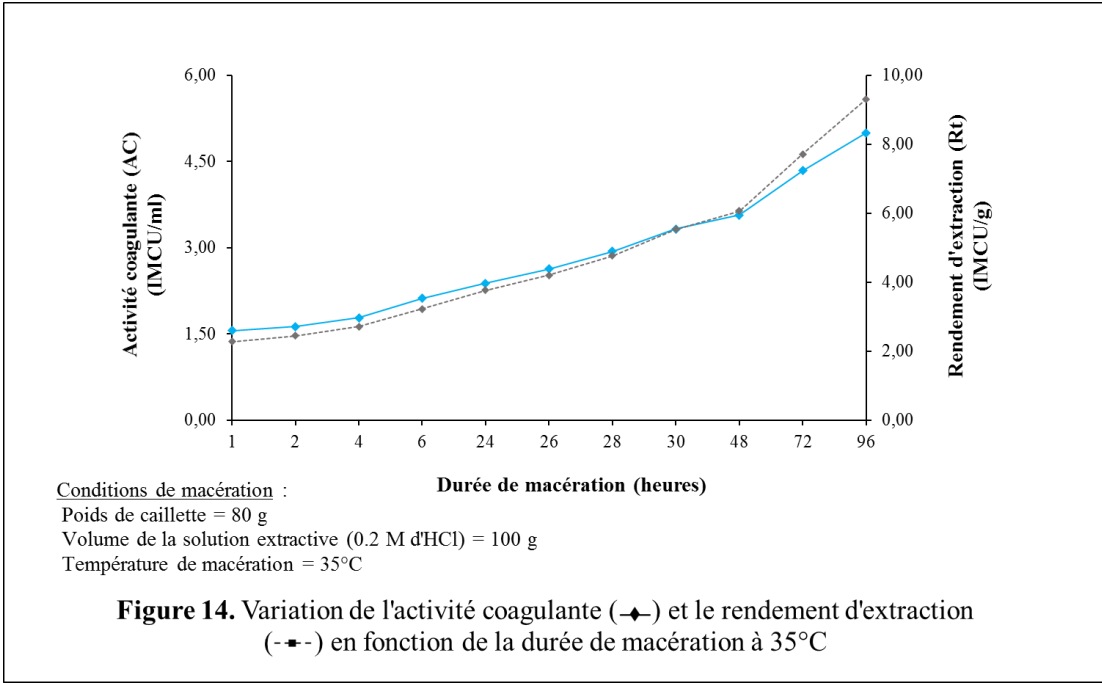
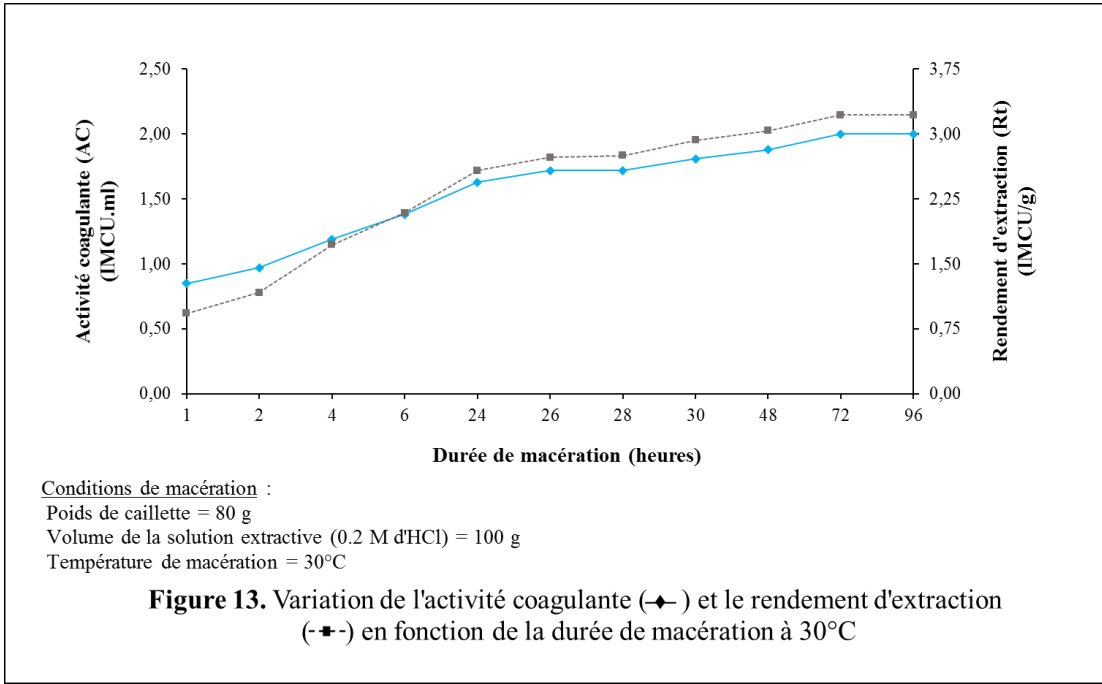
concentration, l'activité de l'extrait enzymatique et le rendement d'extraction diminuent (**Fig. 11**).

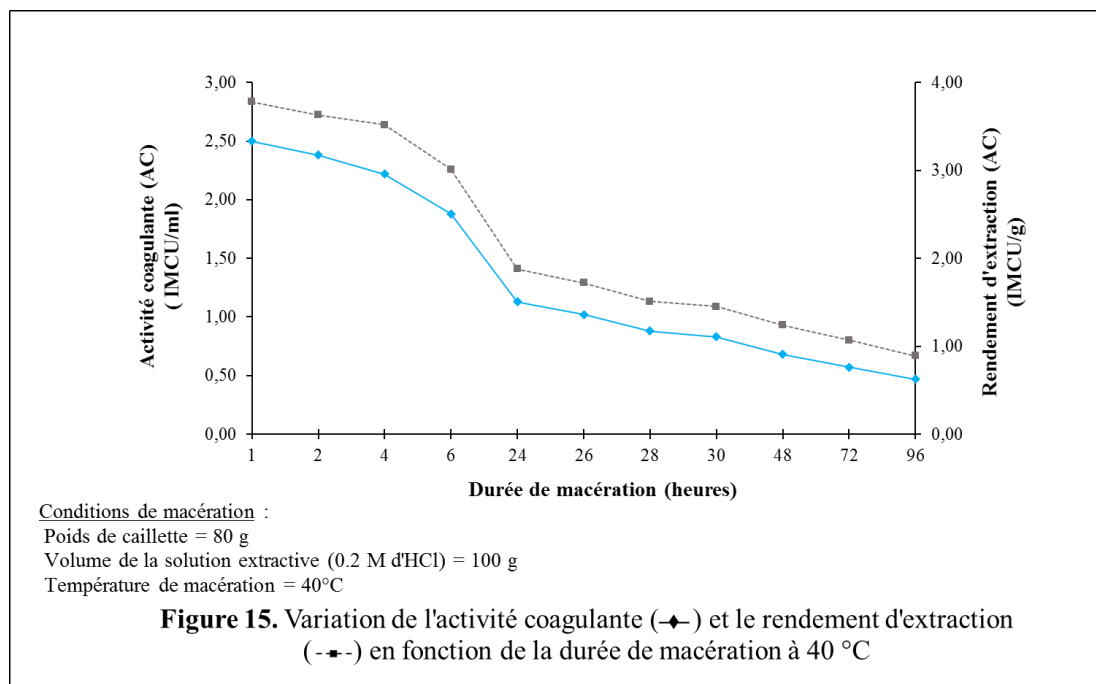


1.4. Influence de la température et de la durée de macération

La variation de la température et de la durée de macération montre que l'extraction est d'autant plus rapide que la température est élevée. Par ailleurs, l'élévation de la température au-delà de 25°C améliore le rendement d'extraction. En effet, la **figure 12** montre une chute très importante du rendement à 25°C, au-delà de 6 heures de macération ce qui n'est pas observé pour des températures supérieures à 25°C (**Fig. 13**). La température de 35°C avec une durée de macération de l'ordre de 72 à 96 heures, permet d'obtenir des activités enzymatiques (coagulantes) les plus élevées avec de meilleurs rendements (**Fig. 14**). Cependant, lorsque la macération est conduite à 40°C, l'activité coagulante et le rendement d'extraction chutent (**Fig.15**).







1.5. Conditions optimales d'extraction

Les essais préliminaires effectués ont permis d'adopter le diagramme d'extraction suivant :

- Etape 1 : Macération d'un poids de caillettes broyées dans une solution acidifiée de HCl 0.2 M, dans un rapport 8 :10 (W/W), à une température de 35°C pendant 72 heures ;
- Etape 2 : Purification de l'homogénat obtenu par filtration à travers une gaze, centrifugation et seconde filtration à travers du papier filtre ;
- Etape 3 : Neutralisation du pH du filtrat dans une fourchette de pH comprise entre 5.8 et 6 avec de la soude. C'est l'extrait brut de pepsine ovine.

L'extrait enzymatique brut de pepsine ovine obtenu dans ces conditions optimales montre une activité coagulante de 5 à 7 IMCU/ ml pour une concentration en protéines qui varie de 20 à 30 mg/ml correspondant à une activité spécifique de l'ordre de 0.2 IMCU/mg

Concernant le rendement d'extraction, 1g de caillette contient une activité coagulante de 7.5 à 10.5 IMCU, ce qui revient à dire qu'une caillette ovine d'un poids de 100 à 120 g peut

produire entre 750-1260 unités de pepsine. En conséquence, pour produire 1 litre d'extrait enzymatique brut de force 1/10.000 (qui correspond à la force de la présure commerciale), il faut préconiser environ 9 à 11 caillettes ovines.

2. Discussion

La méthode adoptée permet d'une part l'extraction de la pepsine et du pepsinogène et d'autre part l'activation de ce pepsinogène. Cette extraction est conditionnée par différents paramètres : le pH de la solution extractrice, la température et la durée de macération. L'utilisation d'une saumure favorise l'extraction du pepsinogène des parois stomacales en lysant les glandes sécrétrices et permet d'éviter les phénomènes de putréfaction des caillettes et la prolifération de micro-organismes grâce à l'action bactériostatique du NaCl. Cependant, cette méthode d'extraction nécessite la succession de plusieurs bains afin d'extraire au mieux les enzymes des caillettes. Contrairement, la macération en milieu acide permettait d'obtenir en une seule macération autant de pepsine que trois macérations consécutives effectuées dans l'eau ou la saumure. Par ailleurs, la température de macération influence le rendement d'extraction. En effet, lorsque la macération est réalisée entre 25 et 30°C, le jus de macération obtenu présente un caractère collant et glaireux qui est néfaste sur l'étape de filtration. Par contre, quand la macération est réalisée à 35 et 40°C, le caractère collant disparaît et une désintégration des broyat de caillettes est observée. Un volume important d'extrait brut est obtenu, aboutissant à un rendement d'extraction élevé. Toutefois, après 6 heures de macération à 40°C, l'activité coagulante de l'extrait enzymatique et le rendement d'extraction ont diminué suite au phénomène de dénaturation de l'enzyme. Ces résultats sont en accord avec l'ensemble des observations émises par **Valles et Furet (1977)**.

Le procédé de macération en milieu acide préconisé pour la préparation de la pepsine ovine présente plusieurs avantages qui méritent d'être cités :

- Aucun gaspillage de caillettes n'est observé. La solution acide de macération entraîne la désintégration totale de la matière première et l'épuisement des caillettes sans pour autant avoir recours à plusieurs bains d'extraction comme c'est le cas des macérations en solution d'eau salée ;
- L'addition d'antiseptique et l'emploi d'agents de clarification n'est pas nécessaire. Le pH acide de la solution extractive permet d'éviter la prolifération des microorganismes pendant la durée d'extraction.
- L'activation des pepsinogènes est instantanée à pH 2.

Toutefois, le mode de préparation des caillettes est important vis-à-vis de la qualité de celle-ci. Le temps séparant l'abattage de l'animal et la congélation de la caillette peut causer une dégradation accrue des matières protéiques (**Granday, 2015**).

Par ailleurs, les conditions de nettoyage des caillettes au niveau des abattoirs sont un autre facteur qui semble, conditionner le contenu enzymatique des caillettes avant l'extraction. En effet, la préparation des caillettes doit être limitée à un lavage à l'eau courante sous une légère pression. Selon Mann (1963), il faut éviter l'utilisation de l'eau chaude et le nettoyage à l'aide d'une brosse, qui entraîne une dissolution rapide de la pepsine et une perte d'activité et de rendement d'extraction.

CHAPITRE II

Purification de l'extrait de pepsine ovine et influence de trois facteurs sur l'activité coagulante

Dans ce chapitre, nous avons procédé à la purification de l'extrait de pepsine ovine par un procédé classique (chromatographie d'échange ionique suivie d'une gel-filtration), puis à l'étude de l'influence des facteurs affectant la coagulation du lait par la pepsine purifiée à savoir : la température, le pH, et la teneur Ca^{2+} du lait.

1. Obtention de la pepsine ovine purifiée

L'extrait enzymatique brut de pepsine ovine, obtenu dans les conditions optimisées (une concentration en protéines qui varie de 20 à 30 mg/ml, activité coagulante de 5 à 7 IMCU/ml et une activité spécifique de l'ordre de 0.2 IMCU/mg), dialysé et lyophilisé, est repris dans un minimum de tampon phosphate de sodium 0.2 M à pH 6 puis chromatographié à travers une colonne de DEAE-Cellulose suivi d'une filtration sur Sephadex G-100.

1.1. Purification de la pepsine ovine

Le profil d'élution obtenu après passage de l'extrait brut concentré de pepsine ovine à travers la DEAE cellulose est représenté dans la **figure 10 (a)**. Trois pics sont à distinguer. Un premier pic est observé avant la mise en place du gradient de NaCl. Il représente la fraction de protéines non retenues par la colonne. Deux autres pics sont élués plus ou moins rapidement à l'aide du gradient de NaCl (0.3-0.5 M) dont la totalité des fractions actives se retrouvent dans le dernier pic. Les fractions douées d'activité correspondent à 7 fractions (fractions 38 à 44) éluées à 0.4 M NaCl. Ces différentes fractions actives, collectées séparément et testées pour leurs activités coagulantes, sont dialysées puis lyophilisées.

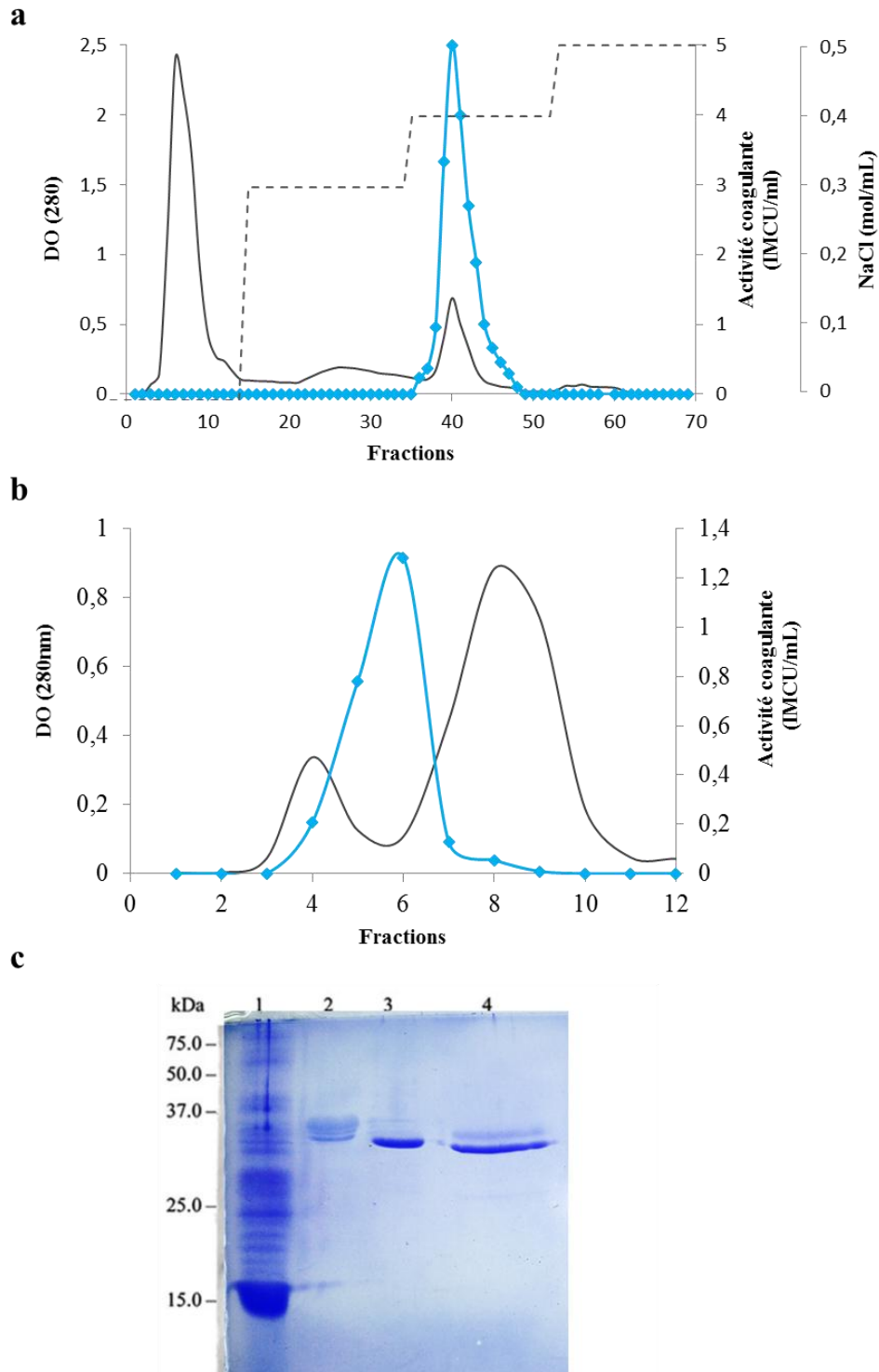


Figure 16. Purification de la pepsine ovine. **(a)** Représentation du profil d'éluion de l'extrait coagulant brut obtenu après échangeuse d'ions de DEAE-Cellulose. **(b)** Représentation du profil d'éluion de la pepsine ovine purifiée obtenu après une filtration sur gel. **(c)** Analyse par SDS-PAGE à 12% de la pureté de la pepsine ovine. DO_{280} (—), concentration de NaCl (---) et activité coagulante (◆).

L'élution à travers le gel Sephadex G-100 indique une séparation qui n'est pas optimale. Le profil d'élution montre 2 pics bien séparés où les fractions actives se trouvent dissimulées entre les deux pics. Le chromatogramme correspondant est présenté à la **figure 10 (b)**.

Après ces deux étapes de purification, le degré de pureté est amélioré au détriment du rendement qui a diminué. L'enzyme a été purifiée environ 108 fois avec un rendement global d'environ 49% (**Tab.V**). La chromatographie échangeuse d'ions est celle qui a la meilleure efficacité en termes de purification. L'élution de l'enzyme à travers la colonne de DEAE-cellulose a permis d'éliminer la majorité des protéines inertes. Cependant, une perte considérable d'activité est enregistrée. Inversement, la chromatographie d'exclusion a permis d'obtenir à la fois un facteur de purification élevé et une activité spécifique également élevée (31,2 IMCU/mg)

Tableau V. Bilan de purification de la pepsine ovine

<i>Étapes de purification</i>	<i>Protéines totales (mg)</i>	<i>Activité coagulante totale (IMCU)</i>	<i>Activité spécifique (IMCU/mg)</i>	<i>Facteur de purification</i>	<i>Rendement de purification</i>
<i>Extrait enzymatique brut</i>	942	273	0.29	1	100
<i>Étape 1 : chromatographie sur DEAE-cellulose</i>	8.3	164.5	19.8	68.3	60.2
<i>Étape 2 : chromatographie sur gel Sephadex G-100</i>	4.3	133.3	31.2	107.7	48.8

1.2. Mise en évidence de l'homogénéité de l'enzyme par SDS PAGE

L'analyse par SDS-PAGE des différentes fractions actives collectées et concentrées après chaque étape de purification, a permis de contrôler la pureté de l'extrait enzymatique. D'après le profil de séparation par électrophorèse sur gel de la pepsine ovine, indiqué par la **figure 10 (c)**, il apparaît que l'échantillon final est purifié à homogénéité, sans aucun

contaminant visible sur SDS-PAGE. La pepsine ovine purifiée a une mobilité électrophorétique très proche de celle de la chymosine. Sa masse moléculaire est estimée à 36 kDa.

