

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة- الحراش

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE – EL-HARRACH

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Agronomiques

Option : Sciences alimentaires

Thème

Variation de la composition du lait en fonction de la race et de
l'alimentation : aptitude à la coagulation par une protéase
purifiée extraite du proventricule de dinde (*Meleagris
gallopavo*)

Présenté par : MEKHANEG Benyoucef

Devant le jury :

Président :	Mr MEKIMENE Lakhdar	Professeur ENSA (Alger)
Directeur de thèse :	Mr BELLAL Mohand Mouloud	Professeur ENSA (Alger)
Examineurs :	Mr NOUANI Abdelouahab	Professeur UMBB (Boumerdes)
	Mr MEZAINI Abdelkader	Professeur UHB (Chlef)

Année universitaire : 2019/2020

On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison.

Henri Poincaré

Dédicaces

Ce travail est dédié à :

A la mémoire de ma mère que je viens de perdre, que dieu le tout puissant lui accorde sa miséricorde et l'accueille dans son vaste paradis.

A la mémoire de mon père que dieu le tout puissant lui accorde sa miséricorde,

A ma femme.

A mes enfants : Sara, Oussama et Sérine.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à Monsieur BELLAL M.M., Professeur à l'ENSA et Directeur de thèse, pour sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique et ses précieux conseils. Qu'il en soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

Monsieur MEKIMENE L., Professeur à l'ENSA, qui m'a fait l'honneur de présider le jury. Monsieur NOUANI A., Professeur à l'UMBB Boumerdès, pour avoir accepté de juger ce travail. Monsieur MEZAINI A., Maître de conférences à l'UHB Chlef, pour avoir accepté de juger ce travail.

Ma gratitude s'adresse tout particulièrement à M^F Girardet Jean Michel pour m'avoir initié à la chromatographie FPLC et à la zymographie. Pour les précieux conseils dont il m'a fait profiter tout au long de mon stage à Nancy. Avec qui j'ai eu de nombreux échanges qui se sont concrétisés par une collaboration scientifique productive.

Je tiens aussi à remercier le professeur Dary Annie, animatrice de l'équipe PB2P de m'avoir accueilli avec bienveillance au sein de son laboratoire de l'URFPA de l'Université de Lorraine-France, pour mener à bien ce travail de thèse. Merci aussi à toute l'équipe, Gérard, Chantal, Franck, Xavier et Zeeshan.

Ce travail a fait aussi l'objet d'une collaboration avec le laboratoire ProBioGem de l'université de Lille 1. Je n'oublie pas de remercier Mme. *Dominique Vercaigne-Marko*, Professeur et chef de département génie biologique de l'IUT Lille A, pour l'accueil dans son laboratoire de génie biologique de l'IUT Lille A. Merci aussi à toute l'équipe, Magali, Latifa, Pauline et Mohamed pour l'expérience qu'ils m'ont apportée.

J'associe à ces remerciements tous mes collègues enseignants-chercheurs de la faculté des sciences et technologie de l'université Djilali Bounaama de Khemis-Milana, pour leur soutien moral, et particulièrement mon collègue Dr Bentriddi Salah Eddine pour sa disponibilité et pour son aide pour l'utilisation du logiciel OriginPro 8.

Je tiens à remercier aussi Mr. Mohamed BENALIA., du laboratoire de technologie alimentaire de l'ENSA pour son aide et sa disponibilité.

Je remercie également tous les étudiants que j'ai encadré, qui m'ont permis de terminer cette thèse et qui ont apporté leur grande contribution à la réalisation de ce travail, ma profonde reconnaissance en particulier à Mme KELLOUAZE Kheira, Mr OUAIL Mohamed et Melle YAHIA MHAMED Zhor.

Enfin j'arrive à la personne avec qui je partage tout ...ma femme qui m'a soutenu et encouragé à terminer ce travail. Je la remercie d'avoir suivi et supporté, toute seule, les enfants dans leurs cursus scolaire, pendant mes absences fréquentes.

Que toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail (amis et collègues de travail), soient remerciées.

Avant-propos

Ce travail a fait l'objet de publication et communications suivantes :

1. Publication Internationale:

Physico-chemical characterization of a milk-clotting fraction extracted from turkey (*Meleagris gallopavo*) proventriculus. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 48 (2018) 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.006>

2. Communications internationales:

- 1) Purification et caractérisation d'une protéase coagulant le lait extraite à partir du proventricule de la Dinde (*Meleagris gallopavo*). 2^{ème} conférence International sur les énergies et environnement. Université de Khemis-Miliana 2-3 Décembre 2012.
- 2) Partial purification and characterization of a milk-clotting, pepsin-like enzyme from turkey (*Meleagris gallopavo*) proventriculus. 31st EFFoST International Conference 13-16 November 2017. Melia Sitges, Spain.
- 3) Caractérisation de protéase coagulant le lait extraite du proventricule de la dinde (*Meleagris gallopavo*) 24^{ème} Journées 3R (rencontre recherche ruminant), Centre des Congrès de Paris - La Villette- 05 et 06 Décembre 2018.
- 4) Caractérisation de protéase coagulant le lait extraite à partir du proventricule de la Dinde (*Meleagris gallopavo*). 7^{ème} Conférence Internationale des Energies Renouvelables (CIER-2019). Sousse-Tunisie. 19-22 Décembre 2019.

Résumé

L'étude de l'influence de la race sur la variation de la composition chimique dans une première étape, montre que le lait de Holstein est en moyenne plus riche en matière grasse ($35\pm 0,5$) et moins riche en protéines ($32,9\pm 1,24$) que le lait de Montbéliarde ($34,5\pm 0,86$) en protéines et ($33,05\pm 0,21$) en matière grasse. Les variations dues à l'alimentation ont un effet hautement significatif sur l'extrait sec total ($P < 0.01$), et significatif sur le taux protéique et la matière grasse. Le profil en acides gras du lait varie principalement en fonction de l'alimentation des vaches. L'ajout du fourrage vert (bersim) et orge a entraîné une augmentation du taux des acides gras insaturés (32,119 %) au dépend de celui des acides gras saturés (9.39 %).

Dans une seconde étape la valorisation des sous-produits aviaires tel que le proventricule de la dinde (*Meleagris gallopavo*) dans la préparation des enzymes de coagulation du lait, constitue une alternative à la présure commerciale. L'enzyme coagulante de *Meleagris gallopavo* a été précipitée par du sulfate d'ammonium à 50% de saturation suivie d'une purification par la chromatographie liquide à protéines rapides (FPLC) échangeuse de cations et détermination de la protéase coagulante. L'activité est mesurée sur du lait incubé à 35 ° C. Les fractions ayant une activité coagulante sont concentrées et dialysées contre Tris / HCl pH 7,0 à travers une membrane avec une coupure de 8 000 Da et séparées par FPLC échangeuse d'anions. Les fractions actives obtenues par chromatographie par échange de cations sont également séparées par chromatographie liquide haute performance en phase inverse, qui révèle une seule fraction capable de coaguler le lait. L'analyse par électrophorèse a révélé une bande ayant une masse moléculaire apparente de 36,5 kDa qui semble correspondre à une enzyme de type pepsine selon les analyses d'alignement de la séquence primaire. L'activité coagulante maximale a été obtenue pour des conditions optimales de température de 55 ° C, pH 5,4 et CaCl_2 0.04M.

La fabrication de fromage à pâte fraîche type petit suisse par la protéase purifiée était en faveur de lait de chèvre par rapport au lait de vache, ceci s'explique par la teneur élevée en protéines et en extrait sec du lait.

Les caractéristiques sensorielles, et en particulier la texture, des fromages obtenus à partir des laits de chèvre et de vache, en utilisant de l'EEB de dinde, sont analogues à celles des fromages obtenus avec de la présure. Néanmoins, les fromages élaborés avec l'EEB présente une amertume relativement prononcée.

L'ensemble des résultats laissent suggérer que les protéases extraites de dinde, peuvent remplacer avantageusement la présure commerciale.

Mots-clés : lait, extrait enzymatique, proventricule, dinde

ABSTRACT

The study of the influence of the breed on the variation of the chemical composition in a first step, shows that the Holstein milk is on average richer in fat ($35 \pm 0,5$) and less rich in proteins ($32,9 \pm 1.24$) than Montbéliarde milk (34.5 ± 0.86) in protein and (33.05 ± 0.21) in fat. Variations due to diet have a highly significant effect on the total dry extract ($P < 0.01$), and significant on the protein and fat content. The fatty acid profile of milk varies mainly according to the diet of the cows. The addition of green (bersim) and barley fodder increased the level of unsaturated fatty acids (32.119%) at the expense of saturated fatty acids (9.39%). In a second step, the development of avian by-products such as turkey proventriculus (*Meleagris gallopavo*) in the preparation of milk clotting enzymes is an alternative to commercial rennet. The clotting enzyme of *Meleagris gallopavo* was prepared by ammonium sulfate at 50% saturation followed by purification by rapid protein liquid chromatography (FPLC) cation exchange and determination of clotting protease. The activity is measured on milk incubated at 35°C . The fractions having a clotting activity are concentrated and dialyzed against Tris / HCl pH 7.0 through a membrane with a cutoff of 8000 Da, and separated by anion-exchange FPLC. The active fractions obtained by cation exchange chromatography are also separated by reversed-phase high performance liquid chromatography, which reveals a single fraction able to coagulate milk. Electrophoretic analysis revealed a band with an apparent molecular weight of 36.5 kDa and seemed to correspond to pepsin - like enzyme according to the primary sequence alignment assays. Maximal clotting activity was obtained for optimal temperature conditions of 55°C , pH 5.4 and 0.04M CaCl_2 .

The production of Swiss small fresh cheese by the purified protease was in favor of goat milk compared to cow's milk, this is explained by the high content of protein and dry extract of the milk.

The sensory characteristics, and in particular the texture, of cheeses obtained from goat and cow milks, using turkey EEB, are similar to those obtained with rennet cheeses. Nevertheless, cheeses made with EEB have a relatively pronounced bitterness. The overall results suggest that proteases extracted from turkeys can advantageously replace commercial rennet.

Keywords: milk, enzymatic extract, proventriculus, turkey

ملخص

تبين دراسة تأثير السلالة على تباين التركيبة الكيميائية في الخطوة الأولى ، أن حليب هولشتاين أغنى بالدهون في المتوسط (35 ± 0,5) وأقل ثراءً بالبروتينات (9 ، 32 ± 1.24) من حليب Montbéliarde (34.5 ± 0.86) في البروتين و (33.05 ± 0.21) في الدهون. يكون للتغيرات الناتجة عن النظام الغذائي تأثير كبير للغاية على إجمالي المستخلص الجاف (P<0.01)، كما أنه مهم في محتوى البروتين والدهون. يختلف شكل الأحماض الدهنية للحليب بشكل أساسي وفقاً للنظام الغذائي للأبقار. أدت إضافة العلف الأخضر (البرسيم) و علف الشعير إلى زيادة مستوى الأحماض الدهنية غير المشبعة (32.11 %) على حساب الأحماض الدهنية المشبعة (9.39%).

في الخطوة الثانية ، يعد تطوير منتجات الثانوية للطيور مثل غدية الديك الرومي (الامعاء الحقيقية) Meleagris gallopavo في تحضير أنزيمات تخثر الحليب بديلاً عن المنفحة التجارية. تم تحضير إنزيم التخثر Meleagris gallopavo بواسطة كبريتات الأمونيوم بنسبة 50 % تليها تنقية بواسطة تبادل كروماتوغرافيا السائلة للبروتين (FPLC) الكاتيوني السريع وتحديد البروتياز المخثر. يتم قياس النشاط على الحليب المحتضن عند 35 درجة مئوية. تتركز الأجزاء ذات النشاط المخثر ويتم تصفيتها ضد تريس / حمض الهيدروكلوريك 7.0 درجة الحموضة من خلال غشاء بقطع يبلغ 8000 دالتون وتصفية بالتبادل FPLC الأنيونات. يتم فصل الأجزاء النشطة التي يتم الحصول عليها بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الكاتيوني بواسطة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء في المرحلة العكسية HPLC، والتي تكشف عن جزء واحد قادر على تخثر الحليب. كشف التحليل الكهربائي عن وجود شريط له وزن جزيئي ظاهر قدره 36.5 كيلو دالتون يبدو أنه يتوافق مع إنزيم يشبه الببسين وفقاً لمقاسات محاذاة التسلسل الأولي. تم الحصول على الحد الأقصى لنشاط التخثر لظروف درجة الحرارة المثلى التي تبلغ 55 درجة مئوية ، ودرجة الحموضة 5.4 و 0.04 ميلي مول CaCl₂ كان إنتاج الجبن الطازج السويسري الصغير من البروتياز المنقى لصالح حليب الماعز مقارنةً بحليب البقر ، وهذا يفسره المحتوى العالي من البروتين والمستخلص الجاف للحليب.

تتشابه الخصائص الحسية ، وخاصة نسيج الجبن الذي تم الحصول عليه من حليب الماعز والبقر ، باستخدام غدية الديك الرومي EEB ، مع الخصائص التي يتم الحصول عليها مع أجبان المنفحة. ومع ذلك، فإن الجبن المصنوع من EEB لديه مرارة واضحة نسبياً.

النتائج الإجمالية تشير إلى أن البروتياز المستخرجة من الديوك الرومية يمكن أن يحل محل المنفحة التجارية.

الكلمات المفتاحية: حليب ، مستخلص أنزيمي ، الغدية ، ديك رومي

Liste des abréviations

AA : acides aminés

AFNOR : association française de normalisation

AG: acides gras

AGI : acides gras insaturés

AGS: acides gras saturés

AGICMC : acides gras insaturés à courte et moyenne chaînes

AGSCMC ; acides gras saturés à courte et moyenne chaîne

AGILC: acide gras insaturés à longues chaînes

AGSLC: acide gras saturés à longues chaînes

BLAST: Outil de recherche d'alignement local de base

BSA : sérum albumine bovin

CaCl₂ : chlorure de calcium

CPG : chromatographie phase gaz

ddl : degré de liberté

°D: degré Dornic

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

EEP : extrait enzymatique purifié

EEB : extrait enzymatique brut

ESD : extrait sec dégraissé

EST : extrait sec total

Expasy: Système expert d'analyse de protéines

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

FID : détecteur à ionisation de flamme

FPLC : Chromatographie liquide rapide sur protéines

G : Grade

G/S : gras sur sec

GenBank : Base de données des séquences génétiques

Giplait : Groupe industriel des productions laitières

HCl : acide chloridrique

HPLC : chromatographie liquide haute performance

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne

Da: Dalton

kDa: kilo Dalton

IMCU : unité internationale coagulant le lait

MG : matière grasse

MS : matière sèche

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

NCBI : Centre national d'information sur la biotechnologie

P : probabilité

SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide de dodécyl sulfate de sodium

TB : taux butyreux

Tcp : temps de coagulation de la présure

Tcd : temps de coagulation de l'extrait enzymatique de dinde

TP : taux protéique

U.A.C : unité d'activité coagulante

U/mL : unité par millilitre

UP : unité présure

Liste des figures

Figure	intitulée	Page
1	Distribution des fractions azotées du lait de vache	6
2	Séquence primaire de la caséine K	9
3	Micelle de caséine et sous-micelle de caséine. Adapté de Tetra Pack Processing System, 1995	11
4	Structure en éponge de la micelle de caséine	11
5	Les gels laitiers et le phénomène de coagulation par la présure	29
6	Appareil digestif de la dinde	37
7	Diagramme de fabrication du fromage petit suisse par la laiterie ARIB (GIPLAIT)	44
8	Les caractéristiques sensorielles de l'appréciation des fromages	45
9	photographie du proventricule de dinde	47
10	Principales étapes d'extraction de l'enzyme brut à partir du proventricule de la dinde	50
11	Variation des teneurs en matières grasses et en protéines en fonction de la race	60
12	Variation des proportions des acides gras à courte et moyenne chaîne et les acides gras à longue chaîne en fonction de la race	61
13	Variation des teneurs en matières grasses et en protéines en fonction de l'alimentation	65
14	Variation des proportions des acides gras à courte et moyenne chaîne et les acides gras à longue chaîne en fonction de l'alimentation	67
15	Profil électrophorétique des bandes protéiques après précipitation par le sulfate d'ammonium à des taux de saturation de 25%, 50% et 75%. M : marqueurs protéiques, avec injection de 10 μ L et 20 μ L d'échantillon	72
16	Profil d'élution sur colonne Hi-Trap SP-FF échangeuse de cations de l'extrait coagulant de proventricule de la dinde après précipitation au sulfate d'ammonium 50% de saturation. (FPLC AKTA Purifier), tampon d'élution formate de sodium (0,05 M, pH 3.5), gradient NaCl (0-0,5M), débit : 1 mL/mn, fraction : 1 mL). Absorbance 280nm (▪), Activité coagulante (UP/mL) (▲), NaCl-----	74
17	Electrophoregramme des fractions coagulantes issues de la Hi-Trap SP-FF. M : marqueurs protéiques, piste 12, 13, 14, 15,16 : fractions coagulantes	74
18	Profil d'élution sur colonne Mono Q HR 5/5 échangeuse d'anions des fractions coagulantes (12, 13, 14,15 ; 16) dialysées sur membrane 8000Da contre le tampon tris HCl à pH 7. (FPLC AKTA Purifier), tampon d'élution tampon Tris HCl 0,02 M, pH 7), gradient NaCl (0-0,5M), débit : 1 mL/mn, fraction : 1 mL). Absorbance 280nm (▪), Activité coagulante (UP/mL) (▲), NaCl-----	75
19	Electrophoregramme des fractions coagulantes issues de la Mono Q HR 5/5.M : marqueur protéique, piste 22 et 23 fractions coagulantes	76
20	Profil chromatographique RP- HPLC de la fraction active obtenue par échangeuse de cations Hi-Trap SP-FF des fractions coagulantes (12 à16) de la protéase de dinde. Colonne C18 (220x2, 1), phase mobile: solvant A: Acetonitrile 2% Acide trifluoroacétique (TFA) 0,1%, solvant B : Acétonitrile 100% Acide trifluoroacétique (TFA) 0,1%, débit: 250 μ l/mn, détection a 215nm.	77