Ce résultat suggère que les méthodes retenues pour l'isolement de la pepsine ovine ne mettent pas en évidence l'existence d'isoformes. En effet, de nombreux auteurs font référence à l'hétérogénéité de la pepsine. Ainsi, **Martin (1984)** avait déjà décrits cinq isoformes pour la pepsine bovine qui diffèrent par leur degré de phosphorylation et leurs propriétés enzymatiques. **Suzuki *et al.* (1999)** ont mis en évidence 2 types de pepsinogènes nommés A et C dans l'estomac du caprin adulte. Ils présentent une grande similitude dans leur composition en acides aminés et se différencient uniquement par leur rapport en Glx/Asx et Leu/Ile. Leurs valeurs sont nettement plus élevées pour le pepsinogène C par rapport au pepsinogène A. En contrepartie, trois variants génétiques ont été rapportés pour la chymosine. Les variants A et B, qui diffèrent par un résidu d'acide aminé (Gly/Asp) en position 244 de la chaîne peptidique, sont observés avec une fréquence de 39% et de 53% respectivement, et le variant C, beaucoup plus rare (fréquence de 8%), a été récemment caractérisé. Le poids moléculaire des trois variants génétiques purifiées de la chymosine se sont avérés identiques (**Donnelly *et al.* 1986 ; Rampilli *et al.*, 2005**).

2. Facteurs affectant l'activité coagulante de la pepsine ovine

Différents paramètres, en l'occurrence, la température, le pH et la concentration en calcium du lait affectent l'activité coagulante de la chymosine. Dans cette partie de l'étude, nous avons comparé l'influence de ces paramètres sur l'activité coagulante de la pepsine ovine et celle de la chymosine.

2.1. Effet de la température

Les deux protéases montrent une similitude de comportement vis-à-vis des variations de la température avec un maximum d'activité coagulante à 44° C (**Fig. 17a**). Au-delà de de cette température, les deux protéases perdent progressivement leur activité par le phénomène de dénaturation thermique. L'inactivation des deux enzymes est observée à partir de 52° C. Cependant, pour des températures comprises entre 32° C et 40° C, la pepsine ovine est relativement moins sensible que la chymosine.

2.2. Effet du pH

L'analyse de la courbe pH (**Fig.17 b**) indique que la pepsine ovine montre une plus grande sensibilité aux variations de pH que la chymosine, avec une baisse notable dès le pH 5.9. À des valeurs de pH comprises entre 5.7 et 6.5, l'activité coagulante de la pepsine ovine décroît rapidement que celle de la chymosine. Au-delà du pH 6,5, on observe une forte baisse de l'activité des deux enzymes. À pH 6.6, la pepsine commence à être inhibée alors que l'activité de la chymosine se maintient faiblement.

2.3. Effet de la teneur en calcium

Les résultats relatifs à l'effet du CaCl₂ illustrés sur la **figure 17 c**, indiquent que les deux protéases ont pratiquement la même sensibilité aux variations de la teneur en calcium du lait. Cependant, pour une même concentration en CaCl₂ l'activité de la pepsine est relativement inférieure à celle de la chymosine.

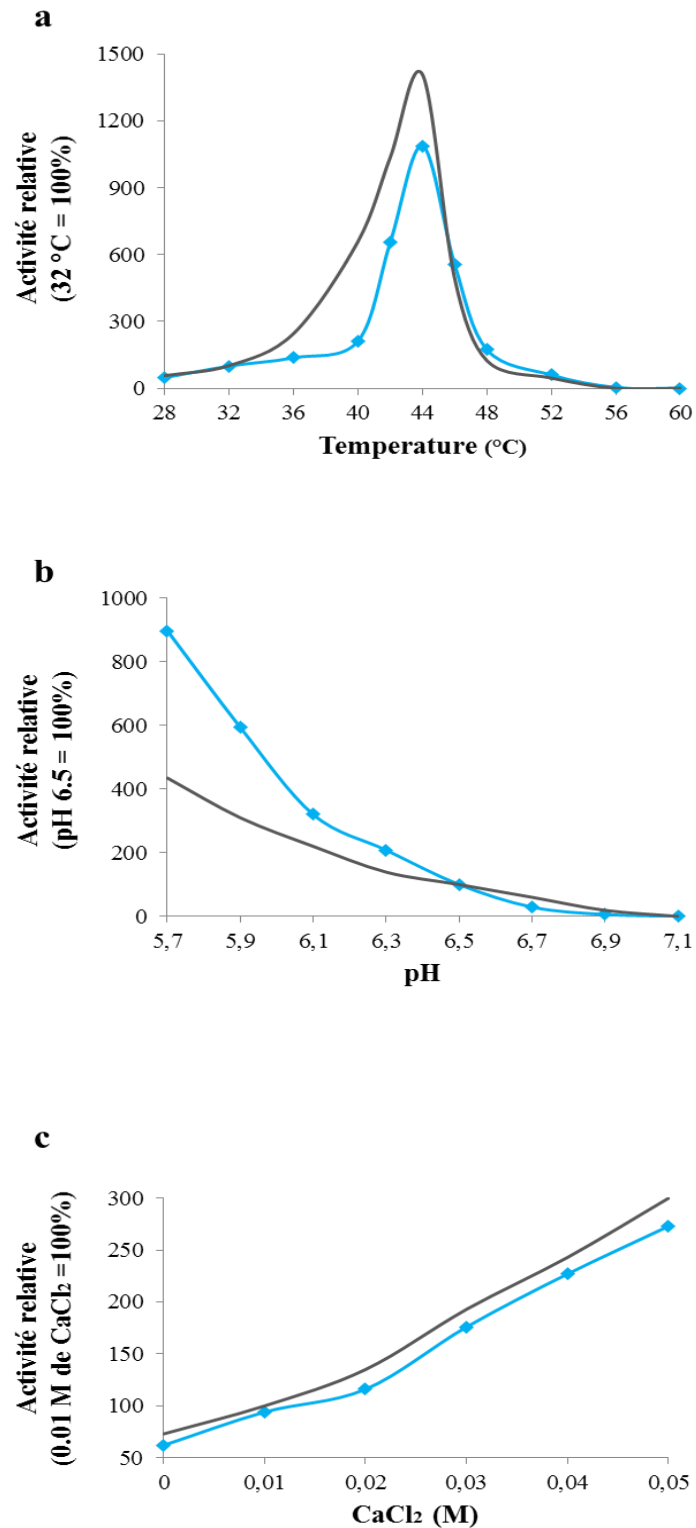


Figure 17. Effet de la température d' emprésure (a), du pH (b) et la concentration en CaCl_2 (c) sur l'activité coagulante de la pepsine ovine (◆) et de la chymosine (—).

2.4. Comparaison de l'activité coagulante de deux protéases

L'étude de la sensibilité de la pepsine ovine aux différents paramètres de coagulation a révélé que cette enzyme s'apparente à la chymosine. La différence de comportement paraît faible voire même insignifiante en ce qui concerne les variations de la température de coagulation et de la teneur en calcium du lait. En revanche, elle se distingue de la chymosine par sa sensibilité marquée en ce qui concerne les variations du pH.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux rapportés dans la littérature. Notons par ailleurs que les expériences relatives à l'emploi de la pepsine (bovine et porcine) seule en fromagerie, ont été réalisées depuis longtemps. Ces travaux ont relevé que l'usage de la pepsine seule dans les fabrications fromagères est limité par l'impact du pH. En effet, alors que le pH optimal d'hydrolyse de la caséine κ est voisin de 5.5, la pepsine n'est réellement active qu'en dessous de ce pH enregistrant une activité optimale à pH 2-3 qui est nettement inférieur à celui de la chymosine. En conséquence, l'abaissement du pH d'emprésurage est en faveur de l'activité de la pepsine que celle de la chymosine (**Mietton, 2015**).

Par ailleurs, bien que la température optimale d'action de la pepsine ovine soit analogue à celle de la chymosine, une dépendance non linéaire à la température a été mise en évidence entre 32 et 40°C pour la pepsine ovine. Il est bien admis que la température d'emprésurage influence fortement la coagulation en agissant à la fois sur l'activité de la protéase et sur l'énergie d'interaction entre les protéines. Cependant, L'effet de la température d'emprésurage est beaucoup plus marqué sur la vitesse d'agrégation, qui se traduit par une diminution du temps d'agrégation, une augmentation de la vitesse d'organisation des gels et une réduction de la fermeté maximale.

L'apport de calcium est largement utilisé en fromagerie pour corriger le comportement à la coagulation des laits réfrigérés, traités à haute température, voire les laits recombinaés. Lors de

l'apport (jusqu'à 0.5 g/l) environ 50% du calcium est dirigé vers les micelles de caséines dont l'hydratation et le potentiel de surface diminuent. Il s'ensuit une réduction du temps de prise et une augmentation de la vitesse de gélification. Toutefois, un apport excessive conduit à une organisation trop rapide du gel et à un manque d'égouttage qui aboutit à un caillé plus humide (Croguennec *et al.*, 2008).

Enfin, pour que la coagulation enzymatique du lait soit reproductible, il est nécessaire de considérer simultanément la teneur en calcium, la température et le pH. L'étude séparée de ces paramètres, bien qu'elle ait montré les spécificités d'action de la pepsine ovine par rapport à la chymosine, n'a qu'une importance relative (Castillo *et al.*, 2000).

CHAPITRE III

Propriétés rhéologiques des coagulums obtenus sous l'action de la pepsine ovine

Dans ce chapitre, l'objectif est d'évaluer les propriétés coagulantes de la pepsine ovine en considérant : l'évolution rhéologique des gels issus de la coagulation du lait de vache, de chèvre et de brebis ; l'incidence de l'emploi de la pepsine ovine sur les rendements fromagers de laboratoire et l'action spécifique qu'exerce la pepsine ovine sur la caséine (bovine, ovine et caprine) entière et ses fractions α , β et κ .

1. Caractérisation des laits de vache, de brebis et de chèvre

La composition de chaque type de lait utilisé dans cet essai a été déterminée. Les résultats obtenus, indiqués dans le **Tableau VI**, permettent de constater que le lait de brebis est significativement plus riche en matière utile, il contient plus de caséines et de minéraux que les laits de vache et de chèvre ($p \ll 0.05$). Le taux de protéine (TP), caractérisé par une teneur en caséine de 45 g/l, est environ deux fois plus élevé que celui des laits de vache et de chèvre ($p = 0,00012$).

Ces résultats sont, globalement, conformes aux données bibliographiques en l'occurrence à ceux de **Bocquier et Caja. (2001)**. Ils permettent, par ailleurs, de faire les observations suivantes. La teneur en matière grasse (TB) enregistrée ($\approx 64 \text{ g.L}^{-1}$) pour le lait de brebis est à la limite inférieure de l'intervalle de variation. La littérature indique que le TB du lait de brebis varie entre 63 et 77 g/l (**Vanbergue et al., 2013**), et que cette variabilité est liée à l'effet de la race. Selon **Ramet (2011)**, les brebis de race Lacaune présentent en moyenne une production laitière supérieure, et ont un TB et un TP plus élevés (67,3-71,0) que ceux des brebis de race Manech tête rousse (64,1- 66,4). Mais il faut noter que ces valeurs sont

rapportées pour toute la durée de la lactation d'une année, alors que nos résultats constituent la moyenne des données obtenues au cours des trois mois de suivi. Le TB du lait de brebis varie fortement (de 55 à 90 g/l) entre le début et la fin de lactation (**Bocquier et al., 1987 ; Bocquier et al., 1993**).

Tableau VI. Composition moyenne des laits de vache, de brebis et de chèvre (en g/l)

Caractéristiques physico-chimiques	Lait de vache		Lait de brebis		Lait de chèvre	
	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
<i>Matière sèche</i>	129.79	0.93	168.40	3.18	130.29	1.99
<i>Protéines</i>	33.18	0.29	55.63	7.04	29.63	0.67
<i>Caséines</i>	27.80	0.29	44.76	5.54	23.28	0.65
<i>Protéines solubles</i>	5.84	0.37	10.64	1.70	7.01	0.33
<i>Calcium total</i>	1.11	0.00	1.96	0.02	1.28	0.01
<i>Calcium colloïdal</i>	0.99	0.01	1.15	0.02	0.67	0.01
<i>Phosphore total</i>	1.00	0.01	1.14	0.03	0.93	0.03
<i>Phosphore colloïdal</i>	0.84	0.03	0.61	0.02	0.47	0.02
<i>Matière grasse</i>	39.20	2.50	63.90	3.10	37.10	6.80
<i>pH</i>	6.70	0.10	6.70	0.00	6.70	0.10

Par ailleurs, les taux protéique et butyreux du lait de brebis suivent une évolution similaire au cours de la période étudiée (3 mois), se traduisant par un accroissement du taux de matière utile du lait. Cette évolution (proche d'une évolution linéaire : $r = 0,989$) est statistiquement très significative ($p < 0,001$). **Rondia et al. (2003)**, dans leur revue bibliographique soulignent que la quantité de lait de brebis produite journalièrement diminue avec l'avancement de la saison de production. Parallèlement, les taux protéique et butyreux augmentent sensiblement pour atteindre respectivement plus de 7 et 9 % en fin de saison. Le lait devient de plus en plus riche au cours de la lactation des animaux. Cependant, le phénomène de concentration ne serait pas, selon **Bocquier et Caja (2001)**, la seule cause d'augmentation du taux butyreux en début de lactation. L'accroissement de la teneur en

acides gras libres du sang, consécutive à la mobilisation des réserves corporelles, expliquent en partie la forte augmentation observée.

La composition globale des laits de vache et de chèvre est assez voisine en ce qui concerne la matière sèche ($p=0.22$) mais une différence relativement significative est observée pour la teneur en protéines ($p<0.001$). Parallèlement, la teneur en caséines des deux laits diffère notablement ($p<0.001$). Alors que la fraction de caséine du lait de vache est de 27.8 g/l, celle du lait de chèvre n'est que de 23.3 g/l. C'est à cette différence relative en caséines qu'est attribuée la friabilité du caillé produit par le lait de chèvre lors de sa transformation en fromage (**Jenness, 1980**). En examinant les concentrations en protéines solubles, il apparaît que le lait de chèvre est plus riche que le lait de vache et ce, de façon très hautement significative ($7,0\pm 0,3$ contre $5,8\pm 0,4$; $p<0.001$).

Pour ce qui est de la matière grasse, l'analyse statistique des résultats, n'a pas montré de différence significative ($p = 0,18$) entre la teneur de lait de vache et celle de lait de chèvre. Les teneurs enregistrées ($39,2\pm 2,5$ et $37,1\pm 6,8$ g/l respectivement), sont comparables à celles citées par différents travaux. Ainsi, **Leroux et al. (2013)** soulignent que les laits de vache et de chèvre contiennent respectivement une moyenne de 38 et 35 g/l de MG. **Mayers et Fiechter (2012)** rapportent un taux de 36.7 g/l de MG pour le lait de chèvre. Cependant, en considérant le travail de **Morgan et al. (2003)**, il apparaît une très grande disparité de composition des laits de chèvre suivant leur origine géographique. En effet, la teneur en MG du lait de chèvre provenant de la Grèce est nettement plus élevée que celle du lait collecté en France : 51.4 g/kg contre 36.5 g/kg. Tandis que le lait de chèvre collecté au Portugal présente une teneur intermédiaire avec 42.7 g/kg.

Au cours de la période d'essai (3 mois), une baisse du taux de matière utile des laits de vache et de chèvre a été constatée avec une amplitude de variation plus importante pour la matière grasse que pour les protéines (-2,5% de TP et -15.9% de TB pour le lait de vache contre -6,1%

de TP et -37.5% de TB pour le lait de chèvre). Ces variations notées en début de lactation sont statistiquement importantes même pour le lait de brebis, bien que l'amplitude de variation du taux protéique observée pour ce lait soit plus importante que celle du taux butyreux (+41.6% de TP, +15.3% de TB).

Divers travaux (**Agabriel *et al.*, 1990** ; **Coulon *et al.*, 1991** ; et plus récemment **Legarto *et al.*, (2014)**) ont montré qu'au cours de la lactation, les teneurs en protéines et en matière grasse des laits de vache et de chèvre évoluent de façon inverse à la quantité de lait produite. Des taux maximaux sont signalés en début de lactation, qui progressivement diminuent pour atteindre des minimaux autour du 2-3^{ème} mois. Une hausse de ce taux est ensuite observée jusqu'à la fin de la lactation. Cette baisse du taux de matière utile est expliquée principalement par un effet de dilution par rapport à la production de lait qui évolue inversement.

La teneur en minéraux du lait de chèvre est plus élevée que celle du lait de vache. Elle est d'environ 8 g/l pour le lait caprin contre 6 g/l pour le lait bovin. La différence entre les teneurs en calcium et en phosphore totaux des deux laits est hautement significative, ($p < 0.001$) avec un rapport Ca/P légèrement inférieur pour le lait de vache (1,11 contre 1,34). Ces résultats sont en accord avec ceux observés par **Mahieu *et al.*, (1977)** et **Mayers et Fiechter (2012)**. Par contre, nous observons que la teneur en calcium et en phosphore colloïdaux sont plus faibles dans le lait de chèvre que dans le lait de vache ($p < 0,001$). Ces résultats ne concordent pas avec ceux de **Remeuf *et al.*, (1989)** qui relèvent une minéralisation plus importante pour les micelles caprines. Selon (**Croguennec *et al.*, 2008**), la charge minérale est corrélée positivement à la teneur en protéines. Cette corrélation est due essentiellement au calcium qui est, pour une part importante, associé aux caséines.

2. Comportement rhéologique des laits emprésurés par l'extrait de la pepsine ovine

La cinétique de gélification a été suivie au cours du temps par un Gélograph et les caractéristiques des gels formés ont été déterminées. Un profil rhéologique-type est représenté pour le lait de vache, de brebis et de chèvre (**Fig.18**). Ce profil est établi à partir des moyennes des résultats des 9 essais pour chaque lait.

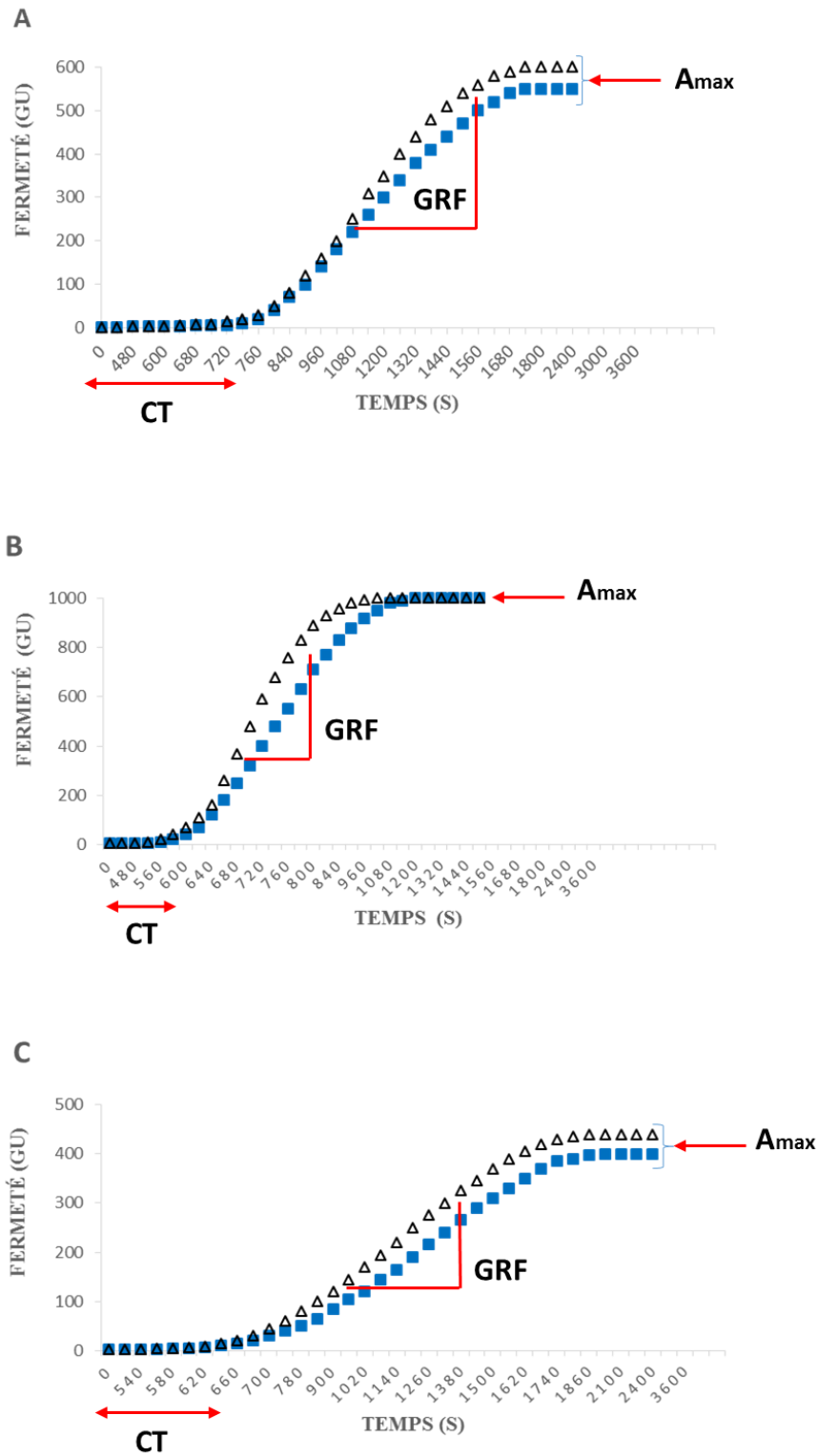
2.1. *Cinétique de coagulation*

Malgré les caractéristiques biochimiques comparables de la pepsine ovine et de la chymosine (résultats chapitre 1), une différence de comportement des trois laits est observée lors du suivi de la cinétique de coagulation enzymatique.