21	Influence de la température sur l'activité de la protéase de dinde et de la présure commerciale	78
22	Influence du pH sur l'activité de la protéase de dinde et de la présure commerciale	79
23	Influence du CaCl ₂ sur l'activité de la protéase de dinde et de la présure commerciale	79
24	Stabilité de l'EEP à la conservation à 4°C et -18°C	81
25	Effet de quelques effecteurs sur l'activité coagulante de l'EEP de dinde	82
26	Séquences prédictive d'acides aminés de pepsine A de dinde (<i>Meleagris gallopavo</i>), séquence de référence NCBI XP_010709067	83
27	Séquences prédictive d'acides aminés de pepsine A-like de dinde (<i>Meleagris gallopavo</i>), séquence de référence NCBI: XP_010709199	84
28	Alignement des séquences d'acides aminés de la pepsine A de dinde (<i>Meleagris gallopavo</i>) XP_010709067 et du précurseur de la pepsine A de Poulet (<i>Gallus gallus</i>) NP_990209 , effectuées avec le programme BLAST disponible à l'adresse http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi	85
29	Alignement des séquences d'acides aminés Pepsine A prédictive (<i>Meleagris gallopavo</i>) XP_010709199.1 et précurseur de la pepsine A Poulet (<i>Gallus gallus</i>) NP_990209 , effectuées avec le programme BLAST disponible à l'adresse http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	86
30	Alignement des séquences d'acides aminés de la pepsine A (<i>Meleagris gallopavo</i>) XP_010709067 et la Séquence partielle de Pepsine A du canard colvert (<i>Anas platyrhynchos</i>) GenBank: EOA94711 , effectuées avec le programme BLAST disponible à l'adresse http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	87
31	Alignement des séquences d'acides aminés de la pepsine A-like de dinde (<i>Meleagris gallopavo</i>) XP_010709199 et la Pepsine A, partielle du canard colvert (<i>Anas platyrhynchos</i>) GenBank: EOA94711 , effectuées avec le programme BLAST disponible à l'adresse http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	88
32	Valeurs moyennes des EST du fromage (petit suisse) à base des laits de vache et de chèvre élaboré avec l'EEP et avec la présure	91
33	Valeurs moyennes du taux protéique du fromage (petit suisse) à base des laits de vache et de chèvre élaborés avec l'EEP et la présure	92
34	Valeurs moyennes du pH du fromage (petit suisse) à base des laits de vache et de chèvre élaborés avec l'EEP et la présure	93
35	Valeurs moyennes des rendements en fromages obtenus à partir des laits de vache et chèvre avec les agents coagulants EEP dinde et présure	95
36	Valeurs moyennes d'appréciation de la texture, de la couleur, du goût et de l'odeur des fromages à base de lait de vache et de chèvre	97

Liste des tableaux

Tableau	intitulée	Page
1	Composition générale du lait en g p. 100 mL	5
2	Composition moyenne des matières azotées du lait de vache	7
3	Caractéristique de constituants majeurs de caséines	8
4	Caractéristique des constituants des protéines du lactosérum	12
5	Composition du lait en minéraux	14
6	Teneur moyenne des principales vitamines du lait	14
7	production laitière quotidienne moyenne, taux butyreux et protéique moyen par race	18
8	Influence du niveau des apports azotés en début de lactation sur la production et la composition du lait	20
9	Influence du régime alimentaire sur la composition en acides gras des laits	21
10	Effet de la conservation du fourrage sur les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles des fromages	22
11	Effets moyens et significatifs du stade de lactation sur la composition physico-chimique du lait	23
12	Influence du numéro de lactation sur la quantité et la composition du lait produit	24
13	Influence du type de régime sur la composition des laits en acides gras	26
14	Comparaison entre un caillé lactique (coagulation par voie acide) et un caillé présure (coagulation par voie enzymatique)	31
15	Impact de la température sur la coagulation du lait par la présure	32
16	Effet de la race sur les caractéristiques physico-chimiques du lait	59
17	Variation de la composition en acides gras du lait en fonction de la race	62
18	Effet de l'alimentation sur les caractéristiques physico-chimiques du lait	63
19	Variation de la composition en acides gras du lait en fonction de l'alimentation	66
20.1	Matrice de corrélation des variables physicochimiques et technologiques du lait pour la race	68
20.2	Matrice de corrélation des variables physicochimiques et technologiques du lait pour l'alimentation	69
21	Etapas de purification de la pepsine de la dinde (<i>Méleagris gallopavo</i>)	71
22	Effet des inhibiteurs sur l'activité coagulante l'EEP de dinde	81
23	Analyse physico-chimiques des laits de vache et de chèvre	90
24	Caractéristiques physico-chimiques du fromage petit-suisse à base de lait cru de mélange de vache et de lait de chèvre	90
25	Analyses microbiologiques de la matière première	93
26	qualité microbiologique du fromage	94
27	Analyse sensorielle des fromages frais à base d'EEP de dinde et de présure	98

TABLE DES MATIERES

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	01
Chapitre I. Revue bibliographique	05
I. Le lait	05
1. Définition	05
2. Composition du lait	05
2.1. Matières azotées	06
2.1.1. Composition de la caséine	07
2.1.2. Micelle de caséine	10
2.1.3. Protéines du lactosérum	12
2.2. Eau	12
2.3. Glucides	13
2.4. Lipides	13
2.5. Minéraux	13
2.6. Vitamines	14
2.7. Enzymes	15
3. Caractéristiques du lait	15
3.1. Caractéristiques organoleptiques	15
3.1.1. Couleur	15
3.1.2. Odeur	15
3.1.3. Saveur	15
3.1.4. Viscosité	15
3.2. Caractéristiques physicochimiques	15
3.2.1. Densité	15
3.2.2. Acidité de titration ou acidité Dornic	16
3.2.3. Point de congélation	16
3.2.4. pH	16
II. Facteurs de variation de la composition du lait	17
1. Effets de la race	17
2. Effets de l'alimentation	19
3. Facteurs physiologiques	22
3.1. Effets du stade de lactation	22
3.2. Effets du numéro de lactation	24
3.3. L'âge au premier vêlage	25
4. Effets de la saison	25
III. La coagulation du lait	27
1. Généralités	27
2. Type de coagulation	27
2.1. Coagulation par voie acide	27
2.2. Coagulation par voie enzymatique	28
2.2.1 Mécanisme de coagulation enzymatique	28
2.3. Coagulation mixte	30
3. Facteurs influençant à l'activité coagulante	31
3.1. Concentration en enzyme	31
3.2. Température	31
3.3. pH	32

3.4. Teneur en CaCl ₂	32
IV. Les succédanés de présure	33
1. présure	33
1.1. Définition	33
1.2. Origine et dénomination	33
1.3. Composition	33
1.3.1. Chymosine	33
1.3.2. Pepsine	34
2. Propriété spécifique exigées du succédané de présure	35
3. Enzymes coagulants le lait d'origine végétale	35
4. Enzymes coagulants le lait d'origine animale	36
4.1. Pepsine aviaire	37
4.1.1. Tractus digestif de la dinde	37
4.1.2. Composition de la pepsine de dinde	38
5. Enzymes coagulants le lait d'origine microbienne	38
5.1. Enzymes d'origine bactérienne	38
5.2. Enzymes d'origine fongique	39
6. Chymosine recombinante	39
V. Fromage frais	41
1. Généralités	41
2. Différents types de fromage frais	41
3. Petit suisse	41
4. Fabrication de fromage	42
4.1. Préparation du lait	42
4.2. Standardisation	42
4.3. Homogénéisation	42
4.4. Traitement thermique	42
4.5. Prématuration	43
4.6. Maturation	43
4.7. Emprésurage	43
4.8. Coagulation	43
4.9. Egouttage	43
5. Qualité sensorielles des fromages	44
Chapitre II. Matériel et méthodes	46
I. Présentation de la ferme d'étude	46
1. Caractéristiques de la nourriture et des animaux	46
II. Matériel biologique	46
1. Le lait	47
2. Le proventricule de dinde	47
3. Substrat de Berridge	47
4. Présure commerciale	48
III. Méthodes d'analyses	48
1. Analyses physico-chimiques du lait	48
1.1. Détermination de la matière grasse totale	48
1.2 Analyse chromatographique phase gazeuse	48
1.3. Dosage du lactose (Méthode de Bertrand)	48
1.4. Détermination de l'azote total du lait	49
1.5. Acidité titrable	49
2. Extraction enzymatique	49
2.1 Détermination du taux de protéines totales de l'extrait enzymatique	51

2.2. Expression du rendement de l'extraction	51
2.3. Caractérisation de l'extrait enzymatique	51
2.3. 1. L'activité coagulante	51
3. Méthodes de purification	52
3.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium	52
3.2. Dialyse	52
3.3. Chromatographie échangeuse d'ions (FPLC)	52
3.3.1. Chromatographie échangeuse de cations	52
3.3.2. Chromatographie échangeuse d'anions	53
3.4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)	53
3.4.1. Conditions expérimentales	53
3.4.2. Révélation des protéines par le bleu de Coomassie	54
3. 5. Chromatographie liquide haute performance à phase inversée (RP-HPLC)	54
4. Caractérisation de l'extrait enzymatique purifié	54
4.1. Détermination de la température optimale d'activité coagulante	55
4.2. Détermination du pH optimal de coagulation enzymatique	55
4.3. Détermination de la concentration de CaCl ₂ sur l'activité coagulante	55
4.4. Effet des inhibiteurs sur l'activité coagulante	55
5. Prédiction des séquences primaires en acides aminés	55
6. Essai de fabrication de fromage à pâte fraîche « petit suisse »	56
6.1. Préparation de lait	56
6.2. Emprésurage	56
6.3. Découpage	56
6.4. Séparation	56
6.5. Analyse physico-chimique du lait	57
6.5.1. Détermination de l'acidité	57
6.5.2. Détermination de la matière sèche totale (EST)	57
6.6. Contrôle microbiologique du fromage	57
III. Analyse statistique	58
1. Test de Student (Test t)	58
2. Test de corrélation	58
Chapitre III. Résultats et discussion	59
I. Variation de la composition du lait en fonction de quelques facteurs de production	59
1. Effet de la race sur la composition physico-chimique du lait	59
1.1. Effet de la race sur la matière grasse et les protéines	60
1.2. Effet de la race sur les acides gras	60
1.2.1. Acides gras saturés	61
1.2.2. Acides gras insaturés	61
2. Effet de l'alimentation sur la composition physico-chimique du lait	62
2.1. Acidité	63
2.2. Lactose	63
2.3. EST	63
2.4. Densité	64
2.5. Protéines	64
2.6. Matière grasse	64
2.6.1. Acides gras	65
3. Etude de la corrélation entre les facteurs de production et les variables physicochimiques et technologiques du lait	67

II. Extraction et purification de la protéase du proventricule de la dinde <i>Meleagris gallopavo</i>	70
1. Extraction de la protéase de dinde	70
2. Purification de l'extrait coagulant brut de la dinde	70
3. RP-HPLC des fractions obtenues par FPLC échangeuse de cations	76
4. Caractérisation de l'extrait enzymatique purifié	77
4.1. Détermination de la température optimale d'activité de l'EEP	77
4.2. Détermination du pH optimal d'activité de l'EEP	78
4.3. Détermination de la concentration optimale d'activité en CaCl ₂	79
4.4. Stabilité de l'EEP à la conservation	80
4.5. Effet de quelques effecteurs sur l'activité coagulante	81
III. Analyse de la séquence en acides aminés de l'enzyme pepsin-like de <i>Meleagris gallopavo</i>	82
IV. Application de la pepsine de dinde : élaboration d'un fromage à pâte fraîche (petit suisse)	89
1. Analyses physico-chimiques	89
1.1. Le lait	89
1.2. Les fromage à pâte fraîches	90
2. Analyses microbiologiques du lait et du fromage	93
2.1. Le lait	93
2.2. Analyses microbiologiques du Fromage	94
3. Rendement fromager	95
4. Analyses sensorielles du fromage	96
Conclusion générale	100
Références bibliographiques	
Annexes	

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Introduction générale

Le lait est un des produits de base de l'alimentation humaine. Il est comme la plupart des matières premières d'origine biologique, très périssable : il s'altère rapidement par voies microbienne et enzymatique. Sa forte dégradabilité naturelle, a contraint l'homme à inventer des moyens de différer son altération. Ainsi plusieurs procédés de transformation du lait en produits dérivés (fromages, laits fermentés, laits en poudre) sont connus depuis des siècles. **(Ould Eleya, 1996).**

Cependant, les éleveurs laitiers et les industriels se trouvent souvent confrontés à des défaillances au niveau de la qualité physicochimique du lait cru. Parmi ces défaillances, on peut citer une diminution du taux butyreux du lait. La composition du lait peut varier selon des facteurs génétiques (espèce, race) et environnementaux (alimentation, saison, stade de lactation, individu), ainsi que par des interactions plus ou moins complexes entre ces facteurs **(Stoop et al., 2009).**

Les grandes variations de la composition du lait qui apparaissent au niveau des laits individuels (vaches considérées individuellement) s'atténuent au niveau des étables et à fortiori des laiteries. Mais il subsiste des différences encore sensibles entre laits de diverses régions selon les races de vaches prédominantes, le type d'élevage, le climat, etc. Par ailleurs, des modifications de composition interviennent tout au long de la chaîne des traitements depuis l'instant de la traite jusqu'à celui reçus par les usines laitières (lait de grand mélange). **(Favier, 1985)**

En Algérie ces deux dernières décennies, et grâce à la libéralisation de l'économie, une importante industrie laitière privée s'est développée, mais basée essentiellement sur l'importation de matières premières : laits en poudre, MGLA, fromage de transformation... Les laiteries conventionnées avec l'ONIL sont en 2012 au nombre de 153 dont 15 laiteries publiques (Giplait).

Il existe une dizaine de laiteries privées qui ne fonctionnent qu'avec du lait cru pour la fabrication du lait pasteurisé et qui reçoivent une subvention d'intégration de 6 DA/litre. **(Soukehal, 2013).**

L'Algérie est classée comme le plus gros consommateur de lait et de produits laitiers au Maghreb avec 145 litres / an / personne selon les statistiques fournies par **ONIL, (2018)**

Introduction générale

L'altérabilité du lait impose sa transformation rapide par divers procédés en l'occurrence la fabrication de fromage.

La transformation du lait en fromage passe par une première phase essentielle, dans le processus, la coagulation du lait, phénomène complexe qui implique une enzyme appelée couramment présure commerciale.

La présure, contient la chymosine (EC 3.4.23.4) en tant que composant principal de l'enzyme, a été le plus largement utilisée dans la fabrication du fromage. La production de fromage a augmenté d'un facteur d'environ 3,5 depuis 1961, mais l'approvisionnement en présure a diminué en raison de la disponibilité limitée des estomacs de ruminants. Divers facteurs tels que le prix élevé de la présure, les considérations religieuses (par exemple, l'islam et le judaïsme), le régime alimentaire (végétarien) ou l'interdiction de la présure de veau recombinant (en France, en Allemagne et aux Pays - Bas) ont encouragé la recherche de sources alternatives d'enzymes de coagulation du lait. La recherche a été dirigée vers l'obtention d'enzymes coagulantes pouvant remplacer la présure de veau dans la fabrication du fromage, y compris les enzymes d'origines microbiennes, végétales, animales et recombinant (biotechnologie) (**shah et al. 2014**).