Pour le lait de vache (**Fig. 18A**), les tracés de la cinétique de coagulation obtenus avec les deux enzymes se superposent parfaitement en début de coagulation, et les coagulums se raffermissent de la même manière, mais par la suite le caillé de pepsine ovine évolue moins rapidement, et aboutit à un gel moins ferme que le caillé-chymosine. Un comportement semblable a été décrit avec le lait de vache reconstitué (**Slamani et al., 2018**), mais avec un développement plus élevé de la fermeté que celui du lait de vache frais.

Le suivi de la cinétique de coagulation du lait de brebis (**Fig. 18B**) avec les deux enzymes montre un comportement particulier. Les gels formés par chaque enzyme évoluent différemment mais le degré de fermeté final est le même pour les deux enzymes.

Quant au lait de chèvre (**Fig. 18C**), le raffermissement des deux gels prend une allure identique, mais avec un léger décalage entre les deux courbes qui sont approximativement parallèles. Le gel obtenu sous l'action de la pepsine ovine est moins ferme que le gel-chymosine



18. Courbes d'évolution de la fermeté des gels de lait de vache (A), de brebis (B) et de chèvre (C) obtenues sous l'action de la pepsine ovine (■) et de la chymosine (Δ). (Tracés de Gelograph à T = 32°C, pH 6.5 pendant 60 min)

2.2. Caractéristiques rhéologiques des gels

L'analyse des paramètres rhéologiques (**Tab.VII**) relevés sur les courbes de suivi de la cinétique de coagulation des laits de vache, de chèvre et de brebis a révélé une différence de comportement des laits selon l'enzyme employée. Des différences significatives entre les caractéristiques des gels obtenus à partir des trois types de lait ont été enregistrées.

Tableau VII. Principaux paramètres de coagulation

<i>Paramètres de coagulation</i>	<i>Agent coagulant</i>	<i>Lait de vache</i>		<i>Lait de brebis</i>		<i>Lait de chèvre</i>	
		Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
<i>Temps de coagulation (s)</i>	Pepsine	735.6	31.3	588.9	17.6	646.7	26.5
	Chymosine	717.8	0.41	555.6	19.4	633.3	26.5
<i>Vitesse de raffermissement (GU/s)</i>	Pepsine	0.37	0.04	0.83	0.03	0.30	0.03
	Chymosine	0.41	0.03	0.88	0.03	0.33	0.04
<i>Fermeté maximale (GU)</i>	Pepsine	566.7	26.0	1000	0	397.8	18.6
	Chymosine	608.9	17.6	1000	0	433.3	32.8

Le temps de coagulation de la pepsine ovine sur les trois types de lait est significativement plus long que celui de la chymosine. Sur le lait de vache, un écart de temps de 17.8 ± 12.0 s est constaté entre la pepsine et la chymosine. Il est de 33.3 ± 10.0 s et 13.3 ± 10.0 s sur le lait de brebis et de chèvre respectivement. Cependant, il y a lieu de noter que le lait de brebis coagule plus vite que le lait de chèvre et de vache. Le lait caprin enregistre un temps de coagulation intermédiaire entre celui obtenu avec le lait ovin et bovin.

Parallèlement, l'utilisation de la pepsine ovine a induit une diminution de la vitesse de raffermissement du gel qui est passé de $0,41 \pm 0,03$ à $0,37 \pm 0,04$ ($\text{GU} \cdot \text{s}^{-1}$) pour le lait de vache, de $0,88 \pm 0,03$ à $0,83 \pm 0,03$ ($\text{GU} \cdot \text{s}^{-1}$) pour le lait de brebis et de $0,33 \pm 0,04$ à $0,30 \pm 0,03$ ($\text{GU} \cdot \text{s}^{-1}$) pour le lait de chèvre. Ce ralentissement de la vitesse de gélification s'est répercuté négativement sur la fermeté des gels. Ainsi, la fermeté maximale (A_{max}) des gels-

chymosine est significativement plus élevée ($p < 0.001$) que celle observée avec les gels-pepsine. Amax est passé de $566,7 \pm 26,0$ GU et $397,8 \pm 18,6$ pour les gels-pepsine obtenus respectivement avec le de vache et de chèvre, à $608,9 \pm 17,6$ GU et $433,3 \pm 32,8$ GU pour les gels-chymosine.

Par ailleurs, la vitesse de raffermissement des laits de brebis emprésurés par la chymosine est élevée, ce qui se traduit par la suite par un degré de fermeté supérieur, de l'ordre de 1000 GU.

Par comparaison au caillé-pepsine ovine, son raffermissement est moins rapide mais aboutit à une fermeté de même ordre. Comparativement aux laits bovin ou caprin, le lait de brebis s'organise vite et le gel devient ferme rapidement, ce qui est en accord avec les résultats de **Storry *et al.* (1983)**.

Pour le lait de chèvre, le gel-pepsine ovine se raffermi moins vite que celui de la chymosine ($p = 0,0002$). En conséquence, le premier paraît plus mou que le caillé obtenu avec la chymosine.

Pour le lait de vache, un léger ralentissement du raffermissement du caillé-pepsine est observé à la 18^{ème} min réduisant ainsi la fermeté maximale du caillé d'environ -7%. Cette différence est toutefois statistiquement très hautement significative ($p < < 0.001$).

Globalement, et comparativement au lait de brebis, le coagulum-caprin est le plus mou, tandis que le gel-bovin a un caractère intermédiaire (semi-ferme). Le gel de lait de brebis est un gel ferme ne coulant pas sous son propre poids, il résiste quand on retourne le tube dans lequel il a été formé. Le gel caprin est un gel mou qui s'écoule sous son propre poids quand le tube qui le contient est retourné.

Des corrélations très significatives ont été mises en évidence d'une part entre la vitesse de raffermissement (GFR) des gels et la fermeté maximale (Amax), et d'autres parts entre les temps de coagulation (CT) et la vitesse de raffermissement. Ces corrélations évoluent dans le même sens lorsqu'on compare les trois laits emprésurés avec la pepsine ovine ou avec la

chymosine. Ainsi avec les gels-pepsine ovine, des corrélations positives entre GFR et Amax sont enregistrées pour le lait vache ($r=0,889$; $p=0,001$), le lait de chèvre ($r=0,971$; $p<0,001$) et le lait de brebis. Cette corrélation entre GFR et Amax est plus forte pour la chèvre. Par contre, des corrélations négatives sont notées entre CT et GFR pour le lait de vache ($r= -0,829$; $p=0,006$), pour le lait de chèvre ($r = -0.962$; $p<0,001$) et pour le lait de brebis. Selon **Remeuf et al. (1989)** un gel qui se raffermi rapidement a tendance à atteindre une fermeté maximale plus élevée qu'un gel se raffermissant lentement. Le lait correspondant aura aussi tendance à coaguler en un temps plus court.

2.3. Etude des relations entre les caractères physico-chimiques des laits et leur comportement sous l'action de la pepsine ovine en comparaison avec la chymosine

L'analyse des variables technologiques (T_c , GFR, Amax) par ANOVA a montré que les coagulums obtenus avec la pepsine ovine se distinguent par des propriétés rhéologiques significativement différentes des coagulum-chymosine. Le traitement des résultats par régression linéaire (partielle) n'a, cependant pas, permis d'expliquer cette différence de comportement des deux enzymes dans chaque lait. Pratiquement aucune variable physicochimique ne ressort comme ayant un effet significatif marqué sur les paramètres de coagulation par rapport aux autres variables utilisées. En conséquence, ceci nous a conduits à étudier l'activité protéolytique des deux enzymes afin de comparer leur effet respectif sur les caséines.

3. Impact de la substitution de la chymosine par la pepsine sur le rendement fromager de laboratoire

L'activité protéolytique des coagulants a une incidence importante sur le rendement fromager. Ce dernier est évalué par un test de laboratoire.

Les résultats relatifs aux rendements fromagers de laboratoire en frais et en sec sont présentés au **tableau VIII**.

Tableau VIII. Valeurs moyennes des rendements en frais et en sec

<i>Rendement fromager (%)</i>	<i>Agent Coagulant</i>	<i>Lait de vache</i>		<i>Lait de brebis</i>		<i>Lait de chèvre</i>	
		Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
En frais	Pepsin	44.8	5.1	54.1	12.6	20.5	2.6
	Chymosin	49.3	4.3	55.5	12.3	21.9	3.5
En sec	Pepsin	69.7	5.0	81.4	4.0	40.4	1.7
	Chymosin	71.4	5.0	83.5	3.0	43.7	2.1

D'après ces données, les rendements fromagers obtenus avec la chymosine sont très significativement meilleurs que ceux obtenus avec la pepsine ovine ($p < 0.001$). La comparaison des rendements obtenus sur les trois laits avec la pepsine ovine et la chymosine montrent, que la pepsine ovine dégrade les rendements en frais et en matière sèche de -9.2% et - 2.67% avec le lait de vache, - 2.62% et - 2.56% avec le lait de brebis et de -7.02% et 8.15% avec le lait de chèvre.

L'analyse des corrélations entre les paramètres physico-chimiques et les rendements fromagers mettent en évidence l'existence de relations étroites entre les paramètres étudiés. Ainsi, le rendement en frais (FCY) et le rendement en matière sèche (DCY) sont fortement corrélés avec la matière sèche utile ($r > 0,9$). En conséquence, L'écart des valeurs de rendement trouvées entre les trois laits est due à la variation de la composition chimique du lait. En effet, la teneur moyenne en matière utile du lait de brebis, nettement plus élevée que celle du lait de vache, explique la supériorité des rendements fromagers observés comparativement à ceux obtenus avec le lait de vache. Le lait de chèvre est nettement moins fromager, puisque la proportion de matières azotées coagulables est plus faible.

Par ailleurs, et d'après **Arlene et al. (2014)** le pouvoir coagulant de l'enzyme est corrélé positivement au rendement. Pour un même lait, plus le pouvoir coagulant de l'enzyme est

élevé, plus le rendement est élevé. De même, pour la texture, moins l'enzyme est protéolytique, plus la texture du fromage est ferme.

Cependant, il y a lieu de signaler que les valeurs de rendement obtenues dans cette étude sont supérieures à ceux observés par **Hurtaud *et al.* (1995)** pour le lait de vache et par **Rondia *et al.* (2003)** pour le lait de brebis. Cette différence est liée probablement au manque de perméabilité des gels. La centrifugation (1350 t/mn pendant 15 min) ne permettait pas une évacuation aussi complète du lactosérum que l'égouttage naturel par gravité lors d'une fabrication fromagère simulée.

4. La protéolyse des caséines par la pepsine ovine et la chymosine

Outre l'hydrolyse de la caséine κ , l'action de la chymosine s'exerce également sur les caséines α_s et β . L'objectif de cet essai est de comparer l'action qualitative de la pepsine ovine sur la caséine et de ses composants α_s , β et κ d'origine bovine, ovine et caprine

4.1. Comportement des caséines α_s , β et κ bovines à la protéolyse pepsique

L'examen des profils électrophorétiques des hydrolysats de la protéolyse pepsique des caséines α_s , β et κ bovines (**Fig. 19**) obtenus après 16 heures d'hydrolyse à 32 °C et à pH 6.5 permet de constater que l'hydrolyse des caséines α_s et β par la pepsine ovine est différente de celle obtenue par la chymosine. Par contre, l'effet de l'enzyme coagulante (pepsine ou chymosine), sur la caséine κ est constaté instantanément dès le début de l'hydrolyse et qui s'accompagne de l'apparition de produits finaux (paracaséine). L'hydrolyse de la caséine α_s par la pepsine ovine se traduit par l'apparition d'une bande protéique bien distincte alors qu'avec la chymosine, une fraction de la caséine demeure intacte après une 16 h d'action. Ceci indique que l'action de la pepsine sur la caséine α_s est assez poussée. Par ailleurs, la caséine β apparaît plus résistante à l'action de la pepsine ovine. En effet, une grande fraction de cette caséine demeure intacte après 16 h d'action. Dans les mêmes conditions d'hydrolyse,

la α_s -caséine est dégradée par la pepsine avec une intensité plus accentuée à celle de la chymosine et ce contrairement à l'hydrolyse de la β -caséine. Ce résultat montre que les deux enzymes possèdent une aptitude différenciée à la protéolyse des fractions de caséine. Ce résultat n'est pas en bonne adéquation avec les conclusions de **Munõz *et al.*, (2004)** qui avaient rapporté que la pepsine bovine attaquait α_s et β -caséine d'une manière similaire. Ces différences constatées dans le caractère de la protéolyse de α_s et β -caséine indiquent que ces enzymes révèlent une spécificité apparente de leur façon de décomposer α_s et β -caséine. L'intensité et la spécificité de la protéolyse de chaque enzyme impacte les propriétés fonctionnelles des fromages (fermeté et texture). De nombreuses études ont établi des corrélations entre la fermeté de nombreux fromages et l'intensité de la protéolyse de la caséine α_{s1} par l'agent coagulant. Par ailleurs, l'amertume des fromages est attribuée généralement à l'accumulation de peptides amers provenant de la dégradation de la caséine β (**Delacroix-Buchet et Marie, 1994**).

Finalement, l'étude de la dégradation des caséines par la pepsine donne l'ordre préférentiel de dégradation suivant : κ -caséine > α_s > β . ces résultats étant en adéquation avec une étude antérieure de Irigoyen *et al.* (2000) avec la présure d'agneau. Cet ordre évolue différemment avec la chymosine dans le sens : κ -caséine > β > α_s .

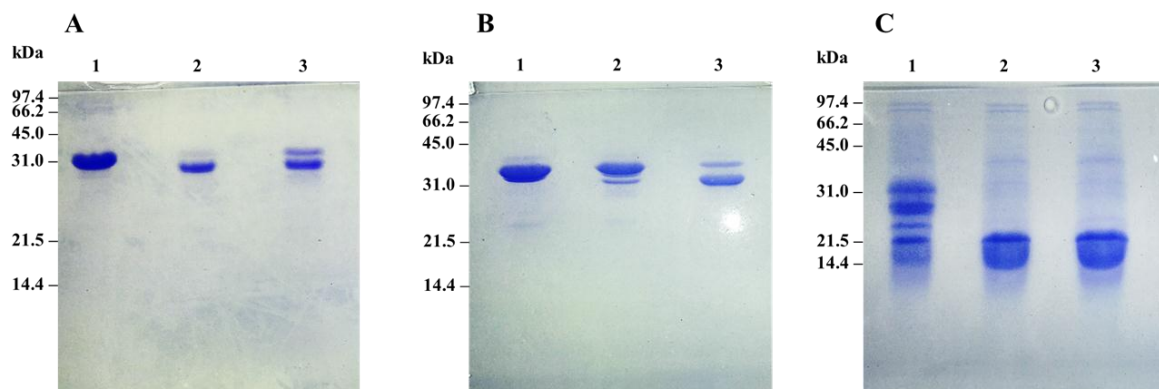


Figure 19. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (à 15%) des produits de la réaction de protéolyse des caséines α_s (A). β (B) et κ (C) par la pepsine (2) et par la chymosine (3).

Des études sur la spécificité d'action de la chymosine à pH 6.5 et à pH 5.2, ont montré que douze liaisons de la caséine α_{s1} sont sensibles à l'action de la chymosine à pH 5.2 dont sept seulement demeurent à pH 6.5. La vitesse d'hydrolyse de ces liaisons est différente dans les deux conditions, mais Phe₂₃-Phe₂₄ et Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ sont respectivement la première et la seconde liaisons clivées quelles que soient les conditions de pH. Par ailleurs, à des pH relativement acides 16 liaisons sont coupées par la chymosine (pH 3.5) dans la caséine β et 15 par la pepsine A (pH 3) dont 8 liaisons communes. (Guillou *et al.* 1991 ; McSweeney *et al.* 1993 ; Martin. 2015).

4.2. Comparaison de la protéolyse des caséines bovine, ovine et caprine

Le profil électrophorétique de la caséine ovine ainsi que celui de la caséine caprine (Fig. 20) présentent 3 bandes protéiques successives qui correspondent aux caséines α_s , β et κ . Leurs poids moléculaires sont compris entre 19 et 25kDa.

L'examen des profils des hydrolysats obtenus avec la caséine ovine et caprine indiquent l'apparition de fragments de grande taille en début de l'hydrolyse (2 h) dont le poids moléculaire est proche des composants de la caséine initiale. Jusqu'à 6 h d'hydrolyse, le profil reste inchangé, ce qui suggère une vitesse d'hydrolyse constante entre 2h et 6h. Après 24 h d'hydrolyse, les caséines ovine et caprine sont complètement hydrolysées en peptides de faible taille. Toutefois, la dégradation de la caséine ovine sous l'action de la pepsine ovine se traduit en 5 bandes électrophorétiques dans les deux heures qui suivent le début de l'hydrolyse. Avec la chymosine, les produits d'hydrolyse se traduisent en 4 bandes protéiques. Cette différence relative au taux d'hydrolyse explique le résultat de l'analyse rhéologique mettant en évidence un caractère moins rigide du caillé-pepsine avec le lait de brebis.

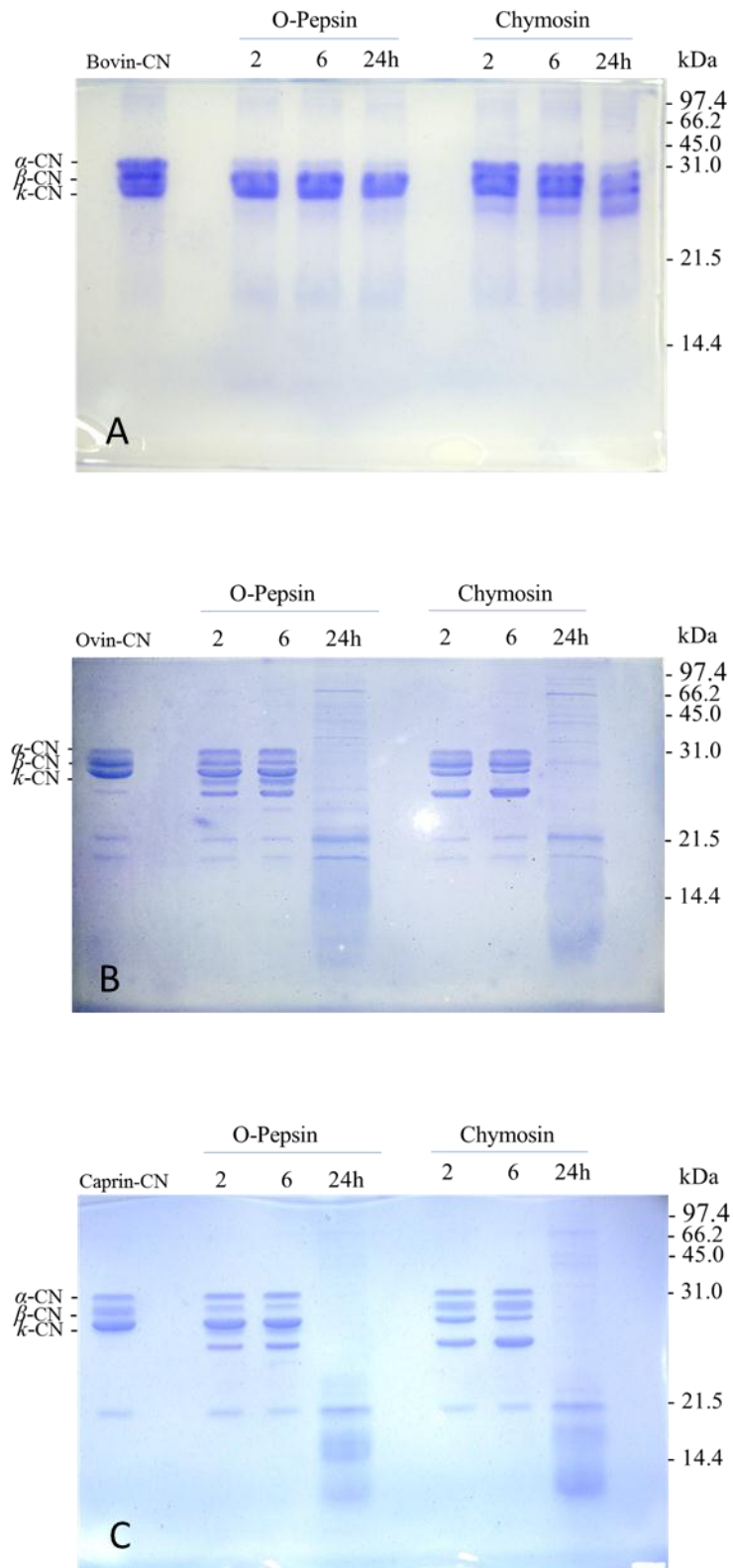


Figure 20. Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE à 15%) des produits de la réaction de l'action de protéolyse des caséines entières : (A) bovine, (B) ovine et caprine (C), par la pepsine ovine et par la chymosine.