Différentes alternatives microbiennes sont utilisées pour la production de chymosine, mais ces techniques ne conviennent pas à la production de fromage de qualité parce qu'elles entraînent un goût amer (**Kumar et al., 2006 ; Walsh et Li, 2000**). Une autre inconvénient qui empêche l'utilisation de la présure microbienne est la grande stabilité thermique, provoque une protéolyse indésirable, entraînant une perte de saveur et une amertume (**Kurutahalli et al., 2010**).

Le génie génétique est utilisé pour produire des microorganismes génétiquement modifiés capables de synthétiser la chymosine recombinante, chimiquement et fonctionnellement identique à l'enzyme native produite par les ruminants (**Espinoza-Molina et al., 2016**). La chymosine de veau (variante génétique B) est largement produite par la technologie de l'ADN recombinant par des micro-organismes tels que *Aspergillus niger* et *Kluyveromyces lactis*.

D'autres chymosines recombinantes sont obtenues à partir d'organes de chèvre et de buffle (**Corredig et Salvatore, 2016**).

Introduction générale

L'activité protéolytique résiste à des températures élevées (température de pasteurisation supérieure à la normale) provoque une protéolyse indésirable, entraînant une perte de saveur et entraîne un goût amer (**Kurutahalli et al., 2010**).

Plusieurs enzymes coagulantes ont été identifiées dans différentes espèces végétales, Cependant, de nombreuses préparations enzymatiques sont jugées inappropriées car elles produisent des fromages extrêmement amers (**Egito et al., 2007 ; Beigomi et al., 2014**). Les activités protéolytiques excessives, de la plupart des coagulants végétaux, ont limité leur utilisation dans la fabrication du fromage en raison des faibles rendements en fromage, de la saveur amère et des défauts de texture. La recherche de nouvelles enzymes potentielles de coagulation chez les plantes se poursuit encore afin de répondre à la demande mondiale croissante pour une production de fromage diversifiée et de bonne qualité (**Shah et al., 2014**).

L'Algérie utilise environ 1,5 tonne par an de présure ou de ses succédanés d'origine microbienne dans la préparation de fromages à coagulation enzymatique. Cette quantité coûte approximativement 102 000 \$, somme équivalente à 7,5 millions de DA (**Benyahia krid, 2013**). L'importation de fromage en Algérie est passée de 4 612,8 millions de Da en 2011 à 13512,9 millions de Da en 2016 (**ONS, 2016**).

Par ailleurs, les protéases aviaires, en l'occurrence de poulet (**Bohak, 1969**), de la caille (**Esumi et al., 1980**), du canard (**Pichová et Kostka, 1990**) et de la dinde (**Temiz et al., 2007 ; Temiz et al., 2008**) sont considérés comme des sources adéquates d'enzymes de la pepsine.

Ainsi, l'utilisation de l'enzyme pepsine du poulet dans la fabrication de certains fromages cuits tels que l'Emmental et le Kashkaval a donné des résultats satisfaisants (**Gordin et Rosenthal, 1978**). En effet, ces fromages présentaient une qualité comparable à celle des fromages du même type préparés avec de la présure.

De même l'industrie de volaille génère des coproduits (abats) importants qui peuvent être une source potentielle d'enzymes (pepsine) coagulant le lait. Cependant, il existe peu d'informations sur la purification et la caractérisation de l'enzyme pepsine de la dinde (*Meleagris gallopavo*). La disponibilité de ces coproduits de dinde (proventricule)

Introduction générale

peu coûteux méritent d'être exploités en vue de la production de protéases coagulant le lait. C'est dans cette optique que s'inscrit notre étude.

Notre travail vise trois objectifs à savoir :

- ✓ Etude de la variabilité de la composition du lait (qualité) en fonction de quelques paramètres de production (race, et alimentation) (étude préalable)
- ✓ Extraction de protéases coagulant le lait extraites d'abats de dinde (proventricule) : obtention, purification et caractérisation de la protéase obtenue (pepsine de dinde, *Meleagris gallopavo*).
- ✓ Application : Efficacité de la protéase de dinde à coaguler le lait, qualité du produit obtenu (fromage à pâte fraîche type petit suisse).

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le lait

1. Définition

Le lait a été défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne comportant pas de colostrum » (Veisseyre, 1975).

C'est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune. Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté, d'une saveur douceâtre et d'un pH (6.6 à 6.8) légèrement acide, proche de la neutralité (Alais, 1984).

Le lait du point de vue physico-chimique est un système complexe et hétérogène dont la composition chimique varie en fonction de l'espèce, la race, l'âge, le stade et le nombre de lactation, ainsi que l'alimentation et les conditions de traitement (Walstra et al., 2005).

2. Composition du lait

Le lait est un produit d'origine biologique fortement altérable par voie microbienne et par voie enzymatique. C'est un milieu multiphasique : une phase aqueuse contenant essentiellement le lactose, les minéraux ; une phase dispersée de nature lipidique (globules gras) et une phase de nature protéique (micelles de caséines). Cette composition varie selon différents facteurs liés aux animaux. Les principaux étant la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison et l'âge (Vignola, 2002). Ces éléments majeurs sont présentés dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Composition générale du lait en g p. 100 mL (Vignola, 2002).

Composants majeurs	Valeur moyenne (g/100mL)
Eau	87,5
Matières grasses	3,7
Protéines	3,2
Glucides	4,6
Minéraux	0,9

2.1. Matières azotées

On retrouve dans le lait deux types de matières azotées. Les protéines contiennent environ 95 % de matières azotées alors que l'azote non protéique en constitue environ 5 % du total. Une distribution des différentes fractions azotées dans le lait de vache est schématisée dans la **Figure 1** (Swaisgood, 1992).

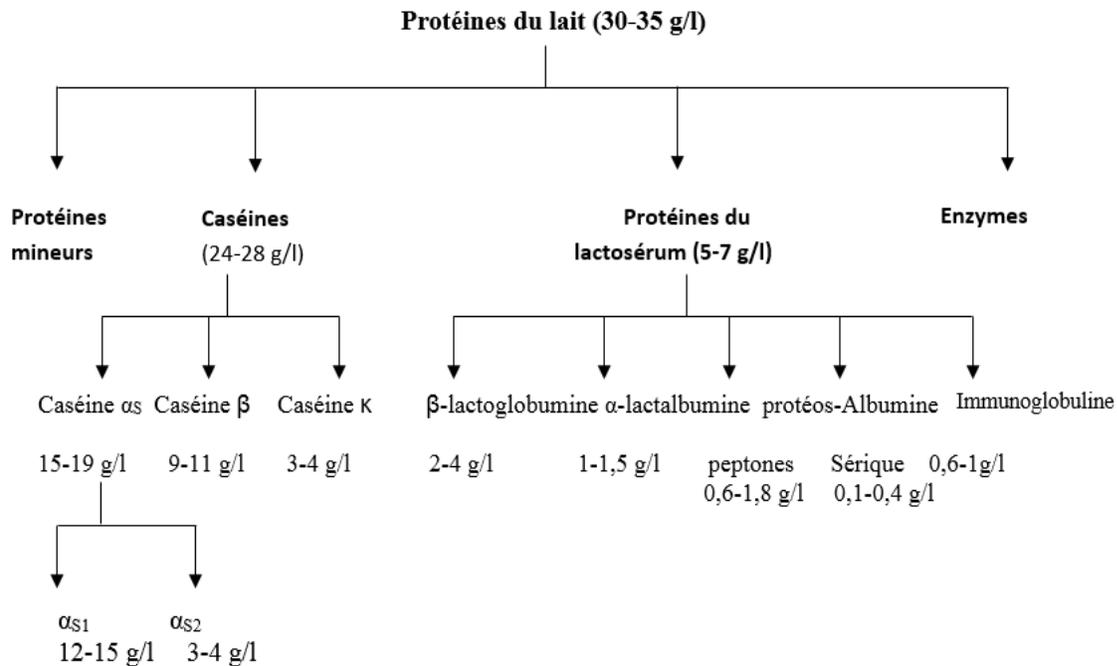


Figure 1: Distribution des fractions azotées du lait de vache (Swaisgood, 1992)

En fonction du pH, les protéines du lait peuvent être réparties en deux catégories ; les caséines (insolubles à pH 4,6) et les protéines du lactosérum (solubles à pH 4,6) (Alais et al., 2003) (**tableau 2**). La caséine entière représente 80% des protéines du lait de vache et se présente sous une forme micellaire. La micelle est formée par l'association des caséines α_{S1} , α_{S2} , β , κ et de composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphate. (Brule et al., 1997).

Le poids moléculaire des caséines α_{S1} , α_{S2} , β , κ , varie de 19 kDa pour la caséine κ à 23 kDa pour les caséines α_{S1} et β et jusqu'à 25 kDa pour la caséine α_{S2} (Swaisgood, 1982);

Tableau 2 : Composition moyenne des matières azotées du lait de vache (**Alais et al., 2003**)

	Proportion	g/litre (moyenne)
Total	100	34,0
Protéine	95	32,3
Caséines :	78 100	26,5
• Caséine alpha ₁	36	9,55
• Caséine alpha ₂	10	2,65
• Caséine beta	34	9,0
Caséine k	13	3,45
• Caséine y	7	1,85
Protéines solubles :	17 100	5,8
• β-lactoglobuline	50	2,9
• A-lactalbumine	22	1,3
• Sérumalbumine	5	0,3
• Immunoglobulines	12	0,7
• Protéoses peptones	10	0,6
Substances azotées non protéiques	5	1,7

2.1.1. Composition de la caséine

On distingue essentiellement trois types de caséines : la caséine α_s , la caséine β et la caséine κ (**tableau 3**) Ces caséines représentent environ 78 % des composés azotés du lait.

La caséine précipite seul lorsqu'on acidifie le lait à pH 4,6 ou lorsqu'on fait réagir une enzyme spécifique comme la chymosine (**Cheftel et al., 1985**).

Tableau 3 : Caractéristiques des constituants majeurs de caséines (Cayot et Lorient., 1998).

	Caséines α1	Caséines α2	Caséines β	Caséines κ
Proportion(%)	36	10	34	13
Concentration (g/L)	9,6	6,7	9	3,5
Masse moléculaire (Da)	23600	25250	24000	19000
Nombre de d'acides aminés	199	207	209	169
Phosphore (%)	1,1	1,3	0,56	0,2
Glucide (%)	0	0	0	5
Proline (%)	17	10	35	20
Résidus cystéine /mol	0	2	0	2
pHi	4,4	-	4,9	3,7
Sensibilité à chymosine	+	-	+	+++
Fixation du calcium	++	+++	+	0

Légende: - : insensible ; + : peu sensible ; ++ : sensible ; +++ : très sensible

a/ Caséines α S

- **Caséine α S₁**

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

- **Caséine α S₂**

Elle représente 8 à 11% de la micelle de caséine, possède 207 AA et 13 à 10 phosphates (il s'agit de α S₂ ou α S₃ ou α S₄ ou α S₆ selon le nombre de phosphates) et son poids moléculaire estimé varie de 25kDa.

b/ Caséines β et γ :

Caséine β

Représentant 25 à 35% de la micelle, avec ses 209 AA et ses 5 groupements phosphates, elle possède beaucoup d'analogie avec la caséine α S₁.

Caséine γ

Il s'agit des fragments C-terminaux résultant de la protéolyse de la caséine β par la plasmine.

c/ Caséine κ

Une grande majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure. Il s'agit d'une protéine de 169 AA, phosphorylée (Serine 149) comportant 2 variantes génétiques A et B. Elle comporte un constituant majeur non glycosylé (**Figure 2**) et des constituants mineurs glycosylés dont la structure précise est élucidée (**Swaisgood ,1992**).

Au cours de la phase enzymatique, la présure hydrolyse 80 à 90 % de la caséine κ au niveau de la liaison peptidique phénylalanine (105) et méthionine (106) à pH = 6,6. Cette action permet la libération de caséinomacropeptide fortement glycosylé et hydrophile (CMP, fragment 106-169) dans le lactosérum, l'autre partie reste associée aux autres caséines au sein des micelles, c'est la paracaséine κ (1-105). Ce taux d'hydrolyse correspond à 60 % du temps nécessaire pour obtenir une coagulation visible. Ce temps est noté temps de floculation. Cette hydrolyse entraîne une réduction de la charge négative et des répulsions stériques, de telle sorte que les micelles de caséine deviennent susceptibles à l'agrégation.

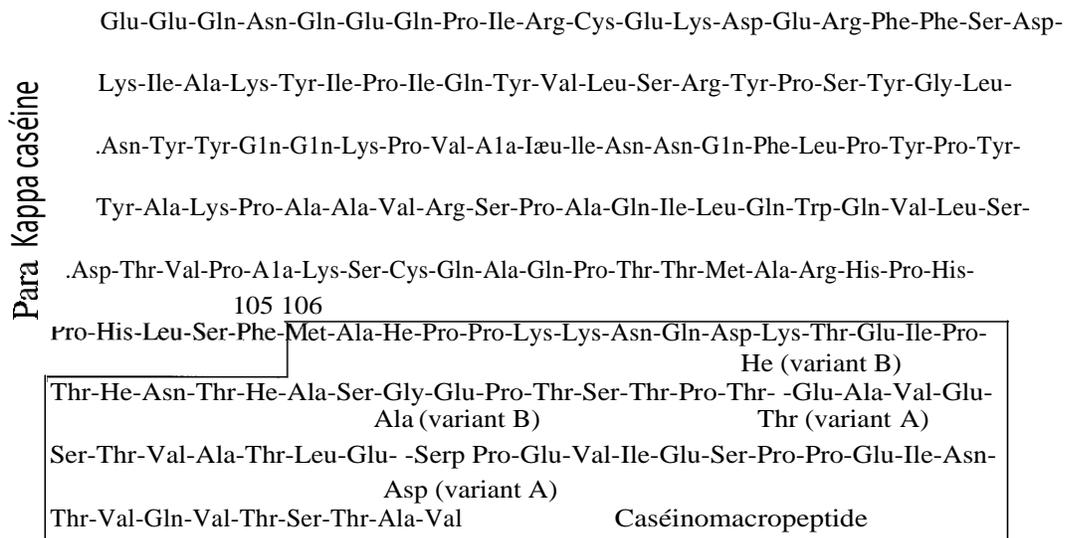


Figure 2 : Séquence primaire de la caséine kappa (**Swaisgood ,1992**).

D'un point de vue général, la protéolyse des caséines induit :

- 1) une diminution de leur poids moléculaire,
- 2) une augmentation du nombre de groupes ionisés (NH_3^+ et COO^-), et
- 3) un changement de conformation avec exposition de groupes hydrophobes.

En conséquence de cette dégradation protéolytique, la taille, le point isoélectrique et la flexibilité moléculaire des caséines modifient leurs techno-fonctionnalités (**Broyard et Gaucheron, 2015**)

2.1.2. Micelle de caséine

La micelle de caséine est une particule de taille variant de 100 à 500 nm avec un diamètre moyen de 180 nm (**Amiot et al., 2002 ; Fox, 2004**), elle est formée par l'association des caséines α_1 , α_2 , β , κ et de quelques fragments peptidiques de caséines γ et de composants salins dont le calcium et le phosphate. Son poids moléculaire moyen est de l'ordre de 108 Da et renferme entre 20 000 et 150 000 molécules de caséine.

En raison de l'importance des micelles de caséine pour le comportement fonctionnel des produits laitiers, la nature et la structure des micelles de caséine ont été largement étudiées, mais la structure exacte des micelles de caséine est encore à étudier. Différents modèles de structure micellaire de caséine ont été proposés. La plupart des modèles proposés se répartissent en trois catégories générales, à savoir: les modèles à enveloppe, les modèles de structure interne et les sous-unités (sous-micelles) (**Phadungath, 2005**).

Le modèle de sous-micelles suggère que la micelle serait constituée de sous-micelles de forme sphérique (10 nm de diamètre) qui sont reliées entre elles par des phosphates de calcium colloïdal (CCP). (**Figure 3**)

Les submicelles pourraient être constituées d'environ 10 molécules des 4 caséines en proportion variable avec une répartition de caséine κ (hydrophile) en surface, ce qui la stabilise. Les portions C-terminales de la caséine κ hérissent la micelle et l'enveloppent d'une chevelure périphérique particulièrement hydrophile (**Cayot et Lorient., 1998**).