La dégradation progressive de la caséine caprine, sous l'action de la pepsine et de la chymosine est identique. Ainsi, l'action de la pepsine et de la chymosine sur la caséine caprine libère de manière similaire 4 fractions peptidiques se traduisant sous forme de 4 bandes intermédiaires qui se dégradent à leur tour pour donner des produits finaux de très faibles poids moléculaire au bout de 24h. Contrairement à l'observation faite pour les caséines ovine et caprine, la dégradation de la caséine bovine par la chymosine et la pepsine ovine est lente, se traduisant par des taux d'hydrolyse moindre et des quantités de peptides intermédiaires faibles.

Après 24 h d'hydrolyse, les peptides intermédiaires ne sont pas dégradés. En outre, la protéolyse est relativement lente avec la pepsine. Ainsi, il apparaît que la sensibilité de la caséine bovine vis-à-vis de la pepsine est moindre par rapport à celle de la chymosine. Cependant, les bandes électrophorétiques focalisées dans la zone de migration de la caséine initiale, rend l'interprétation de ce profil électrophorétique particulièrement difficile. Ce comportement particulier de la caséine bovine à la protéolyse par, à la fois, la chymosine et la pepsine ovine est probablement lié à l'effet pH. En effet, le suivi de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine bovine, à pH 2.5 et à la température de 37°C avait montré que cette protéine est complètement hydrolysée en peptides de masses inférieures à 10 kDa à partir de 2 h d'hydrolyse. En outre. Il a été montré que la nature des peptides produits à pH 4.5 diffère de ceux observés à pH 2, pH optimal d'action de la pepsine (**Inglingstad et al., 2010**).

Les profils de dégradation des caséines, visualisés par SDS-PAGE a montré que l'ordre d'hydrolyse des micelles de caséines variait selon l'enzyme. Avec la pepsine ovine, la protéolyse suit l'ordre : caséine ovine > caséine caprine > caséine bovine. En revanche, l'ordre d'hydrolyse observé avec la chymosine est : caséine ovine = caséine caprine > caséine bovine.

5. Discussion générale

Le suivi du processus de coagulation du lait par Gelograph a permis de caractériser la phase enzymatique à travers la détermination du temps de coagulation, et la phase physicochimique à travers la détermination de la vitesse de raffermissement du gel. Par ailleurs, la fermeté maximale des gels permet d'expliquer les différences de rendements fromagers obtenus.

La phase enzymatique correspond à l'hydrolyse spécifique de la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caséine κ située à la périphérie des micelles de caséine. L'efficacité de cette réaction spécifique dépend de l'affinité de l'enzyme pour la caséine κ . Elle met en jeu des interactions secondaires avec des résidus relativement éloignés de la liaison clivée qui induisent des changements conformationnels impactant le site actif de la coagulase (**Martin, 2015**).

Dans notre étude, l'écart du temps de coagulation en faveur de la chymosine est synonyme du manque d'efficacité de la pepsine ovine vis-à-vis de la caséine κ . Selon **Martin (1984b)**, l'action de la pepsine bovine sur la caséine κ est très influencée par le degré de phosphorylation de la molécule de pepsine. La pepsine bovine est composée d'au moins cinq fractions actives se distinguant par leur teneur en groupements phosphates (0 à 3 par molécules) et vraisemblablement par leur localisation sur la chaîne peptidique (**Martin et Coree, 1984 ; Rampilli et al. 2005**). La déphosphorylation de la molécule enzymatique a permis d'accroître son activité coagulante spécifique vis-à-vis de la caséine κ et le déplacement de son optimum d'action vers des pH moins acides, sans pour autant qu'un quelconque effet puisse être décelé sur le lait. L'effet de la phosphorylation de la pepsine A sur son activité protéolytique vis-à-vis de la caséine κ trouve son origine dans l'existence de répulsions électrostatiques entre les charges négatives présentes respectivement sur la partie C-terminal de la caséine κ et au voisinage du site actif de la pepsine (**Martin, 2015**). A cet égard, il a été signalé que la pepsine ovine présente des résidus phosphate sur sa molécule

(Fox *et al.*, 1977), il est probable qu'il existe une relation entre les caractéristiques structurales de la pepsine ovine et son action sur la caséine κ la distinguant ainsi de la chymosine.

Quant aux propriétés de raffermissement liées à l'emploi de la pepsine ovine, il apparaît que la sensibilité de la pepsine aux différents paramètres de coagulation, en particulier le pH du lait, est déterminante. L'étude rhéologique a, en effet, montré que l'organisation des gels-pepsine se faisait plus lentement et que la texture de ces gels est nettement moins ferme que les gels chymosine sur les trois types de lait à pH identique. Par ailleurs, l'impact de la pepsine sur l'organisation du coagulum a été établi par **Kenti et Van Paridon (2001)**, qui ont constaté que la vitesse de raffermissement des gels (à durée de prise identique) est d'autant plus lente que la teneur en pepsine dans les préparations coagulantes est importante.

D'autre part, la phase physicochimique de la coagulation, consécutive à la scission de la partie hydrophile de la caséine κ est fortement conditionnée par la présence du calcium. Au cours de l'agrégation, l'échange du calcium entre la phase aqueuse et colloïdale induit une profonde réorganisation des micelles de caséines et la formation du gel dont la fermeté évolue au cours du temps.

Toutefois et dans l'échelle d'observation des techniques employées (Rhéologie), la différence constatée dans l'organisation du gel pepsine par rapport au gel chymosine avec les trois types de lait est difficile à interpréter sans le recours à l'étude de la structure des gels par microscopie. Par conséquent, nous ne pouvons qu'émettre l'hypothèse selon laquelle les agrégats de micelles obtenus de l'hydrolyse des caséines par la pepsine ovine pendant la période initiale précédant l'agrégation, sont différents de ceux obtenus avec la chymosine. Ces agrégats pourraient soit interférer dans le processus de formation du réseau, d'où résultent des gels moins ferme, ou bien affecter le comportement auto-associatif de ces agrégats

colloïdaux en induisant une réorganisation du gel-pepsine différente de celle du gel-chymosine.

Dans cette optique, des études ont montré que les composés protéiques solubles présents dans le sérum pouvaient jouer un rôle important au niveau des propriétés rhéologiques et de la microstructure des gels présure (**Kethireddipalli *et al.*, 2010**). En effet, la présence de caséines solubles (caséinate de sodium) a montré un effet inhibiteur sur la phase secondaire de la coagulation par la présure. Ces travaux ont démontré que cette inhibition est due à l'adsorption des molécules de caséine sur les micelles emprésurées et ce contrairement à ce qui a été traditionnellement attribué à des changements s'effectuant dans l'équilibre ionique (**Gaygadzhiev *et al.*, 2012**).

D'autres études ont approfondi l'altération de la coagulation par la présure résultant du traitement thermique du lait à haute température en évaluant l'effet de diverses composantes du lait (**Kethireddipalli *et al.*, 2010 ; 2011**). Ces travaux ont révélé que la déficience de coagulation découlait d'un effet synergique entre trois différentes composantes du lait traité thermiquement : les micelles de caséine présentant une surface modifiée par la chaleur, des complexes protéiques solubles présents dans le sérum (protéines sériques/ κ -caséine), et d'autres constituants dialysables du sérum (**Kethireddipalli *et al.*, 2010**). Le rôle direct des complexes protéines sériques/ κ -caséines solubles dans la déficience de coagulation du lait traité thermiquement a été démontré. Ces complexes se liaient à la surface des micelles emprésurées probablement par des interactions hydrophobes avec les résidus de para-caséine (**Kethireddipalli *et al.*, 2011**), interférant ainsi dans le processus de coagulation.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les caillettes ovines, coproduits d'abattage, sont une source potentielle de protéases digestives à haute valeur ajoutée. Dans cette étude, nous avons isolé une protéase acide « la pepsine ovine » à partir de ce coproduit, caractérisé ces propriétés biochimiques et évalué son aptitude à coaguler le lait.

La première partie de ce travail a consisté en l'extraction et la purification de la pepsine ovine. Cette enzyme a été purifiée à homogénéité par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE cellulose suivie d'une filtration sur gel Sephadex G-100. Le facteur de purification et le rendement final de purification sont de l'ordre de 49 et 107% respectivement. La purification a conduit à l'obtention d'une bande unique sur SDS-PAGE ayant une masse moléculaire de l'ordre de 36 kDa. L'enzyme purifiée présente une activité spécifique sur substrat de Berridge de l'ordre de 31 IMCU/mg.

L'enzyme purifiée est active entre pH 5.7 et 6.5. Son activité diminue considérablement au-delà de pH 6.5. À pH 6.9, elle enregistre 6% d'activité résiduelle contre 19% pour la chymosine. L'optimum de température d'action de la pepsine ovine purifiée est observé à 44 °C. Elle est totalement inactivée au-delà de 52 °C.

La deuxième partie de ce travail avait pour but de caractériser la cinétique de coagulation du lait soumis à l'action séparée de la pepsine ovine et de la chymosine. Pour les trois types de lait étudiés : lait de vache, lait de brebis et lait de chèvre, les gels-pepsine ont montré des propriétés rhéologiques significativement différentes de celles obtenues avec la chymosine. Le temps de coagulation de la pepsine ovine sur les trois types de lait est significativement plus long que celui de la chymosine. Le raffermissement des trois gels est moins rapide avec la pepsine, aboutissant à la formation de coagulums moins fermes. Excepté pour le lait brebis qui a présenté un indice de fermeté égal dans le cas de la coagulation avec la pepsine ovine ou

la chymosine. Par conséquent, les rendements fromagers obtenus avec la chymosine sont significativement meilleurs que ceux obtenus avec la pepsine ovine. Ceci indique que la pepsine ovine est moins spécifique que la chymosine. Toutefois, il nous paraît que les propriétés gélifiantes de la pepsine ovine avec le lait de brebis sont intéressantes et une réflexion à propos d'un nouveau produit est possible. Un caillé aussi ferme avec une structure différente pourrait vraisemblablement être lié à la nature des agrégats peptidiques produits lors de la protéolyse des caséines ovines et qui seraient différents de ceux issus de l'hydrolyse de la caséine bovine.

L'activité protéolytique de la pepsine ovine et de la chymosine a été comparée sur les caséines α_s , β et κ et sur les caséines entières bovine, ovine et caprine. Bien que l'action des deux enzymes sur la caséine κ soit identique, les profils protéolytiques de α_s et β -caséine, visualisés par SDS-PAGE, ont présenté des différences. La pepsine ovine a montré une action ménagée sur la caséine β tandis que son action était intensive sur la caséine α_s . La pepsine est moins protéolytique sur la caséine bovine mais par contre son action est plus notable sur la caséine ovine. Avec la caséine caprine, l'activité protéolytique des deux enzymes est relativement similaire. Ces différents niveaux de protéolyse observés entre la pepsine et la chymosine expliquent les propriétés fonctionnelles (texture et fermeté) différentes des caillés obtenus.

A ce stade de l'étude de nombreux aspects restent à élucider :

- L'approche rhéologique adoptée dans cette étude pour caractériser la phase de coagulation du lait a permis de constater que la pepsine ovine avait un impact différent sur les propriétés mécaniques des gels. La question qui est soulevée est de savoir quelle est l'influence des facteurs : pH, température et Ca^{2+} sur la cinétique de formation du gel pepsine.
- L'hydrolyse des caséines par la pepsine ovine a montré des particularités. La caractérisation des agrégats protéiques et de leur mécanisme d'interaction serait une

première piste intéressante, dans le cadre d'une démarche explicative plus fondamentale du mode d'action de la pepsine ovine.

- Par ailleurs, il convient également d'envisager une étude de l'éventuelle application de la pepsine purifiée par la réalisation de micro-fabrication de fromages afin d'évaluer la concordance des constats mis en évidence à l'échelle laboratoire

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Addis M., Piredda G., Pirisi A. (2008). The use of lamb rennet paste in traditional production of sheep milk cheese. *Small Rum Res*, 79, 2–10.

AFNOR. (1980). Accueil des normes françaises ; Lait et produits laitiers : méthodes d'analyse. 1^{ère} édition.

Agabriel C., Coulon J.B., Marty G., Cheneau N. (1990). Facteurs de variation du taux protéique du lait de vache. Etude dans les exploitations du Puy-de-Dôme. *INRA Prod. Anim.*, 3, 137-150.

Alais C. et Lagrange A. (1972). Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*. activité coagulante et activité protéolytique. *LE LAIT / Juillet-Aout*, N° 517.

Andrén A. (2002). Rennets and coagulants. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox (Eds.) Academic Press (London), pp. 281-286.

Anifantakis E. M., Kandarakis J. G. (1983). Utilisation de la pepsine bovine en fabrication de fromage Feta fait à partir du lait de brebis. *Le Lait.*, INRA Editions, (63) 631- 632, pp.416-417.

Anifantakis E. et Green M. (1980). Preparation and properties of rennet from Lamb and Kid's abomasa. *J. dairy Res*, 47, 22-230.

Arlene A., Kristijarti A.P., Ardelia I. (2014). The Effects of the Types of Milk (Cow, Goat, Soya) and Enzymes (Rennet, Papain, Bromelain) Toward Cheddar Cheese Production. *Makara J. Technol.*, 19 (1), 31-37.

Balthazar C.F., Pimentel T.C., Ferrão L.L., Almada C.N., Santillo A., Albenzio M., Mollakhalili N., Mortazavian A.M., Nascimento J.S., Silva M.C., Freitas M.Q., Sant'Ana A.S., Granato D., Cruz A.G. (2017). Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Comprehensive Reviews. Food Science & Food Safety*, 16, 247-262

Bansal N., Drake M.A., Piraino P., Broe M.L., Harboe M., Fox P.F., McSweeney P.L.H. (2009). Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *Int Dairy J*, 19 (9), 510–517.

Barbano, D.M. and Rasmussen, R.R. 1992. Cheese yield performance of fermentation produced chymosin and other milk coagulants. *J. Dairy Sci*, (76) 1-12.

Barbieri M.E., Manfredi E., Elsen J.M., Ricordeau G., Bouillon J., Grosclaude F., Mahé M.F., Bibé B. (1995). Influence du locus de la caséine α_{s1} sur les performances laitières et les paramètres génétiques des chèvres de race Alpine. *Génét Sél Evol*, 27, 437- 450.

- Berridge NJ. (1952). An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *J Dairy Res*, 9, 328–329.
- Bouchoux, G., Gésan-Guiziu, J., Perez.Cabane B. (2010). *Biophysical Journal*, V (99), 3754-3762.
- Boulanger A., Grosclaude F., Mahé M.F. (1984). Polymorphisme des caséines α_{s1} et α_{s2} de la chèvre (*Capra hircus*). *Génét. Sel. Evol.*, 16, 157-176.
- Bocquier F., et Caja. G. (2001). Production et composition du lait de brebis : effets de l'alimentation. *INRA Prod. Anim.*, 14(2), 129-140.
- Bocquier F., Barillet F., Guillouet P., Jacqui M. (1993). Prévion de l'énergie du lait de brebis à partir de différents résultats d'analyses : proposition de lait standard pour les brebis laitières. *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences*, 42 (1), 57- 66.
- Bocquier F., Thériez M., Brelurut A. (1987). The voluntary hay intake of ewes during the first weeks of lactation. *Anim Prod* 44, 387-394.
- Broyard C., Gaucheron, F. (2015). Modifications of structures and functions of caseins: A scientific and technological challenge. *Dairy Science & Technology*, 95, 831-862.
- Broome M C., Xu X., Mayes JJ. (2006). Proteolysis in Cheddar cheese made with alternative coagulants. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 61, 85–87.
- Brulé G., Lenoir J., Remeuf F. (1997). La micelle de caséine et la coagulation du lait. In : Eck A., Gillis J.C. (Eds.), *Le Fromage*, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 7–41.
- Bustamante, M.A., Chavarri, F., Santisteban, A., Ceballos, G., Hernandez, I., Miguelez, M.J., Aramburu, I., Barron, L.J.R., Virto, M., De Renobales, M. (2000). Coagulating and lipolytic activities of artisanal lamb rennet paste. *J. Dairy Res.* 67, 393–402.
- Bustamante, M.A., Virto, M., Aramburu, M., Barron, L.J.R., Perez-Elortondo, F.J., Albisu, M., de Renobales, M. (2003). Lamb rennet paste in ovine cheese (Idiazabal) manufacture. Proteolysis and relationship between analytical and sensory parameters. *Int. Dairy J.* 13, 547 - 557.
- Carles C., Ribadeau-Dumas B. (1984). Kinetics of the action of chymosin (rennin) on some peptide bonds of bovine beta-casein. *Biochemistry*, 23 (26), 6839-6843.
- Castillo M., Payne F.A., Hicks C.L., Lopez M.B. (2000). Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal* (10) 551-562.
- Cayot P., et Lorient D. (1997). Structures et techno-fonctions des protéines du lait. Ed.Tec & Doc Lavoisier (Paris), 384 pages.

- Chilliard Y., Rouel J., Leroux C. (2006). Goat's alpha-s1 casein genotype influences its milk fatty acid composition and delta-9 desaturation ratios. *Anim. Food Sci. Technol*, 131, 474-487.
- Chitpinyol S., Crabbe MJC. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem*, 61, 395-418.
- Claverie-Martin F., Vega-Hernandez M.C. (2007). Aspartic Proteases Used in Cheese Making. In : *Industrial enzymes : Structure, function and applications*. Pp.207-219.
- Collin JC. (2015). Analyse, contrôle et traçabilité des présures. In : *Présures et coagulants de substitution*. Ed, Quae. Pp 103-142.
- Coulon J.B., Chilliard Y., Rémond B. (1991). Effets du stade physiologique et de la saison sur la composition chimique du lait de vache et ses caractéristiques technologiques (aptitude à la coagulation, lipolyse). *INRA Prod. Anim.*, 4, 219-228.
- Croguennec T., Jeantet R., Brulé G. (2008). *Fondements physicochimiques de la technologie laitière*, coll. Tec et Doc, Lavoisier (Paris) 160 p.
- Dalgleish D G., Corredig M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Ann Rev Food Sci Technol*, 3, 449-467.
- Dalgleish D.G., Horne D.S., Law A.J.R. (1989). Size-related differences in bovine casein micelles. *BBA Gen. Subjects*, V (991) 383-387.
- De Kruif C G., Huppertz T., Urban VS., and Petukhov AV. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Adv. Colloid Interface Sci.* 171, 36-52.
- De Kruif C G., Holt. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. In: Fox P.F., McSweeney P.L.H., editors. *Advanced dairy chemistry*, third edition. Proteins, V (1). New York: Kluwer Academic/Plenum publishers, pp. 213-276.
- Desmazeaud M. (1990). Les enzymes utilisées en industrie laitière. In *laites et produits laitiers*. Vache. Brebis. Chèvre. Ed. Tec et Doc, Lavoisier. Pp582-603.
- Donnelly W J., Carroll D P., O'Callaghan D.M., Walls D. (1986). Genetic polymorphism of bovine chymosin. *Journal of Dairy Research*, 53 (4), 447-664.
- Dunn BM., Valler M J., Rolph C E., Foundling S I., Jimenez M., Kay J. (1987). The pH dependence of the hydrolysis of chromogenic substrates of the type, Lys-Pro-Xaa-Yaa-Phe-(NO₂) Phe-Arg-Leu, by selected aspartic proteinases: evidence for specific interactions in sub-sites S3 and S2. *Biochim. Biophys. Acta*, 913, 122-130
- Eigel W N. (1977). Formation of γ 1-A2, γ 2-A2 and γ 3-A caseins by *in vitro* proteolysis of β -casein A2 with bovine plasmin. *Int J Biochem*, V (8), 187-192.