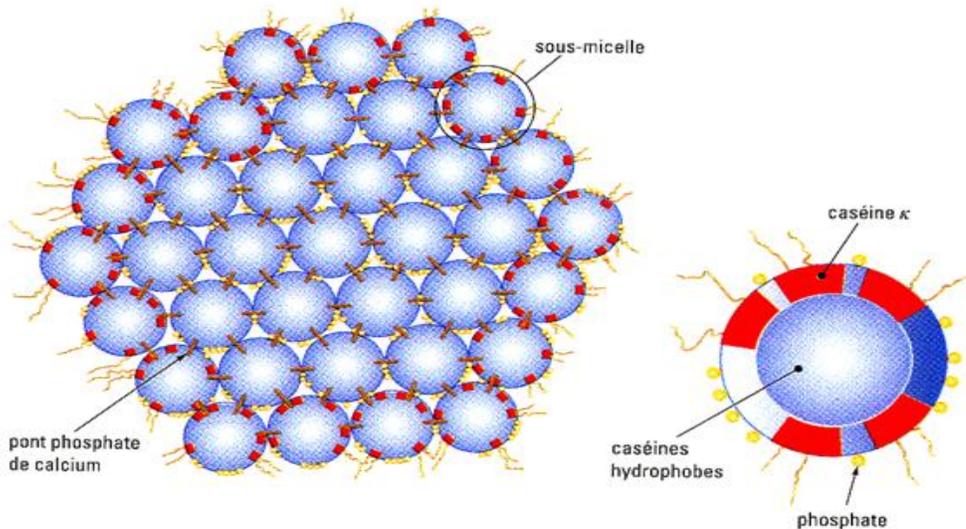


Figure 3 : Micelle de caséine et sous-micelle de caséine. Adapté de Tetra Pack Processing System, 1995 (Vignola, 2002).

Les travaux récents de **Marchin et al. (2007)**, **Dalgleish et Corredig (2012)**, proposent des modèles ouverts, souvent dits en éponge (**Figure 4**). En effet, **Marchin et al. (2007)** ont montré, en utilisant des techniques d'observation de cryo-microscopie à transmission, que la caséine κ n'était pas uniquement à la surface de la micelle de caséine.

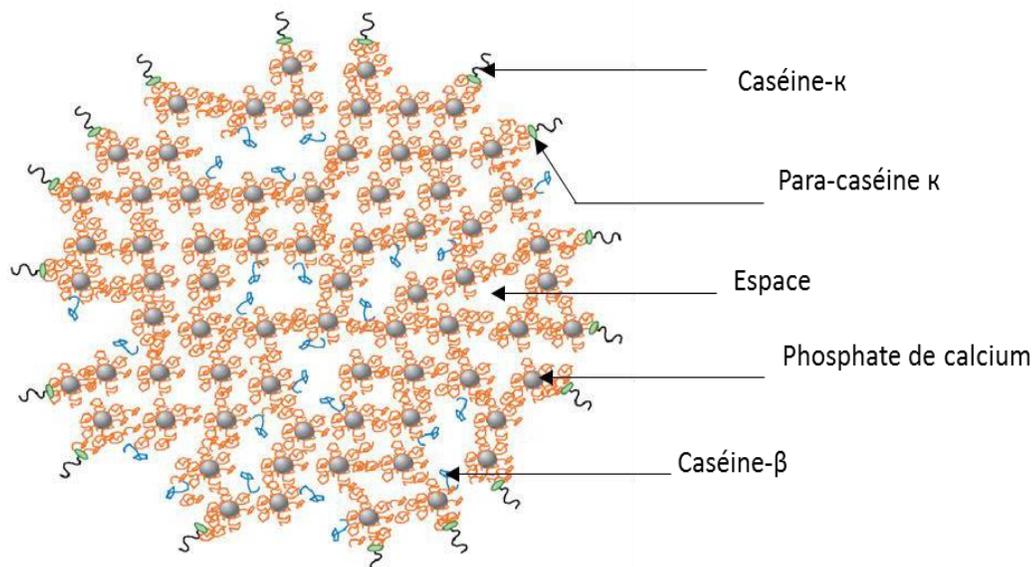


Figure 4. Structure en éponge de la micelle de caséine (**Dalgleish et Corredig, 2012**).

2.1.3. Protéines du lactosérum

Elles représentent 17 % de la matière azotée. Elles se retrouvent dans le lactosérum et sont qualifiées de solubles parce qu'elles ne précipitent pas au pH_i de la caséine entière. Les deux principales protéines du lactosérum sont l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline (**tableau 4**) elles sont les plus immunogènes et leur composition en acides aminés est très différente de celle des caséines en ce qu'elles contiennent moins d'acide glutamique et proline mais sont plus riches en acides aminés soufrés (**Ramet et Weber, 1980**). Le lactosérum referme également des protéoses-peptones qui sont des substances glycoprotéiques peu abondantes dans le lait (**Vetier et al., 2000**).

Tableau 4 : Caractéristiques des constituants des protéines du lactosérum (**Cayot et Lorient., 1998**).

Nature	Composition (g/L)	Poids moléculaire et nombre de résidus	pH	caractéristiques
β - Lactoglobuline	2,7	18000 (162)	5,2	2 ponts disulfures
α -lactalbumine	1,5	163 (132)	5,1	4 ponts disulfure /groupement thiol libre
sérumalbumine	0,5	65000 (582)	4,7	17 ponts disulfures
Immunoglobuline	0,7	150000 à 1800000	7,5	Majorité anticorps
Protéose-peptone	0,5	-	-	Protéine très hétérogène
Protéines mineures	0,30	43000 à 86000	-	Composition complexe et hétérogène

2.2. Eau

C'est l'élément quantitativement le plus important. Elle conditionne l'état physique des autres constituants, en intervenant dans l'émulsion de la matière grasse et la dispersion des micelles de caséines lors de la transformation (75 à 80%) de cette eau se retrouve dans le lactosérum. De plus l'eau intervient dans le développement bactérien et les altérations du lait (**Mahaut et al., 2003**).

2.3. Glucides

Le sucre principal du lait est le lactose, disaccharide constitué par l'association d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose. On ne relève que 70 mg.L⁻¹ de glucose et 20 mg.L⁻¹ de galactose ainsi que des traces d'autres glucides.

Le constituant principal de la matière sèche du lait est le lactose qui présente une moyenne de 50 g/L (**Linden et Lorient., 1994**).

D'autres glucides peuvent être présents en faible quantité, comme le glucose et le galactose qui proviendraient de l'hydrolyse du lactose, en outre certains glucides peuvent se combiner aux protéines (**Amiot et al., 2002**).

2.4. Lipides

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

La composition des lipides du lait varie avec l'espèce ; 35g/l environ pour celui de la femme et de la vache ; 40 à 50 g/l pour les autres espèces.

En plus des triglycérides, on trouve des phospholipides, stérols cholestérol notamment qui constituent le reste (1 à 3 % des lipides totaux) (**Linden et Lorient, 1994**).

2.5. Minéraux

Ils sont présents dans le lait à 7 g/l environ. Les plus représentés, en quantité, sont le calcium, le phosphore, le potassium et le chlore (**tableau 5**). On retrouve ces matières salines soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble. Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont particulièrement bio disponibles. Les autres (calcium, phosphore, magnésium et soufre) existent dans les deux fractions (**Libouga et al., 2013**).

Tableau 5 : Composition du lait en minéraux (Julliard et Richard, 1996).

Minéraux	Teneur (mg/kg)	Minéraux	Teneur (mg/kg)
Sodium (Na)	445	Calcium (Ca)	1180
Magnésium (Mg)	105	Fer (Fe)	0,50
Phosphore (P)	896	Cuivre (Cu)	0,10
Chlore (Cl)	958	Zinc (Zn)	3,80
Potassium (K)	1500	Iode (I)	0,28

2.6. Vitamines

Toutes les vitamines sont présentes dans le lait frais en quantité plus ou moins grande à l'exception de la vitamine B 12. A noter la richesse en vitamine B 12. (**Tableau 6**). Le lait est une bonne source en vitamines, on distingue les vitamines hydrosolubles (vitamines B1, B2, B6) et les vitamines liposolubles (Vitamine A, D, E, K) (**Debry, 2001**).

Tableau 6 : Teneur moyenne des principales vitamines du lait (**Debry, 2001**).