Egito A S., Miclo L., López C., Adam A., Girardet J M., Gaillard J L. (2002). Separation and characterization of mare's milk α 1, β -, κ -caseins, γ -casein-like, and proteose-peptone components 5-like peptides. *Journal of Dairy Science* 85 (4), 697-706.

Ernstrom C.A. (1983). Milk clotting enzymes and their action in fundamentals of dairy chemistry. Webb B.H., AH. Johnson and J.A. Alford. The Avi Publishing Company Inc. 2nd Edition. PP 663-718.

Farrell H M Jr., Brown Eleanor M.; and Kumosinski, Thomas F. (1993). Three-Dimensional Molecular Modeling of Bovine Caseins. *Food Structure*, Vol. 12, N° 2, Article 11.

Farrell, H. M.Jr., R. Jimenez-Flores, Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Swaisgood H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *J. Dairy Sci*, 87, 1641–1674.

Farrell H.M., Jr., Malin E.L., Brown E.M., Qi P.X. (2006a). Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr. Op. Coll. & Interf. Sci.* 11, 135–147.

Foltman B. (1970). Prochymosin and chymosin. *Methods Enzymol*, 19, 421-436.

Foltman B., Pedersen VB., Jacobsen M., Kauffman D., Wijbrandt G. (1977). The complete amino acid sequence of prochymosin, 74, 2321- 4.

Foltman B. (1987). General and molecular aspects of rennets. In: Fox PF, editor. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1. London Elsevier. pp 37-68.

Foltmann B. (1992). Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases. *Scand. J. Clin. Lab. suppl.* 210; 65-79.

Fox P F. (2003). Significance of Indigenous Enzymes in Milk and Dairy Products. In: *Handbook in food enzymology*. Ed: Marcel Dekker, Inc. Whitaker et coll. Pp 19.

Fox P F, Whitaker J R., O'Leary P A. (1977). Isolation and characterization of sheep pepsin. *Biochemistry Journal*, 16, 389–398.

García V., Rovira S., Teruel R., Boutoial K., Rodríguez J., Roa I., López M. B. (2012). Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats' cheese. *Dairy Sci. & Technol.* 92:691–707.

Gaygadzhiev Z., Massel V., Alexander V M., Corredig M. (2012). Addition of sodium caseinate to skim milk inhibits rennet-induced aggregation of casein micelles. *Food Hydrocolloids*, 26, 405-411.

Germonville A. (2003). Agents coagulants. In : *Additifs et adjuvants alimentaires*. Ed, Techniques de l'ingénieur. Pp 2-11.

- Goursaud J. (1999). Coagulation enzymatique du lait. In : Biotechnologie. Scriban R. Ed, Tec & Doc, Lavoisier (Paris) 365-401.
- Granday P. (2015). Les préparations coagulantes utilisées en fromagerie. In : Présures et coagulants de substitution. Collin J C. Ed, Quae. Pp 11-60.
- Grosclaude F., Mahé M.F., Brignon G., Di Stasio L., Jeunet R. (1987). A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α_{s1} -casein. Génét. Sel. Evol., 19, 399-412.
- Grosclaude F., Ricordeau G., Martin P. (1994). Du gène au fromage : le polymorphisme de la caséine α_{s1} caprine, ses effets, son évolution. (From the gene to the cheese: goat α_{s1} -casein polymorphism, its effects, and its evolution). INRA Prod. Anim., V (7), 3-19.
- Guillou H 1., Miranda G., Pelissier JP. (1991). Hydrolysis of beta-casein by gastric proteases. I. Comparison of proteolytic action of bovine chymosin and pepsin A. Int J Pept Protein Res. 37 (6), 494-501.
- Harboe M., Broe M L., Qvist. K B. (2010). The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. In: Technology of Cheesemaking. Editors(s): Barry A. Law; A. Y. Tamime. Pp : 98-129.
- Harboe M., Hubert L., Van Den Brink H. (2015). La chymosine produite par fermentation. In : Présures et coagulants de substitution. Collin J.C. Ed, Quae. Pp 77-101.
- Holland J W., Deeth H C., Alewood P.F. (2006). Resolution and characterisation of multiple isoforms of bovine κ -casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy. Proteomics, 6, 3087-3095.
- Holt C. (1992). Structure and stability of bovine casein micelle. Advances in Protein Chemistry, 43, 63-151.
- Horne D S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 11, 148-153.
- Horne D S. (2002). Casein structure, self-assembly and gelation. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 7:456–461.
- Houen G., Madsen M T., Harlow K W., Lønblad P., Foltmann B. (1996). The primary structure and enzymic properties of porcine prochymosin and chymosin. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, V 28 (6), 667-675.
- Hurtaud C., Rulquin, H., Delaite, M., Vérité R. (1995). Appréciation de l’aptitude fromagère des laits de vaches individuels. Tests d’aptitude fromagère et rendement fromager de fabrication. Ann. Zootech., 44, 385-398.
- Irigoyen A., Izco J M., Ibáñez F C., Torre P. (2000). Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A Volume 881, Issues 1–2, 9, 59-67
- Inglingstad R. A., Devold T. G., Eriksen E. K., Holm H., Jacobsen M., Liland K H. (2010). Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and

human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Science and Technology*, 90, 549-563.

Jacob M., Jaros D., Rohm H. (2011). The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semi hard cheese from laboratory-, pilot- and commercial-scale productions. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 370-380.

Jarmul A., Reys S., Poznanski, I et Zelazowska H. (1982). Utilisation du mélange de la pepsine avec la préparation microbienne (Fromase) dans la fabrication des fromages Edam et Kortowski. *Le Lait*, (1982), 62, 75-86.

Jenness R. (1980). Composition and Characteristics of Goat Milk. *J Dairy Science*, 63 (10), 1605–1630.

Kageyama T. (2002). Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution and development. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59, 288–306.

Kaminarides S., Anifantakis E. (1989) Evolution of the microflora of Kopanisti cheese during ripening. Study of the yeast flora, *Le Lait* 69, 537–546.

Kappeler SR., van den Brink HM., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhani Z., Hansen EB., Johansen E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem Biophys Res Commun* 342(2), 647–654.

Kentie M., Van Paridon P. (2001). Coagulants: the new generation. *Dairy Ind. Inter.* Février, 32-33.

Kethireddipalli P., Hill AR., Dalgleish DG. (2011). Interaction between casein micelles and whey protein/kappa-casein complexes during renneting of heat-treated reconstituted skim milk powder and casein micelle/ serum mixtures. *J Agric Food Chem* 59(4), 1442–1448.

Kethireddipalli P., Hill AR., Dalgleish DG. (2010). Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation. *International Dairy Journal*, 20(12), 838- 843.

Kindstedt P.S. (2011). Mechanisms of Coagulation: The principles of the science and what they mean to cheesemakers. Department of Nutrition and Food Sciences; University of Vermont.

Kocabiyik S., Özel H. (2007). An extracellular-Pepstatin insensitive acid protease produced by *Thermoplasma volcanium*. *Bios. Technol*, 98, 112-117.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

Legarto J., Gelé M., Ferlay A., Hurtaud C., Lagriffoul G., Palhière I., Peyraud J.-L., Rouillé B., Brunschwig P. (2014). Effets des conduites d'élevage sur la production de lait, les taux butyreux et protéique et la composition en acides gras du lait de vache, chèvre et brebis évaluée par spectrométrie dans le moyen infrarouge. *INRA Prod. Anim.*, 27 (4), 269-28.

- Lenoir J., Lamberet G., Schmidt J.L. (1983). L'élaboration d'un fromage : l'exemple du camembert. *Pour La Science*, 69,30-42.
- Leroux C., Bernard L., Dessauge F., Le Provost F., Martin P. (2013). La fonction de lactation : régulation de la biosynthèse des constituants du lait. *INRA Productions animales*, 26 (2), 117-128.
- Léonil J., Michalski M.C., Martin P. (2013). Les structures supramoléculaires du lait : structure et impact nutritionnel de la micelle de caséine et du globule gras. *INRA Prod. Anim.* 26 (2), 129-144.
- Léonil J., Marchin S., Henry G., Jouanneau D., Putaux J.L. (2007). La caséine *k* : quel rôle dans la structuration de la micelle de caséines ? Colloque – Grenoble – 5-8 juin
- Llorente B E., Obregón W D., Avilés F. X., Caffini N. O., Vairo-Cavalli S. (2014). Use artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: characterization of aspartic proteases. *Food Chemistry*, 159, 55-63.
- Lopez-Galvez G., Ramos M., Martin-Alvarez P.J., Juarez M. (1993). Influence of milk protein polymorphism on cheese producing ability in the milk of Manchega ewes breed. In: *Proceedings of the International Dairy Federation seminar 'Cheese Yield and Factors Affecting its Control'*, Cork, Ireland, pp 167–173.
- Lowry O H., Rosebrough N J., Farr A L., Randall R J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 256–275.
- Lucey JA, Tamehana M, Singh H, Munro PA. (2000). Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono-delta-lactone. *J Dairy Res.* 67(3), 415-27.
- Mahieu H., Luquet F.M., Mouillet L. (1976). A propos de la teneur des laits individuels et de mélange en matières minérales et urée. *Le lait*, N° 559-560, 657-698.
- Manfredi A., Ådnøy T. (2012). Génétique des caprins laitiers. *INRA Prod. Anim.*, 25 (3), 233-244.
- Mann I. (1963). Les glandes. In. *Traitements et utilisation des sous-produits*. Collection FAO.
- Marchin S, Putaux JL, Pignon F, Léonil J. (2007). Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultras-small-angle x-ray scattering. *J Chem Phys.*28 ; 126 (4), 451-501.
- Martin P. (1984b). Influence du degré de phosphorylation de la pepsine A bovine sur son activité enzymatique. *Biochimie*, 66 (5), 371-384.
- Martin P., Corre C. (1984). Fractionation of the multiple forms of bovine gastricaspartic proteases by chromatofocusing. *Analytical Biochemistry*, 143 (2), 256-264.

- Martin P. (2015). Les protéases abomasales. In : Présures et coagulants de substitution. Collin J C. Ed, Quae. Pp 61-76.
- Masoodi TA, Shafi G. (2010). Analysis of casein alpha S1 & S2 proteins from different mammalian species. *Bioinformation* 4, 430–5
- Mayer H K., Fiechter G. (2012). Physical and chemical characteristics of sheep and goat milk in Austria. *International Dairy Journal*, 24, 57-63.
- McSweeney P. Olson L H., Fox N F., Healy P F., Hojrup A. (1993). Proteolytic specificity of chymosin on bovine α s1-casein. *J. Dairy Res.*, 60, 401-412.
- Mercier J.C. (1981). Phosphorylation of caseins. Present evidence for an amino acid triplet code post-translationally recognized by specific kinases. *Biochimie*, 63, 1-17.
- Mietton B. (2015). Description, choix des préparations enzymatiques coagulantes et éléments de maîtrise. In : Présures et coagulants de substitution. Collin J.C. Ed, Quae. Pp 103-142.
- Mietton B., Desmazeaud M., De Roissard H., Weber F. (1994). Transformation du lait en fromage, Chap IV-3. In : Bactéries lactiques II. Ed. Loriga, 55-133.
- Mollé D., Léonil J. (1995). Heterogeneity of the bovine κ -casein caseinomacropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chrom. A*, 708, 223-230.
- Mora-Gutierrez A., Kumosinski T.F., Farrell H.M. (1991). Quantification of α s1-casein in goat milk from French-Alpine and Anglo-Nubian breeds using reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, 74, 3303-3307.
- Mora-Gutierrez A., Farrell H. M. Jr., Attaie R., McWhinney V. J., Wang C. (2007). Influence of bovine and caprine casein phosphopeptides differing in α S1-casein content in determining the absorption of calcium from bovine and caprine calcium-fortified milks in rats. *J. Dairy Res.* 74:356–366.
- Morgan F, Massouras T, Barbosa M, Roseiro L, Ravasco F, Kandarakis I, Bonnin V, Fistakoris M, Anifantakis E, Jaubert G, Raynal-Ljutovac K. (2003). Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Rumin Res*, 47, 39–49.
- Mucchetti G., Bonvini B., Remagni M.C., Ghiglietti R., Locci F., Barzaghi S., O’Sullivan L., Ross R.P., Hill C., Francolino S., Perrone A., Rubiloni A., Campo P., Gatti M. and Carminati D. (2009). Influence of cheese-making technology on composition and microbiological characteristics of Vastedda cheese. *Food Control*, 19, 119-125.
- Mũnoz R., García J L., Carrascosa A V., Gonzalez R. (2004). Cloning of the authentic bovine gene encoding pepsinogen A and its expression in microbial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2588–2595.

- Nàjera A I., de Renobales M., Barrona L J R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, 80, 345–352.
- Neyers F. (2013) Les fondamentaux fromagers : simplifier pour mieux comprendre. Deuxième partie : préparer le caillé pour en faire « tout un fromage ». *Revue des ENIL* n° 325, Mai - Juin.
- O’Leary P A., Fox P F. (1975). A procedure for the isolation of gastric enzymes. *Journal of Dairy Research*, 42, 445–45.
- Ono T., Obata, T. (1989). A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits. *J. Dairy Res*, 56, 453-461.
- Ould-Eleya M M., Desobry-Banon S., Vétier N., Hardy J. (1995). Étude rhéologique des gels acides de laits de vache, de chèvre et de brebis. *Le Lait* 78, 453-459.
- Pellegrini O., Remeuf F., Rivemale M. (1994). Évolution des caractéristiques physico-chimiques et des paramètres de coagulation du lait de brebis collecté dans la région de Roquefort. *Le Lait*, INRA Editions, 74 (6), 425-442.
- Pierre A., Michel F., Le Graet Y. (1995). Variation in size of casein micelle of goat milk related to casein genotype. *Le Lait* 75, 489-502.
- Pirisi A., Piredda G., Papoff C.M., Di Salvo R., Pintus S., Garro G., Ferranti P., Chianese L. (1999). Effects of sheep α 1-casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties. *J. Dairy Res*, 66, 409–419.
- Pisano A., Packer N H., Redmond J W., Williams K L., Gooley A A. (1994). Characterization of O-linked glycosylation motifs in the glycopeptide domain of bovine κ -casein. *Glycobiology*, V4, (6-1), 837–844.
- Preetha S., Boopathy R. (1997). Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13, 573-578.
- Ramet JP. (1985). Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudi Arabia, rapport de mission, FAO, Rome, 1-173.
- Ramet JP. (1993). La technologie des fromages au lait de dromadaire. Monographie. Étude FAO Production et santé animale n° 113. Rome : FAO, 116 pp
- Ramet J.P. (1997). Les agents de la transformation du lait. In. *Le FROMAGE de la science à l'assurance qualité*. 3 Ed. A. Eck et J. C Gillis. Tec et Doc. Lavoisier.
- Ramet JP. (2011). Outils et perspectives en filière ovine laitière : fruits de 5 ans de recherche. *Bulletin INRA*.

- Ramos M., Juarez M. (2003). Sheep milk. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, V (4). Academic Press, Amsterdam, the Netherlands, pp. 2539–2545.
- Rampilli M., Larsen R., Harboe M. (2005). Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *International of Dairy journal*, 15, 1130-1137.
- Raynal-Ljutovac K., Pirisi A., De Cremoux R., Gonzalo C. (2007). Somatic cells of goat and sheep milk: analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Rumin Res*, 68, 126–144.
- Remeuf F., Lenoir J., Duby C. (1989). Étude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Le Lait* 69, 499-518.
- Remeuf F., Cossin V., Dervin C., Lenoir J., Tomassone R. (1991) Relations entre les caractéristiques physicochimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Lait* 71,397-421.
- Remeuf F. (1993). Influence du polymorphisme génétique de la caséine $\alpha 1$ caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait. *Le Lait* 73, 594-557.
- Richardson E.A., Seeley S.D., Walker D.R. (1974). A model for estimating the completion of rest for ‘Redhaven’ and ‘Elberta’ peach trees. *Hort Science* 9, 331-332.
- Risso P H., Relling V M., Armesto M S., Pires M S., Gatti C.A. (2007). Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles. *Colloid and Polymer Science*, 285 (7), 809-817.
- Rollema HH. (1992). Casein association and micelle formation. In: *Advanced dairy chemistry-1: Proteins*. Fox P. F. (Ed.), Elsevier Applied Science, London, UK, 111-140.
- Rondia P., Blecker Ch., Romnée J-M., Laloux J., Bartiaux-Thill N. (2003). Détermination d’un rendement fromager de laboratoire en relation avec les caractéristiques chimiques de laits de brebis. *Renc. Rech. Ruminants*, 10, 234.
- Rowland J. (1938). The determination of the nitrogen distribution in milk. *J. Dairy Res*, 9, 42-46.
- Schmidt D.G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In: Fox P.F. & Sweeney P.L.H. editors. *Development in Dairy Chemistry*, vol. 1. London: Applied Science, pp. 61-86.
- Schmidt D.G. (1980). Colloïdal aspects of casein. *Neth. Milk Dairy J.* 34 – 42
- Slamani R., Bellal MM. (2015). Recherche de succédanés de présure dans un coproduit d’abattage : les Caillettes Ovines. *Rech Agr*, V 2, N° 27, 130-138.

- Slamani R., Labadi R., Errahmani M.B., Bellal M.M. (2018). Purification and characterisation of milk-clotting and caseinolytic activities of pepsin isolated from adult sheep abomasa. *Inter J of Dairy Technology*, Vol 71 (3), 764-770.
- Storry JE., Grandison AS., Millard D., Owen A J., Ford GD. (1983). Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *J Dairy Res*, 50, 215-229.
- Suzuki M., Narita Y., Oda S-I., Moriyama A., Takenaka O., Kageyama T. (1999). Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 122, 453-460
- Swaigood H E. (1992). Chemistry of the caseins. In *Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins*. P. F. Fox, ed. Elsevier Applied Science, New York, NY. Pp 63-110
- Valles E., Furet UP. (1977). Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine. I. Méthodes d'extraction. *Le Lait*, Nov-Dec 569-570.
- Vanbergue E., Barillet F., Allain C., Autran P., Aurel M.R., Duvallon O., Portes D., Dessauge F., Boutinaud M., Dzidic A., Marnet P.G. (2013). Aptitude des brebis laitières de race Lacaune à la conduite en mono-traite : Premiers éléments zootechniques et physiologiques. *Renc. Rech. Rum*, 20, 281-284.
- Verissimo P., Faro C., Moir A J G., Lin Y., Tang J., Pires E. (1996). Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cunrunculus* L. *Eur J. Biochem.*, 235, 762-768.
- Virto M., Chavarri F., Bustamante MA., Barron LJR., Aramburu M., Vicente MS., Perez-Elortondo F.J., Albis M., de Renobales M. (2003). Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and flavour. *Int. Dairy J.* 13, 391-399.
- Vétier N., Banon S., Ramet J.P, Hardy J. (2000). Hydratation des micelles de caséine et structure fractale des agrégats et des gels de lait. *Le Lait*, INRA Editions, 80 (2), .237-246.
- Walstra P. (1999). Casein sub-micelles, do they exist? *Int. Dairy J*, 9, 189-192.
- Walstra P. (1997). Casein sub-micelles, do they exist? *Hannah Symposium Caseins and Caseinates, Structures, Interactions, Networks*. Ayr, Écosse, Royaume-Uni, 21-23 mai.
- Walstra P. (1990). On the Stability of Casein Micelles. *J Dairy Science*, 73 (8), 1965-1979.

ANNEXES

ORIGINAL
RESEARCH

Purification and characterisation of milk-clotting and caseinolytic activities of pepsin isolated from adult sheep abomasa

ROSA SLAMANI,¹ REDOUANE LABADI,² MOHAMED BRAHIM
ERRAHMANI^{3*}  and MOHAND MOULOUD BELLAL²

¹Food Technology Laboratory, National Institute of Agronomic Research (INRAA), Algiers, ²Department of Food Technology and Human Nutrition, National School of Agronomy (ENSA), Algiers, and ³Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Blida 1 University, Blida, Algeria

Ovine pepsin was isolated and assessed for its milk-clotting properties and caseinolytic activity in comparison with commercial chymosin. Ovine pepsin showed similar responses to variations in pH, temperature and CaCl₂ concentration of milk compared with chymosin, although its pH sensitivity was higher. SDS-PAGE electrophoretic analysis of the casein fractions treated with ovine pepsin showed that alpha-casein was more susceptible to proteolysis than beta-casein, in contrast to chymosin. Curd-firming properties of skim milk gels obtained with ovine pepsin and chymosin were evaluated by Gelograph under the same conditions. Curd produced using ovine pepsin was less firm than that made with chymosin.

Keywords Ovine pepsin, Chymosin, Purification, Clotting properties, Casein hydrolysis.

INTRODUCTION

Traditional varieties of Algerian cheeses, such as Jben of Djelfa and Kamaria of Ghardaïa, are produced by curdling ovine and caprine milk using artisanal lamb and kid rennet.

In recent years, the increase in cheese production in these regions in conjunction with insufficient artisanal coagulant production to supply the demand of the cheese manufacture has led to the use of commercial chymosin as an alternative milk-clotting agent. However, the curd obtained with chymosin is more firm than that made with lamb rennet, affecting its rheological properties and impairing the sensory properties of these types of cheeses.

Several studies on artisanal rennet preparations have indicated that proteolysis and lipolysis activities during cheese manufacturing and ripening were responsible for specific quality of farm-produced cheeses (Calvo *et al.* 2007; Pirisi *et al.* 2007). On the other hand, Moatsou *et al.* (2004) considered that the chymosin-to-pepsin ratio in traditional rennet was the critical parameter for the physicochemical and proteolytic

characteristics of Feta cheese and not the rennet origin (bovine, caprine or ovine). Variation in the proportion of chymosin to pepsin will make the ratio of milk-clotting activity to proteolytic activity vary.

The use of commercial chymosin with specific proteolytic activity involves the formation of a strong curd along with high cheese yield, but the off-flavours often associated with excess proteolysis are absent (Muñoz *et al.* 2004). Pepsin, naturally present in rennet, has a lower specific milk-clotting activity with a broader proteolytic activity than chymosin. Proteolysis contributes to the development of homogeneous structure and softer texture. Characteristic flavours formed by degradation action on alpha- and beta-caseins during coagulation and ripening establish the sensory value of cheese (Prieto *et al.* 2004; Tejada *et al.* 2008).

Thus, it is worthwhile investigating the characteristics of pepsin isolated from adult sheep abomasa as a source of enzymes to be used in cheesemaking as alternatives to recombinant chymosin. In this study, the isolation, purification and characterisation of ovine pepsin are reported.

*Author for correspondence. E-mail: m.brahim.errahmani@univ-blida.dz; brahim_errahmani@hotmail.com

MATERIALS AND METHODS

Milk-clotting enzymes

Milk-clotting enzymes such as ovine pepsin and commercial chymosin were used in this study. Ovine pepsin was isolated from the abomasa of adult sheep of a local breed slaughtered in registered abattoirs at different ages (>6 months old).

Commercial chymosin powder produced by fermentation with *Aspergillus niger* var. *awamori* CHY-MAX NB was supplied by Chr Hansen A/S (Hørsholm, Denmark). Its strength in international milk-clotting units was 1400 IMCU/g.

Ovine pepsin extraction and purification

Purified ovine pepsin was obtained according to the following procedure. The crude extract of ovine pepsin was prepared by soaking minced tissue of sheep abomasa in 0.2 M HCl solution (Valles and Furet 1977) at a ratio of 8:10 (w/v), and macerated at 35 °C for 72 h. The homogenate filtered through gauze was centrifuged at 3500 g for 20 min, and the supernatant was filtered again through folded standard filter paper. The pH of the filtrate was raised to 6.0 by adding NaOH, and then it was dialysed overnight at 4 °C against distilled water, and finally lyophilised.

The lyophilised extract dissolved in a minimal volume of 0.02 M sodium phosphate buffer at a pH of 6.0 was applied onto a DEAE-cellulose column (20 × 2.5 cm) previously equilibrated with the same buffer. After the column was washed with phosphate buffer until the A_{280} of the eluate reached baseline, the elution was performed by stepped gradient elution mode employing increasing concentrations from 0.3 to 0.5 M NaCl in 0.02 M sodium phosphate buffer at a pH 6.0, with a flow rate of 80 mL/h (O'Leary and Fox 1975). Eluted fractions of 5 mL were collected and analysed for protein content by their A_{280} and milk-clotting activity. Fractions showing activity were pooled, dialysed free of NaCl against 0.02 M sodium phosphate buffer at a pH of 6.0 with the dialysis buffer being changed twice and concentrated by evaporation.

The concentrated fraction was applied on the top of a column (50 × 1.5 cm) of Sephadex G-100 equilibrated with the 0.02 M sodium phosphate buffer at a pH of 6.0. Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 10 mL/h, and the collected fractions (2 mL) were assayed for their A_{280} and milk-clotting activities. The active fractions were pooled and concentrated.

The protein concentration of the crude extract and fractions of each chromatographic purification step were determined by the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as the standard.

The homogeneity of the ovine pepsin during all the stages of purification was verified by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 4% (w/v) stacking and 12% (w/v) resolving gels according to the

method of Laemmli (1970). After electrophoretic migration, the gels were stained using R-250 Coomassie brilliant blue.

Milk-clotting activity and characterisation

Total milk-clotting activity was determined by the method of Berridge (1952) using standardised reconstituted skim milk as the substrate (12 g of commercial low-heat skimmed milk powder in 100 mL of 0.01 M CaCl₂, pH 6.5, incubated for 30 min at 30 °C). The assay was performed by adding 1 mL of enzyme to 10 mL of the Berridge substrate. The milk-clotting time was determined by manually rotating the test tube periodically at short intervals and checking for visible clot formation. The milk-clotting activity was defined as the amount of enzyme required to coagulate 10 mL of substrate at 32 °C in 100 s. The results were expressed in international milk-clotting units IMCU/mL of enzyme.

Physicochemical factors affecting ovine pepsin activity were evaluated by measuring the relative activity on the milk substrate at various coagulation temperatures (28–65 °C), at various pH values of milk (5.0–7.0) and with various amounts of CaCl₂ added (0–0.05 M). This investigation was carried out in comparison with the milk-clotting properties of recombinant chymosin. The solutions of both ovine pepsin and chymosin were prepared with equivalent IMCU/mL, and the effect of each individual factor was examined by keeping the other factors constant (pH at 6.5, temperature at 32 °C and CaCl₂ concentration at 0.01 M).

Casein proteolysis specificity assay

Hydrolysis of α -, β - and k-caseins was carried out according to the method described by Muñoz *et al.* (2004). α -, β - and k-caseins (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were dissolved in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 at a final concentration of 2 mg/mL and incubated overnight at 32 °C independently with ovine pepsin and recombinant chymosin at ratio of 1:10 (v/v). Both milk-clotting enzymes were previously standardised to equal time clotting (5 min). At the end of incubation period, the reaction was quenched by heating at 100 °C for 5 min. The hydrolysis profiles were visualised by SDS-PAGE using 15% (w/v) polyacrylamide gels and performed in a vertical gel apparatus (Mini-Protean; Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Gel firmness assessment

Gelograph instrument (Gel Instrumente AG, Thalwil, Switzerland) based on the near-infrared light absorption and scattering in the coagulating milk was used to compare the firmness of milk gels that were made using ovine pepsin and chymosin. The clotting time (R , s), cutting time (s), gel firming rate (GFR, GU/s) and maximum gel firmness (A_{max} , GU) were the coagulation parameters measured in coagulating milk substrate. The clotting time was the time from enzyme addition to the first appearance of an increase in viscosity of the coagulated milk. The cutting time was

established as twice the clotting time. Gel firming rate was the rate of change in the firmness of clotted milk at the clotting and cutting times. Gel firming rate was obtained by dividing the difference in firmness at cutting and clotting times by the time difference between these two points (Nájera *et al.* 2009). The maximum gel firmness was evaluated at the amplitude width 40 min after *R*.

Before starting the experiments, reconstituted bovine milk (Berridge substrate) was equilibrated for 20 min at 32 °C in a water bath, and pH was adjusted to 6.5. Clotting enzymes previously diluted to give equal clotting time (≈ 10 min) were added to milk and mixed thoroughly for 15 s. The probe of Gelograph was lowered into the test tube and placed in a fixed position. Curd firmness was evaluated for 60 min.

Statistical analysis

Coagulation parameters were determined on six measures in duplicate. The average cutting time (s), gel firming rate (GFR, GU/s) and maximum gel firmness (A_{\max} , GU) were compared using Student's *t*-test for samples using ovine pepsin and chymosin. The sampling variability was estimated by calculating the relative standard deviation (RSD), also known as the coefficient of variation, estimated as $RSD = 100(\sigma/x)$, where σ is the standard deviation and x the mean of the variable. The analysis was performed using Statistica 10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of purified ovine pepsin

The crude extract from the abomasa of adult sheep showed a milk-clotting activity of 5–7 IMCU/mL and a protein concentration of 20–30 mg/mL, giving a specific activity of 0.2 IMCU/mg of protein. It was evident that the crude extract showed a lower specific activity because of the protein value that was found. The high amount of protein in the crude extract was the result of the extraction process being performed at an acidic pH (≈ 2) for 3 days, which caused a disintegration of the abomasal tissue and the release of a considerable amount of inert protein into the extraction solution (Germonville 2003).

The results of the purification are summarised in Table 1.

The ovine pepsin could be purified 49-fold with an overall recovery of 107%, and the specific activity improved to 31 IMCU/mg.

The elution profile on DEAE-cellulose is shown in Figure 1(a). Elution carried out with 0.3 M NaCl in 0.02 M sodium phosphate buffer at a pH 6.0 removed a large amount of material containing no potential milk-clotting activity. Active fractions were eluted by 0.4 M NaCl. These results are similar to those obtained by O'Leary and Fox (1975) who reported that bovine and ovine pepsins were eluted at 0.4 M NaCl in phosphate buffer at a pH of 6.0 with yield of 67% achieved at the end of this step.

The fractions of the active peak applied to the Sephadex G-100 column revealed two spaced chromatographic peaks, and the activity profile was observed mainly in the first peak and continued at the beginning of the second peak (Figure 1b). In their investigation describing the procedure for the isolation of sheep pepsin from aqueous abomasal homogenates by chromatography on a Sepharose 4B-poly-L-lysine column followed by filtration on Sephadex G-100, Fox *et al.* (1977) found a specific activity value approaching 70 U/mg of protein with 120-fold purification factor. Compared with our results, these values are much higher. In contrast, Klomklao *et al.* (2007) purified two pepsins from the stomach of pectoral rattail to homogeneity. The purities of pepsins A and B were increased by 7.1- and 13.0-fold, respectively, with approximately 5.7% and 2.2% yields.

The ovine pepsin analysed by SDS-PAGE at various steps of the purification procedure showed a single band (lane 3), which nearly coincided with the band of recombinant chymosin (Figure 1c). The ovine pepsin band had migrated into the range of 35.6 to 37.0 kDa, and the apparent molecular weight assigned for this protein band was approximately 36 000 Da. This value was in the range of molecular weights normally determined for other aspartyl proteinases and for recombinant bovine chymosin as well (Nosedá *et al.* 2013). Fox *et al.* (1977) reported that the molecular weight of sheep pepsin estimated by gel filtration on Sephadex G-100 was approximately 34 kDa. The apparent molecular weight of ovine pepsin determined by SDS-PAGE is approximately 37 kDa (Baudys *et al.* 1988). Yegin *et al.* (2012) reported that the molecular weight for bovine pepsin was 33.5 kDa. Abuharfeel and Abuereish (1984), using SDS-PAGE, estimated that the molecular weights of both camel pepsins to be 35.5 and 34.7 kDa, respectively.

Table 1 Purification of pepsin from the sheep abomasa.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (IMCU)	Specific activity (IMCU/mg)	Purification factor	Yield (%)
Crude extract	942	273	0.29		100
Step 1: Anion-exchange DEAE-cellulose	8.3	164.5	19.8	68.3	60.2
Step 2: Gel filtration on Sephadex G-100	4.3	133.3	31.2	107.7	48.8

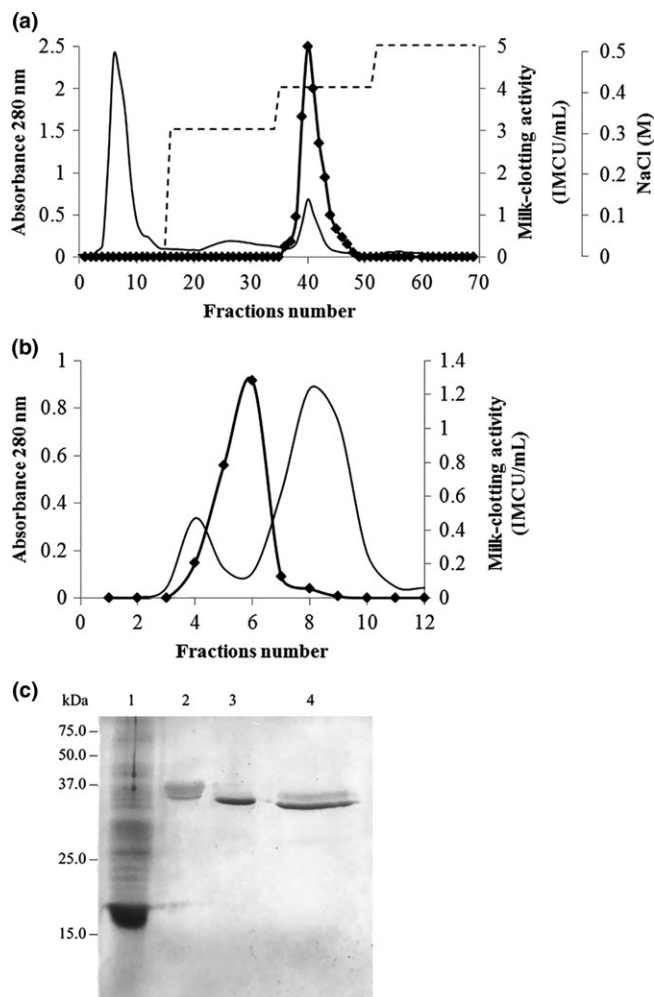


Figure 1 Ovine pepsin purification. (a) Chromatography of the crude extract of ovine pepsin on a DEAE-cellulose column (20 × 2.5 cm) equilibrated with 0.02 M sodium phosphate buffer at a pH of 6.0. Elution of the adsorbed active proteins was performed by stepped gradient elution mode employing increasing concentrations from 0.3 to 0.5 M NaCl in 0.02 M sodium phosphate buffer at a pH of 6.0 with a flow rate of 80 mL/h. (b) Chromatography of the pooled active fractions from DEAE-cellulose on a Sephadex G-100 column (50 × 1.5 cm) in 0.02 M sodium phosphate buffer at a pH of 6.0. (—) Absorbance at 280 nm; (◆) milk-clotting activity; (- - -) NaCl concentration. (c) SDS-PAGE analysis of ovine pepsin at each step of the purification. The gel was stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1: crude extract of ovine pepsin; lane 2: active fractions from chromatography on a DEAE-cellulose; lane 3: purified ovine pepsin from chromatography on a Sephadex G-100; lane 4: commercial recombinant chymosin (control); lane Mr (kDa): molecular weight protein markers.

Optimum temperature, pH and CaCl₂ concentration for milk-clotting activity

The relative milk clotting was studied as a function of the temperature of the milk substrate at pH 6.5 with 0.01 M of CaCl₂. Figure 2(a) shows that ovine pepsin and chymosin were strongly affected by the milk temperature. The optimum

clotting activities were obtained for both enzymes at 44 °C, and the activities of ovine pepsin and chymosin were completely lost when the temperature was increased to 52 °C. These results were in good agreement with those reported for the other acidic proteinases. The highest activities of chymosin and pepsins extracted from different animal sources were observed within the temperature range of 40–45 °C, and up to these values, the milk-clotting activity was considerably reduced (Elagamy 2000). Coagulation temperature affects both the primary (enzymatic hydrolysis) and secondary (aggregation reaction) phases of the milk coagulation (Castillo *et al.* 2000), but it also markedly affects the rate of protein aggregation (Nájera *et al.* 2003; Anema *et al.* 2007).

The relative milk clotting was studied as a function of the pH of the milk substrate, at 32 °C with 0.01 M of CaCl₂ (Figure 2b). The milk-clotting activities of ovine pepsin and chymosin increased with a decrease in the pH (6.5 to 5.7). Increasing pH values (from 6.5 to 6.9) caused considerable losses of activity for both enzymes (40% and 71% for chymosin and ovine pepsin, respectively). The sensitivity of ovine pepsin to pH variations was considerably higher than the sensitivity of chymosin, which was still active at a pH of 6.8. At pH values reaching 6.8, ovine pepsin failed to coagulate milk. Castillo *et al.* (2000) reported a similar decline in activity near neutrality. This difference in the loss of activity between ovine pepsin and chymosin was probably related to the acidic character of pepsin and its lower pH stability. Pepsin shows a maximum activity at a pH of approximately 2 (Tanji *et al.* 2007), while recombinant bovine chymosin shows a maximum activity at a pH of 5.5 (Noseda *et al.* 2013).

The relative milk clotting was also studied as a function of CaCl₂ concentration added to the milk substrate, at pH 6.5 and 32 °C (Figure 2c). It was observed that the milk-clotting activities of ovine pepsin increased identically with an increase in the calcium chloride concentration. When the concentration of CaCl₂ reached 0.05 M, the relative activities of pepsin and chymosin were found to be 273 and 300%, respectively. This result was in agreement with the studies of many investigators into the influence of calcium on rennet-induced coagulation (Udabage *et al.* 2000; Rogelj *et al.* 2001). The enrichment of milk with calcium increased the casein aggregation rate during the renneting process and consequently reduced the flocculation time. This is related to the combined effect of the increased calcium concentration as such and the decrease in the pH by the exchange of Ca²⁺ and H⁺ (Solorza and Bell 1998). Moreover, Mohamed Ahmed *et al.* (2010) explained that the positive effect of CaCl₂ upon the milk-clotting activity is likely to be a result of the effect of this salt upon the substrate conformation as well as its role as a catalyst for the enzyme.

Enzymatic hydrolysis of casein fractions

Figure 3 shows the profile of hydrolysis of α -, β - and k-caseins after overnight incubation at 32 °C in the presence

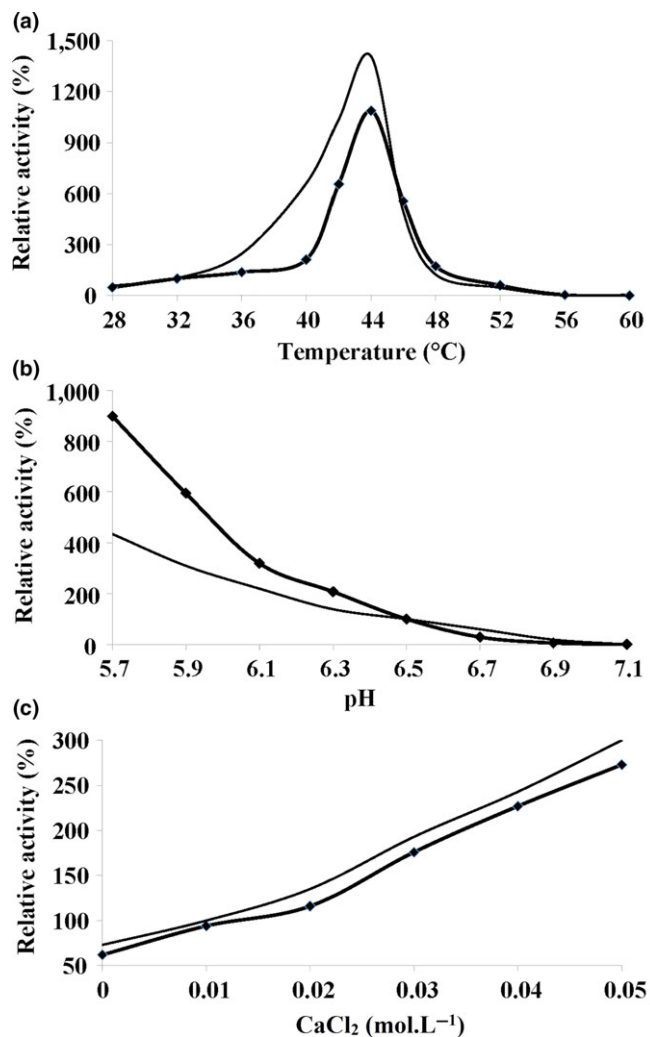


Figure 2 Characterisation of the milk-clotting activity of purified ovine pepsin. Effects of (a) substrate temperature (28–60 °C), (b) substrate pH (range 5.7–7.1) and (c) CaCl₂ addition (0–0.05 M) on the relative milk-clotting activity of ovine pepsin (●) in comparison with recombinant chymosin (–). The results are expressed as the relative activity as a percentage of the activity measured on the standardised reconstituted skim milk substrate (0.01 M CaCl₂, pH 6.5) at 32 °C.

of ovine pepsin and in the presence of recombinant chymosin separately. Both proteases showed the ability to digest all the three types of caseins, and a considerable difference was observed in the peptide pattern of α - and β -caseins. The same peptide pattern was obtained for both enzymes with κ - and α -caseins, although the degree of hydrolysis of α -casein by ovine pepsin was more than that of chymosin. In contrast, β -casein was less susceptible to proteolysis than α -caseins with ovine pepsin than with chymosin. This finding was in agreement with the results reported by Irigoyen *et al.* (2000) who observed that α -casein was more intensely hydrolysed than β -casein by a bovine renneting process. Previously, comparing proteolysis

of β -casein by two rennets that contained different proportions of chymosin and pepsin, Medina *et al.* (1992) observed that the rennet with the higher chymosin content resulted in higher breakdown of the β -casein. In the present study, the order of hydrolysis obtained with ovine pepsin was κ -casein, α -casein and β -casein.

Gelling properties of clotting enzymes

The coagulation parameters (Table 2) were compared using Student's *t*-test with milk clotted with ovine pepsin and chymosin. The cutting times (C_t) and the maximum gel firmness (A_{max}) were found to be comparable ($P = 0.58$ and $P = 0.09$, respectively). Only the gel firming rate (GFR) seemed to be slightly higher ($\approx 13\%$) in milk clotted with chymosin but not significantly ($P = 0.05$).

The relative standard deviations (RSD), which highlight the data variability, remained low in both samples (with ovine pepsin and chymosin) for C_t (3.8 and 4.1%, respectively), A_{max} (7.3 and 8.3%) and GFR (7.7 and 11.6%), which showed a slightly higher variability for GFR in milk clotted with chymosin.

Gel firmness profile as a function of time for milk clotted with ovine pepsin and chymosin is presented in Figure 4. Each curve shows the mean value of six curve tests achieved in the same conditions. The curves of the progress of the action of both milk-clotting enzymes on reconstituted bovine milk had a similar pattern, whereas differences in the rate of curd firming and maximum gel firmness values were observed. Ovine pepsin produced gel firmness about 8% less than milk treated with recombinant chymosin. The rate of curd firming obtained with ovine pepsin was slightly slower than that obtained with chymosin, which consequently, under same protein content, have shown that the effect of

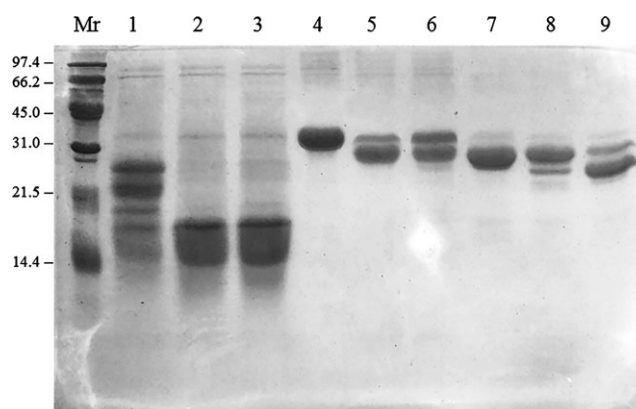


Figure 3 SDS-PAGE pattern of κ -, α - and β -caseins treated with purified ovine pepsin or recombinant chymosin after overnight incubation at 32 °C. Lanes 1, 4 and 7: unhydrolysed κ -, α - and β -caseins (control), respectively. Lanes 2, 5 and 8: hydrolysed κ -, α - and β -caseins by ovine pepsin. Lanes 3, 6 and 9: hydrolysed κ -, α - and β -caseins by chymosin. Lane Mr: molecular weight protein markers (Low-Range SDS-PAGE Standards; Bio-Rad).

Table 2 Comparison of the coagulation parameters (mean \pm SE) with milk clotted with ovine pepsin (Pep) and chymosin (Chym).

Coagulation parameters	Pep	Chym	P
C_t (s)	648 \pm 10	640 \pm 11	0.58
A_{max} (GU)	593 \pm 18	646 \pm 22	0.09
GFR (GU/s)	0.30 \pm 0.01	0.34 \pm 0.02	0.05

C_t : cutting time, A_{max} : maximum gel firmness, GFR: gel firming rate.

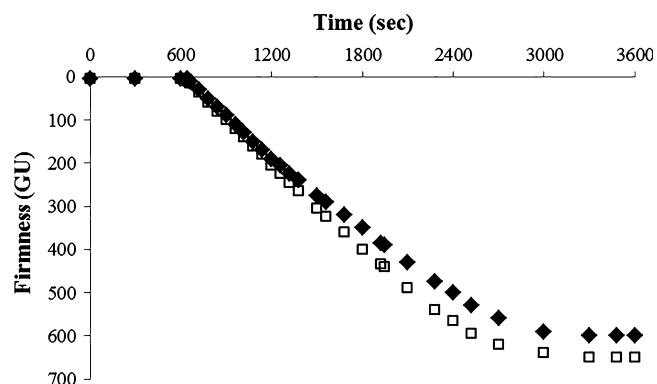


Figure 4 Typical curve of Gelograph measurements on reconstituted skim milk sample clotted with ovine pepsin (\blacklozenge) as compared to commercial chymosin (\square).

clotting enzyme type on curd formation was in the limit of significance ($P = 0.05$). Previously, Andr n and von Reedt (1990) had reported that, because of its strong pH dependence, pepsin can induce long gelling time and can weaken the curd when the pH is too high. Recently, Harboe *et al.* (2010) noted in a typical range of pH 6.4–6.6 that pH influence on curd-firming properties is more significant with bovine pepsin than with chymosin. Esteves *et al.* (2003), who studied gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin, explained that cardoon coagulants hydrolyse most of the caseins compared with chymosin and thus increase the rate of gel firming, probably by removing peptides that may act as a barrier to particle fusion. These plant coagulants also decrease the maximum value of the modulus, due to the reduction in the amount of intact gel-forming protein. In our study, the varying degree of primary hydrolysis of α - and β -caseins between ovine pepsin and chymosin probably affected the rheological properties of the resulting gel. The α -casein breaks down the products by pepsin or unhydrolysed β -casein, which may slightly hinder the aggregation of micelles and slow down the rate of gel firming.

CONCLUSIONS

An active extract of ovine pepsin was obtained from adult sheep abomasa by maceration in acidic solution. The crude

extract revealed a specific activity of 0.2 IMCU/mg of protein. The purification of ovine pepsin realised by a conventional procedure involved ion-exchange chromatography and gel filtration. This procedure yielded a homogeneous enzyme with a molecular weight of 36 kDa and improved the specific activity to 31 IMCU/mg. The milk-clotting activity of purified ovine pepsin was affected by three factors: pH, temperature and CaCl_2 addition. Optimum clotting activity was at 44 $^\circ\text{C}$, increasing CaCl_2 concentration resulted in an enhancement of the clotting activity of ovine pepsin, and it showed higher pH sensitivity. Ovine pepsin clotted skim milk with slightly slower rate of curd firmness compared with chymosin, which made the curd less firm. This slight difference in curd formation ability between the enzymes probably correlates with their proteolytic activity on α - and β -casein fractions. The hydrolytic activity of ovine pepsin on α -casein seems to have been different when compared with chymosin.

The above results show the clotting properties of ovine pepsin and indicate its usefulness in cheese production, but it will be important to investigate enzyme action during the manufacturing process and evaluate its impact on cheese sensory and yield.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Dr. P. Laraba (Dean of the Faculty of Biology at the Algerian University of Sciences and Technology, USTHB) for her kind interest in this investigation and for her technical help. The authors also thank Ms F. Zouay and Ms A. Zitouni for making available the Mini Protean III cell and electrophoresis reagents.

REFERENCES

- Abuharfeel N M and Abuereish G M (1984) Isolation and characterization of camel pepsins. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **77**(1) 175–182.
- Andr n A and von Reedt C (1990) The effects of chromatographically pure bovine chymosin and pepsin A on cheese curd firmness. *Journal of Dairy Research* **57** 109–117.
- Anema S G, Lee S K and Klostermeyer H (2007) Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of j-casein and the gelation of skim milk by chymosin. *Food Science and Technology* **40** 99–106.
- Baudys M, Erden T G, Kostka V, Palvik M and Foltman B (1988) Comparison between prochymosin and pepsinogen from lamb and calf. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* **89**(2) 385–391.
- Berridge N J (1952) An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *Journal of Dairy Research* **9** 328–329.
- Calvo M V, Castillo I, Díaz-Barcos V, Requena T and Fontecha J (2007) Effect of a hygienized rennet paste and a defined strain starter on proteolysis, texture and sensory properties of semi-hard goat cheese. *Food Chemistry* **102** 917–924.
- Castillo M, Payne F A, Hicks C I and Lopez M B (2000) Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse

- reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal* **10** 551–562.
- Elagamy E I (2000) Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: a comparison with buffalo rennet. *Journal of Dairy Research* **67** 73–81.
- Esteves C L C, Lucey J A, Wang T and Pires E M V (2003) Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *Journal of Dairy Science* **86** 2558–2567.
- Fox P F, Whitaker J R and O'Leary P A (1977) Isolation and characterization of sheep pepsin. *Biochemistry Journal* **161** 389–398.
- Germonville A (2003) *Agents coagulants. ed. Techniques de l'ingénieur*. Vol. 3, pp 1–11.
- Harboe M, Broe M L and Qvist K B (2010) The production, action and application of rennet and coagulants. In *Technology of Cheese Making*, pp. 98–125. Law B A, Tamime A Y, eds. London: Wiley-Blackwell.
- Irigoyen A, Izco J M, Ibáñez F C and Torre P (2000) Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **881** 59–67.
- Klomkloa S, Kishimura H, Yab M and Benjakul S (2007) Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* **147** 682–689.
- Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227** 680–685.
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L and Randall R J (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193** 256–275.
- Medina M, Gaya P, Guillén A M and Núñez M (1992) Characteristics of Burgos and Hispanico cheeses manufactured with calf rennet or with recombinant chymosin. *Food Chemistry* **45** 85–89.
- Moatsou G, Moschopoulou E, Georgala A, Zoidou E, Kandarakis I, Kaminarides S and Anifantakis E (2004) Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese. *Food Chemistry* **88** 517–525.
- Mohamed Ahmed I A, Babiker E E and Mori N (2010) pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *LWT - Food Science and Technology* **43** 759–764.
- Muñoz R, García J L, Carrascosa A V and Gonzalez R (2004) Cloning of the authentic bovine gene encoding pepsinogen a and its expression in microbial cells. *Applied and Environmental Microbiology* **70** 2588–2595.
- Nájera A I, de Renobales M and Barrona L J R (2003) Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry* **80** 345–352.
- Nájera A I, Barrona L J R, Ribeiro P *et al.* (2009) Seasonal changes in the technological and compositional quality of ewe's raw milks from commercial flocks under part-time grazing. *Journal of Dairy Research* **76** 301–307.
- Noseda D G, Recúpero M N, Blasco M, Ortiz G E and Galvagno M A (2013) Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter. *Protein Expression and Purification* **92** 235–244.
- O'Leary P A and Fox P F (1975) A procedure for the isolation of gastric enzymes. *Journal of Dairy Research* **42** 445–45.
- Pirisi A, Pinna G, Addis M *et al.* (2007) Relationship between the enzymatic composition of lamb rennet paste and proteolytic, lipolytic pattern and texture of PDO Fiore Sardo ovine cheese. *International Dairy Journal* **17** 143–156.
- Prieto B, Franco I, Fresno J M, González-Prieto J, Bernardo A and Carballo J (2004) Effect of ripening time and type of rennet (farmhouse rennet from kid or commercial calf) on proteolysis during the ripening of León cow milk cheese. *Food Chemistry* **85**(3) 389–398.
- Rogelj I, Perko B, Francky A, Penca V and Pungercar J (2001) Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. *Journal of Dairy Science* **84** 1020–1026.
- Solorza F J and Bell A E (1998) Effect of calcium on the minerals retention and cheese-making parameters of milk. *International Journal of Dairy Technology* **51** 37–43.
- Tanji M, Yakabe E, Kageyama T, Yokobori S I, Ichinose M, Miki K, Ito H and Takahashi K (2007) Purification and characterization of pepsinogens from the gastric mucosa of African coelacanth, *Latimeria chalumnae*, and properties of the major pepsins. *Comparative Biochemistry and Physiology* **146** 412–420.
- Tejada L, Vioque M, Gómez R and Fernández-Salguero J (2008) Effect of lyophilisation, refrigerated storage and frozen storage on the coagulant activity and microbiological quality of *Cynara cardunculus L.* extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88** 1301–1306.
- Udabage P, McKinnon I R and Augustin M A (2000) Effects of mineral salts and calcium chelating agents on the gelation of renneted skim milk. *Journal of Dairy Sciences* **8** 1569–1575.
- Valles E and Furet U P (1977) Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine. I. Méthodes d'extraction. *Le Lait*, Nov–Dec 569–570.
- Yegin S, Goksungur Y and Fernandez-Lahore M (2012) Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. *Food Chemistry* **133** 1312–1319.

RECHERCHE DE SUCCEDANES DE PRESURE DANS UN COPRODUIT D'ABATTAGE : LES CAILLETES OVINES

Slamani R.¹, Bellal M. M.²

¹Division de Technologie Agroalimentaire, CRP Mahdi Boualem, INRAA

²Département de Technologie Alimentaire, INA

RÉSUMÉ

En fabrication fromagère, le caractère irrégulier de l'approvisionnement en présure a conduit à l'emploi de préparation enzymatique d'origines divers, et coagulant le lait de façon similaire à la présure. Parmi ces enzymes, les pepsines extraites de caillettes d'animaux adultes se sont révélées apte à coaguler le lait, mais avec des adaptations technologiques qui permettent de remédier à leurs sensibilités vis-à-vis des variations de pH.

L'utilisation des caillettes ovines comme matière première à la production d'extrait enzymatique offre d'une part la possibilité de fournir un coagulant de remplacement à l'industrie fromagère et d'autre part d'envisager la valorisation de ce coproduit d'abattage.

Dans le présent travail, nous avons étudié le procédé d'obtention de l'extrait coagulant selon quatre protocoles dans le but d'optimiser le rendement d'extraction. Les résultats obtenus montrent que des quatre méthodes d'extractions employées, la macération des broyats de caillettes dans une solution acidifiée s'avère la plus avantageuse. Elle est conduite à une température de 35°C pendant une durée de 96 heures pour un rapport de poids de caillette (g) sur un poids de solution d'acide chlorhydrique (0,2 M) égale à 8 : 10. La caractérisation de cet extrait enzymatique brut de la pepsine ovine présente une activité de 5-7 UP/ ml pour une concentration en protéines qui avoisine les 35 mg/ml.

Mots Clés : pepsine, lait, coagulation, extraction, caillette ovine, valorisation.

ملخص

أدت الطبيعة غير المنتظمة لإنتاج المروبات من نوع البريزور المستعملة عند تخثير الحليب في صناعة الأجبان إلى البحث عن بديل لهذا الأنزيم من معدة الحيوانات المجترة البالغة. من بين هذه الأنزيمات، يعتبر البيبسين أحد البدلاء الذي أظهر إمكانية ترويب الحليب بطريقة مماثلة للبريزور و لكن مع تعديلات تكنولوجية تتوافق مع pH الأمثل لعمل هذا الأنزيم. في هذه الدراسة، قمنا بمحاولة استخراج المستخلص الأنزيمي المخثر للحليب من معدة الأغنام البالغة وذلك بهدف تمييز هذه المادة من جهة و من جهة أخرى. لاستبدال المروبات المستوردة. أربع طرق مختلفة، استخدمت لاستخلاص أنزيم البيبسين من معدة الأغنام و ذلك من أجل إيجاد الظروف المثالية للاستخلاص. وقد أظهرت النتائج أن النقع في المحلول الحمضي هو الأكثر فائدة و ذلك وفقاً للمعايير التالية : وضع وزن وحدة ثمانية غرام من معدة الأغنام في وزن وحدة عشر غرام من محلول حمض الكلوريدريك ذي المولارية 0.2 عند درجة 35 م° لمدة 96 ساء. يتميز هذا المستخلص الأنزيمي الخام لبيبسين الأغنام بنشاط مخثر قدره من 5 إلى 7 وحدة بريزور من أجل تركيز البروتين بحوالي 35 مغ/مل.

الكلمات الدالة : بيبسين الأغنام، الحليب، التخثير، الاستخلاص، التمييز، التثمين.

INTRODUCTION

L'Algérie qui reste dépendante en matière d'approvisionnement en agents coagulants vis à vis des laboratoires étrangers, a recours à l'importation de ces produits en vue de leur utilisation dans la fabrication de deux types de fromages : le Camembert et l'Edam.

Pendant la période 1997-2001, l'industrie fromagère a utilisé 4.324 kg de présure et ses concentras, soit un coût de l'ordre de 16 millions de DA (Statistiques du Commerce Extérieur, 2002).

Par ailleurs, l'Algérie dispose d'un potentiel de coproduits d'abattage très variés. A titre indicatif, en 1999, 1.619.488 têtes du cheptel ovin ont été abattues. Cette opération d'abattage permettait ainsi, d'obtenir en plus de la carcasse, un ensemble de coproduits dont une grande partie serait utilisée directement en alimentation humaine. Néanmoins, aucune voie de valorisation en vue d'une meilleure exploitation n'a été envisagée à ce jour.

Parmi les voies de valorisation des coproduits d'abattage d'ovins, la production d'enzymes coagulants le lait à partir de la caillette constitue un exemple d'intérêt. En effet, le principal agent coagulant le lait est la présure, dont l'utilisation est confrontée à la contrainte de sacrifice des jeunes veaux. En conséquence l'industrie fromagère subit une crise dans l'approvisionnement de ce coagulant. Cette situation a donné une impulsion aux recherches sur les enzymes de remplacement de la présure (Ramet, 1997).

A l'heure actuelle, les coagulants appartenant au groupe de pepsines issus des

caillettes bovines, de muqueuses gastriques de porc, du proventricule du poulet sont largement employés en fromagerie dans de nombreux pays.

Par ailleurs, la préparation industrielle de la présure et de ses substituts est réalisée par macération des muqueuses gastriques dans des solutions salines de chlorure de sodium ou bien par autodigestion au moyen d'eau acidifiée par l'acide chlorhydrique.

Ce travail illustre les conditions optimisées d'obtention d'un extrait enzymatique coagulant à partir de caillettes ovines et discute les possibilités de sa production industrielle.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les caillettes d'ovins adultes ont été prélevées au niveau de l'abattoir d'El Harrach, puis transportées au laboratoire où elles ont été lavées, dégraissées, débarrassées de leurs parties pyloriques et broyées. Les broyats de caillettes homogénéisés ont été, ensuite, conservés au congélateur à - 18°C. L'obtention de l'extrait enzymatique coagulant est réalisée par macération des broyats de caillettes dans quatre solutions extractives préconisées par différents auteurs :

- Eau distillé (O'Leary et Fox, 1975) ;
- Solution de HCl 0,2 M (Valles et Furet, 1977).
- Saumure à 6% de NaCl + 2% de H₃BO₄ (1 : 8 v/v) (Anifantakis et Green, 1980) ;
- Saumure à 10% de NaCl + 1% de Benzoate de Na (Goursaud, 1999) ;

La macération est conduite à une température de 25 °C pendant une heure d'incubation, à raison de 100 g de caillette pour 100g de solution extractive.

A la fin de la période d'incubation, l'homogénéat macéré est filtré à travers un Buchner contenant de la gaze puis centrifugé à 2500 g pendant 15 minutes. Le surnageant récupéré est activé en ajustant le pH à 2 par une solution d'acide chlorhydrique pendant 10 min puis, il est réajusté définitivement à pH 6 par de la soude.

Les extraits coagulants ainsi obtenus ont été clarifiés selon la méthode de Valles et Furet, (1977). La caractérisation des extraits enzymatiques bruts et clarifiés a porté sur :

- La mesure de l'activité coagulante vis-à-vis du lait selon la méthode de Berridge modifiée par Collin *et al.*, (1977).
- La détermination de la concentration en protéines totales selon la méthode de Lowry *et al.*, (1951).
- L'estimation des rendements d'extraction selon Valles et Furet (1981).

La solution extractive à base d'eau acidifiée à l'HCl 0,2 M, ayant donné le meilleur rendement d'extraction de l'activité coagulante, a été préconisée pour l'optimisation des paramètres d'extraction suivants :

- Quantité de caillette mise en œuvre ;
- Concentration en HCl ;
- Température et de la durée de macération.

RÉSULTATS

1 - Influence de la nature de la solution d'extraction, effet de la clarification

Le taux d'extraction de l'enzyme varie en fonction du milieu de macération. Cette variation relativement faible lorsque la macération est conduite dans de l'eau ou dans la saumure, elle est notable dans le cas de la macération dans la solution 0,2 M de HCl (Tableau I).

Tableau 1 : Variation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction en fonction du milieu de macération. Effet de la clarification.

Solutions extractives Paramètres	HCl 0,2 M	H ₂ O + 1 % de Benzoate de Na	10 % de NaCl + 1% Benzoate de Na	6 % de NaCl + 2% H ₃ BO ₄
pH du milieu	0,91	6,03	5,86	5,43
AC (UP) avant activation	/	0,29	0,41	0,35
AC (UP) après activation	2,27	0,81	0,89	0,84
Rt (UP /g de caillette)	0,96	0,68	0,51	0,65
AC (UP) (après clarification)	1,72	0,69	0,19	0,24
Rt (UP /g de caillette)	0,73	0,53	0,10	0,18

Conditions de macération : Poids de broyat de caillette = 100g ; poids de la solution extractive = 100 g ; Température d'incubation = 25°C ; Temps de macération = 60 minutes.

L'ajout de NaCl à l'eau facilite l'extraction et permet d'avoir des extraits plus actifs mais des rendements d'extraction plus faible à cause de la viscosité qui gêne la filtration.

Une clarification s'avère indispensable pour les jus de macération obtenus avec l'eau et la saumure. Cette étape permet de corriger la couleur de l'extrait du brun rougeâtre au jaune d'or (fig. 2 et 3). Cependant, cette opération entraîne une perte d'activité particulièrement notable avec les jus de macération saumure.

2 - Influence de la quantité de caillette mise en œuvre

L'activité coagulante et le rendement d'extraction varient relativement, de manière proportionnelle avec la quantité de caillette

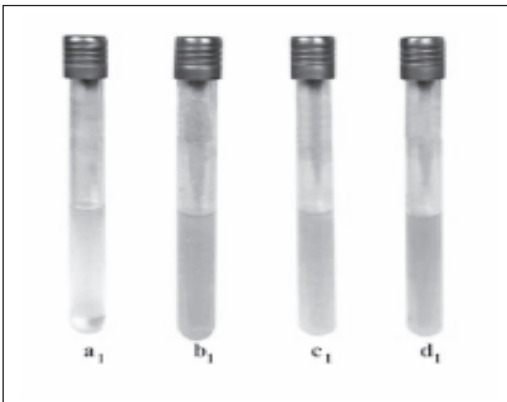


Figure 2 : Extraits obtenus après macération dans : a₁ : HCl 0,2 M, b₁ : H₂O
c₁ : NaCl 6%, d₁ : NaCl 10%.

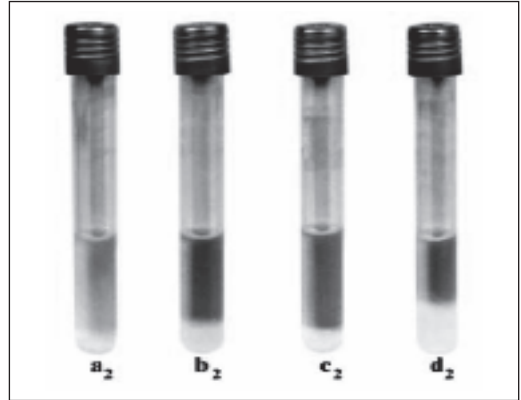


Figure 3 : Extraits clarifiés :
a₂ : HCl 0,2 M, b₂ : H₂O
c₁ : NaCl 6%, d₁ : NaCl 10%

mise en œuvre (fig. 4). En effet, une augmentation du poids de caillette entraîne une augmentation de l'activité coagulante, et une diminution du rendement d'extraction. Cependant, au-delà de 80 g de caillette mise en œuvre, la variation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction est relativement faible.

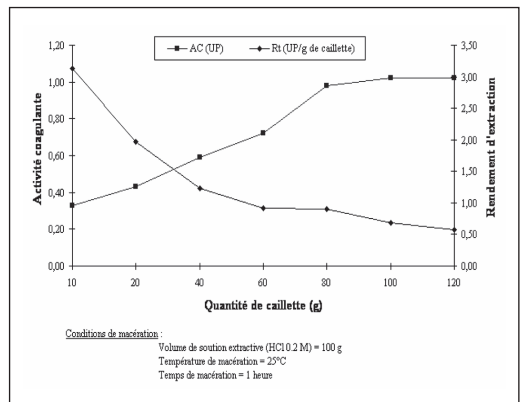


Figure 4 : Variations de l'activité coagulante et du rendement d'extraction en fonction de la quantité de caillette mise en œuvre.

3 - Influence de la concentration en HCl

L'augmentation de la concentration en HCl entraîne une augmentation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction jusqu'à une certaine limite (0,2 M) au delà de laquelle l'activité et le rendement diminuent (fig. 5).

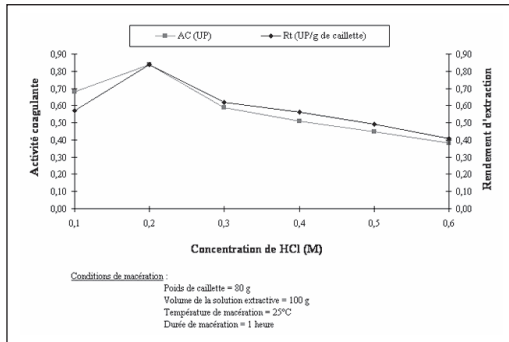


Figure 5 : Variations de l'activité coagulante et du rendement d'extraction en fonction de la concentration en HCl des solutions extractives.

4 - Influence de la température et de la durée de macération

La variation de la température et de la durée de macération montre que l'extraction est d'autant plus rapide que la température est élevée. (fig. 6 et 7).

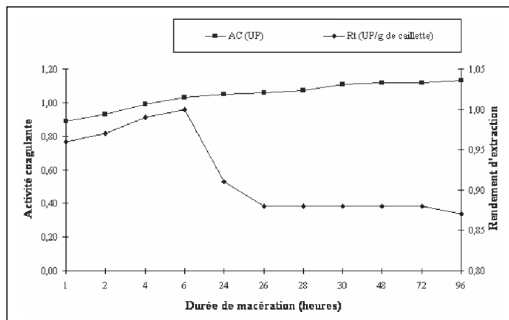


Figure 6 : Influence de la durée de macération à 25 °C sur l'activité coagulante et le rendement d'extraction.

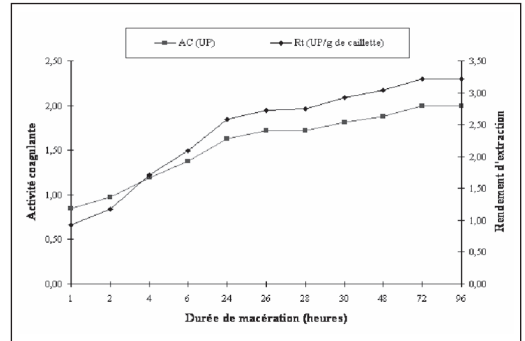


Figure 7 : Influence de la durée de macération à 30 °C sur l'activité coagulante et le rendement d'extraction.

Par ailleurs, l'élévation de la température au-delà de 25°C améliore le rendement d'extraction. En effet, la figure 6 fait apparaître une chute très importante du rendement à 25°C, au-delà de 6 heures de macération ce qui n'est pas observé pour des températures supérieures. La température de 35°C avec une durée de macération de l'ordre de 96 heures, conduit aux activités enzymatiques (coagulantes) les plus élevées avec de meilleurs rendements (fig. 8). Cependant, lorsque la macération est conduite à 40°C, l'activité coagulante et le rendement d'extraction chutent (fig. 9).

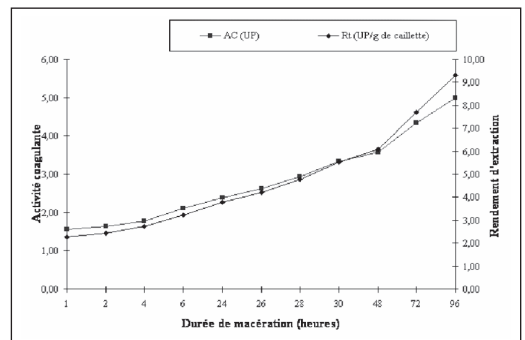


Figure 8 : Influence de la durée de macération à 35 °C sur l'activité coagulante et le rendement d'extraction.

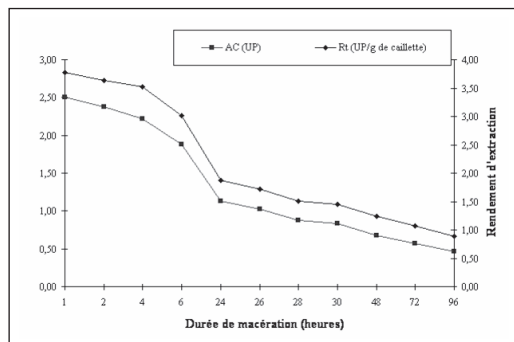


Figure 9 : Influence de la durée de macération à 40 °C sur l'activité coagulante et le rendement d'extraction.

Ces essais préliminaires ont permis d'adopter des conditions optimales d'extraction. La préparation des extraits est alors, réalisée selon le protocole suivant :

A un poids de caillette (PU), on ajoute un poids égal à 1,25 x PU d'une solution de HCl 0,2 M. Le mélange est incubé à 35°C pendant 96 heures.

Dans ces conditions expérimentales, 1g de caillette donne une activité coagulante de 9 UP. Pour produire 1 litre d'extrait enzymatique de force 1/10.000 (qui correspond la présure commerciale), il faut préconiser environ 9 caillettes ovines d'un poids moyen de 120 g.

DISCUSSION

La méthode adoptée permet d'une part l'extraction de la pepsine et du pepsinogène et d'autre part l'activation de ce pepsinogène. Cette extraction est conditionnée par différents paramètres : le pH de la solution extractrice, la température et la durée de macération (Cuvellier, 1999).

L'utilisation d'une solution d'acide chlorhydrique 0,2 M montre qu'une force ionique minimum est nécessaire pour une meilleure extraction. En effet, selon Tsouli (1974), le taux de NaCl n'a pas d'influence sur celui de l'extraction enzymatique, mais il reste qu'avec l'eau seule, on obtient des solutions moins actives. Valles et Furet (1977), en comparant les rendements d'extraction obtenus par les macérations acides et dans l'eau, rapportent qu'une seule macération acide permettait d'obtenir autant de pepsine que trois macérations consécutives effectuées dans l'eau. Contrairement à ces auteurs, Abd-El-Rahman *et al.*, (1990), indiquent que l'emploi de l'eau seule est plus favorable à l'extraction de la pepsine du lapin.

D'autre part, cette enzyme montre une grande stabilité à ces valeurs de pH. Ceci est en accord avec les résultats de Fox *et al.*, (1977), qui rapportent que la pepsine ovine ne présente pas de perte significative d'activité dans la marge de pH 1,0 - 4,5 pendant 24 h à 20°C.

Par ailleurs, lorsque la macération est réalisée à 25°C et 30°C un caractère collant et glaireux de la solution extractive est observé. En fin de macération subsistait une quantité de résidu qui par leur nature gluante retenait une quantité importante de liquide, ce qui explique le faible rendement d'extraction obtenu comme le montre la figure 6.

Quand la macération est réalisée à 35°C et 40°C, le caractère collant disparaît, mais un autre phénomène est observé ; la désinté-

gration des broyat de caillettes. Un volume d'extrait brut très important est obtenu, aboutissant à un rendement d'extraction élevé. Ces résultats sont en accord avec l'ensemble des observations de Valles et Furet (1977). D'après ces auteurs, ces observations peuvent être attribués en partie à l'abondance du collagène présent dans le tissu musculaire des caillettes.

Il est à noter, qu'après 6 heures de macération à 40°C, un phénomène de destruction de l'enzyme intervient se traduisant par une diminution de l'activité coagulante et du rendement. Ce phénomène de destruction des protéases gastriques a déjà été décrit en 1972, par Valles et Mocquot dans une étude similaire. Ils ont montré une perte d'activité après 24 heures de macération à 50°C. Enfin l'application de cette méthode selon les conditions optimales obtenues pour la préparation de la pepsine ovine présente plusieurs avantages qui méritent d'être cités :

- C'est une méthode qui ne comporte aucun gaspillage de caillettes, puisque la macération conduite selon la méthode adoptée entraîne la désintégration totale des tissus et par conséquent, il n'y a pas lieu de procéder à des extractions successives en vue de l'épuisement des caillettes comme c'est le cas pour les macérations dans la saumure ;
- C'est une méthode qui ne nécessite aucun traitement comportant l'addition d'antiseptique ni de clarification.

Toute fois, la variation des concentrations enzymatiques entre les différents lots n'a

pas été prise en considération, la provenance de ces caillettes n'ayant pas au départ, été définie. Des travaux anciens ont montré l'influence des facteurs tel que la race, l'âge, et l'alimentation sur le contenu enzymatique des caillettes (Garnot *et al.*, 1974 ; 1977 ; Valles et Furet, 1981).

Les conditions de nettoyage des caillettes au niveau des abattoirs sont un autre facteur qui semble, conditionner le contenu enzymatique des caillettes avant l'extraction.

En effet, la préparation des caillettes doit être limitée à un lavage à l'eau courante sous une légère pression. Selon Mann (1963), il faut éviter l'utilisation de l'eau chaude et le nettoyage à l'aide d'une brosse, qui entraîne une dissolution rapide de la pepsine et une perte d'activité et de rendement d'extraction.

Par ailleurs, la caractérisation de l'extrait enzymatique montre une activité coagulante qui varie de 5-7 UP/ ml pour une concentration en protéines qui avoisine les 35 mg/ml. Ces résultats semblent en accord avec les résultats de Fox *et al.*, (1977), et Virto *et al.*, (2003) ayant étudié l'extrait enzymatique de pepsine ovine obtenu traditionnellement.

CONCLUSION

La valorisation des caillettes d'ovins adultes en vue de la préparation de la pepsine ovine et la caractérisation de son activité coagulante sont les objectifs principaux recherchés lors de cette étude.

La méthode d'extraction mise au point consiste en la macération d'un poids de caillette broyées dans une solution acidifiée 0,2 M de HCl selon le rapport 8/10 (w/w). Le mélange est porté à une température de 35°C pendant une durée de 96 heures.

Cette méthode d'extraction a permis d'obtenir des rendements d'extraction plus intéressants par rapport aux autres méthodes testées et présente certains avantages en l'occurrence, le maintien du jus de macération dans des conditions ($\text{pH} \leq 2$) qui limitent les risques de contamination microbienne pendant toute la durée d'incubation, et ce contrairement aux macérations conduites dans des saumures à des températures moyennes avec lesquelles, il est très difficile d'obtenir des extraits exempts de contaminations microbiennes en absence de conservateurs.

A ce stade de notre étude, et sans préjuger des résultats obtenus, nous pouvons affirmer que les caillettes d'ovins constituent une source potentielle de pepsine qui peut substituer, en partie, la présure classique. La méthode d'extraction adoptée peut être employée à plus grande échelle, néanmoins l'utilisation des caillettes ovines pose le problème de leur collecte. Enfin, l'utilisation de la pepsine ovine en tant que substitut de la présure est conditionnée par la possibilité de la préparation de cette protéase de manière stable et continue d'une part, et d'autre part des propriétés technologiques qui caractérise cette enzyme.

En conséquence, il ya lieu d'envisager une étude sur les propriétés physico-chimique

de cet extrait coagulant et de son aptitude fromagère afin de pouvoir répondre à la question de son emploi en fromagerie.

Références bibliographiques

- Abd-El-Rahman A.M., Madkor S.A., Shalabi S.I. et Metwali N.H., 1990 : Rabbit pepsin as a rennet substitute. I- Extraction, Purification and characterization of the enzyme. *Minia. J. Agric. Res. Dev.* Vol. 12. n° 3, 1685-1702.
- Anifantakis E. et Green M., 1980: Preparation and properties of rennet from Lamb's and Kid's abomasums. *J. Dairy. Res.* 47, pp : 221 - 230.
- Collin, J ; C., Grappin, R., et Legraet, Y., (1977). Etude de la méthode de mesure selon Berridge du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique . *Rev . Lait . Fr.* n° 335, 389 394.
- Cuvellier G.F., 1999 : Production des enzymes. In. *Biotechnology.* 5 Ed. C. Scriban; pp : 351-364.
- Fox, P.E., Whitaker, J.R., O'leary, P.A., 1977 : Isolation and characterization of sheep pepsin. *Biochem. J.* 161, pp : 389-398.
- Garnot P., Toullec P., Thapon J. L., Martin P., Minh-Thu-Hoang, Matheu, C. M., et Ribadeau-Dumas B., 1977 : Influence of age dietary protein and weaning on calf abomasa enzymic secretion. *J. Dairy Res.* n° 44, pp : 9-23.

Garnot P., Valles E., Thapon J.L., Toullec R., Tomasone R., et Ribadeau-Dumas B., 1974: Influence of dietary proteins on rennin and pepsin content of préruminant calf veil. *J. Dairy. Res.* 41, pp : 19-23.

Goursaud J., 1999 : Réacteurs enzymatiques à enzymes libres et à enzymes immobilisées. In. *Biotechnology.* 5 Ed. R. Scriban, pp : 376-390.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N. J., Farr, A.I., Randall, R. J., (1951). Protein measurement with the Follin phenol reagent. *J. Biol. chem.*, 193, 265-275.

Mann I., 1963 : Les glandes. In. *Traitements et utilisation des sous-produits.* Col FAO.

O'leary P.A. et Fox P.F., 1975 : A Procedure for the isolation of gastric enzymes. *J. Dairy. Res.*, n°42, pp : 445-451.

Ramet J. P., 1997 : Les agents de la transformation du lait. In. *Le Fromage de la science à l'assurance - qualité.* 3 Ed. A. Eck et J.C. Gillis. TEC et DOC. Lavoisier. *Statistiques du Commerce Extérieur.*, 2002 : Importations de présures et ses concentras.

Tsouli J., 1974 : Etude comparée de l'activité enzymatique de trois variétés d'artichauts du genre *Cynara cardunculus* L. sur la coagulation du lait. *Lait.* Juillet - Août. n° 537.

Valles E. et Furet U.P., 1977 : Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine. I. Méthodes d'extraction. *Lait.* Nov-Dec. n° 569-570.

Valles E. et Furet J.P., 1981 : Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine. II - Influence de la race, de l'âge et du sexe sur leur contenu enzymatique. *Lait.* n° 61, pp : 590 - 618.

Valles E. et Mocquot G., 1972 : Etude sur la technique de préparation de la présure utilisée dans les fabrications traditionnelles d'emmental. *Lait.* Mai- juin, pp : 515-516.

Virto M., Chavarria F., Bustamantea M.A., Barronb L.J.R., Aramburuc Vicented M.S., Perez-Elortondoc F.J., Albisuc M., and M. de Renobalesa, 2003. Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and favour. *International Dairy Journal*, 13, 391-399.