Vitamines	Teneur moyenne (µg/ml)
Vitamines liposolubles	
Vitamine A (+ carotènes)	40µg/100ml
Vitamine D	2,4µg/100ml
Vitamine E	100µg/100ml
Vitamine K	5µg/100ml
Vitamines hydrosolubles	
Vitamine C (acide ascorbique)	2/ µg 100ml
Vitamine B1 (thiamine)	45µg/100ml
Vitamine B2 (riboflavine)	175µg/100ml
Vitamine B6 (pyridoxine)	50µg/100ml
Vitamine B12 (cyanocobalamine)	0,45µg/100ml
Niacine et niacinamide	90µg/100ml
Acide pantothénique	350µg/100ml
Acide folique	5,5µg/100ml
Vitamine H (biotine)	3,5µg/100ml

2.7. Enzymes

Ce sont des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Environ 60 enzymes principales ont été répertoriées dans le lait dont 20 sont des constituants natifs. Une grande partie se retrouve dans la membrane des globules gras mais le lait contient de nombreuses cellules (leucocytes, bactéries) qui élaborent des enzymes (**Pougheon, 2001**).

3. Caractéristiques du lait

3.1. Caractéristiques organoleptiques

3.1.1. Couleur

Le lait est un liquide blanc mat, opaque à cause des micelles de caséinates, ou parfois bleuté ou jaunâtre du fait du bêta carotène ou de la lactoflavine contenue dans la matière grasse. (**Sousa et Malcata, 2002**).

3.1.2. Odeur

Toujours faible et variable en fonction de l'alimentation de la femelle productrice

3.1.3. Saveur

Elle est douceâtre, faiblement sucrée, en raison de sa richesse en lactose dont le pouvoir sucrant est inférieure à celui du saccharose.

3.1.4. Viscosité

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

3.2. Caractéristiques physico-chimiques

3.2.1. Densité

Elle oscille entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,032 à 20°C. La densité des laits écrémés est supérieure à 1,035 (**Vierling, 2008**).

3.2.2. Acidité de titration ou acidité Dornic

Le lait présente une acidité qui peut être titrée par une solution d'hydroxyde de sodium en présence de phénophtaléine à 1 % comme indicateur coloré. Cette acidité est exprimée en degré dornic, c'est-à-dire en décigramme d'acide lactique par litre. Le mouillage du lait provoque une diminution de son acidité qui se situe normalement entre 15 et 18°D pour un lait frais (AFNOR, 1986).

3.2.3. Point de congélation

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques la plus constante. Sa valeur moyenne, si l'on considère des productions individuelles de vache, se situe entre -0,54 °C et -0,55°C.

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau puisque la présence de solides solubilisés abaisse le point de congélation. Il peut varier de -0,530°C à -0,575°C avec une moyenne à -0,555°C. (Mathieu, 1998).

3.2.4. pH

Le pH du lait n'est pas une valeur constante, il est de l'ordre de 6,6 et 6,8; il peut varier au cours du cycle de lactation et sous l'influence de l'alimentation. Le pH représente l'acidité actuelle du lait, c'est celle-ci que dépendent des propriétés importantes comme la stabilité de la caséine. le pH permet de déterminer le vieillissement du lait (Vetier et al., 2000 in Beka, 2011).

II Facteurs de variation de la composition du lait

Les grandes variations de la composition du lait qui apparaissent au niveau des laits individuels (vaches considérées individuellement) s'atténuent au niveau des étables et les laiteries. Par ailleurs, des modifications de composition interviennent tout au long de la chaîne des traitements depuis l'instant de la traite jusqu'à celui reçu par les usines laitières (lait de grand mélange).

La composition chimique du lait et ses caractéristiques technologiques varient sous l'effet d'un grand nombre de facteurs. Ces principaux facteurs de variation sont bien connus, ils sont liés soit à l'animal (facteurs génétiques, stade de lactation, état sanitaire ...) soit au milieu et à la conduite d'élevage (saison, climat, alimentation). Cependant, si les effets propres de ces facteurs ont été largement étudiés, leurs répercussions pratiques sont parfois plus difficiles à interpréter compte tenu de leurs interrelations. **(Pougheon, 2001)**

1. Effets de la race

De nombreuses études ont été réalisées pour évaluer l'effet des caractéristiques génétiques des animaux sur les caractéristiques du lait. La comparaison des deux races Normande à celui des vaches Holstein fait apparaître de grandes différences pour la plupart des variables, la race Normande produisant moins de lait que la Holstein, mais ayant des taux protéiques (+ 2 à + 2,5 ‰), butyreux (+ 2 à + 3 ‰) et calciques (+ 0,1 ‰) nettement plus élevés, des micelles de caséine plus petites et des tests technologiques très supérieurs (différence relative de - 26 % pour le temps de floculation, - 72 % pour le temps de raffermissement, + 20 % pour la fermeté du caillé). **(Froc et al., 1988)**

Les différences de composition du lait entre races et régimes, essentiellement de taux protéique, se sont répercutées directement sur le rendement en fromage frais et affiné. Les rendements les plus élevés ont été obtenus avec les régimes à base de foin et d'herbe pâturée et avec les vaches Montbéliardes. La baisse du taux protéique du lait liée au régime ensilage d'herbe et à la race Holstein s'est traduite par une réduction du rendement fromager. **(Garel et Coulon, 1990).**

La limite supérieure de la teneur en différents taux dans le lait de vache (TP et TB) est déterminée par son potentiel génétique. C'est pour cela que l'on parle de races laitières, qui se distinguent par le volume et la composition du lait qu'elles produisent. Ce sont les Frisonnes qui produisent le plus grand volume de lait ; en moyenne 7890 kg par vêlage mais c'est chez les vaches les moins productives que l'on trouve le lait le plus riche en corps gras (5%), alors que les Frisonnes fournissent un lait qui n'en contient que 3,61%. **(Coulon et al., 1991)**

Selon **Machboeuf et al. (1993)**, On n'observe pratiquement pas d'influence significative de la race sur les proportions relatives des différentes caséines. Les vaches Montbéliardes présentent cependant la plus forte proportion de caséines bêta et les Tarentaises la plus faible, en particulier juste après la mise à l'herbe.

Tableau 7 : production laitière quotidienne moyenne, taux butyreux et protéique moyen par race. (Coulon et al. 1998)

Caractères Races	Production laitière (Kg /jour)	Taux butyreux (g/l)	Taux protéique (g/l)
Montbéliarde	20	38,6	34,1
Holstein	30,5	40,7	33,3
Guernesey	12	46	36
Ayrshire	28	39	33
Jersey	11	48	38
Pie rouge des plaines	23	41,3	34,4
Brune des Alpes	24	39,3	34,5
Normande	20,5	43,4	35,4
Abondance	19	37,4	34,3
Tarentaise	15	36,1	33,7
Bleu du nord	17,5	36,5	32,3

Selon les mêmes auteurs, le lait produit par la vache Montbéliarde est plus riche en matières grasses que celui produit par les vaches Holstein. Par ailleurs **Pougheon et Goursaud (2001)**, affirment que la sélection sur la quantité de lait lui réduit sa richesse, alors que la sélection sur les quantités de matières grasse permet de maintenir les taux à un niveau génétique plus constant.

2. Effets de l'alimentation

Contrairement à la plupart des autres facteurs, ils agissent à court terme et peuvent faire varier les taux butyreux et protéique de manière indépendante. (**Martin et Coulon, 1995**).

L'apport de concentré au pâturage entraîne une baisse du taux butyreux et une augmentation du taux protéique du lait de - 0,30 g/kg et + 0,24 g/kg respectivement pour chaque kg de MS de concentré consommé (**Delaby et al, 2003**)

Selon **Coulon et al. (1997)**, les vaches nourries à base de foin produisent moins de lait que celle recevant de l'ensilage d'herbe (19,5 kg/j contre 20,2 kg/ j), mais leurs laits sont plus riches en matières grasses et en protéines (31,2 g/kg contre 32,2 g/kg).

L'introduction de la luzerne déshydratée de qualité en substitution partielle de l'ensilage de maïs a permis d'augmenter la production de lait et de faire baisser le taux butyreux sans affecter le taux protéiques. Le taux protéique augmente donc de manière linéaire avec les apports énergétiques (**Bony et al., 2005**).

Au contraire, le taux butyreux tend à baisser dans le cas de niveaux énergétiques très élevés en raison de l'arrêt de la mobilisation des réserves corporelles qui entraînent souvent une augmentation du taux butyreux (**Doreau et Chilliard, 1992**).

Selon **Agabriel et al. (1993)** l'augmentation d'apport énergétique se traduit généralement par un accroissement de la teneur en protéines et de la production laitière.

La complémentation à base de Blé a induit une légère baisse de la production laitière (-0,5 kg, $p < 0,05$) et un accroissement modéré du taux protéique (+0,5 g/kg, $p < 0,01$) par rapport aux 2 concentrés riches en parois végétales (**Delaby et Peyraud, 1994**).

Hoden, (1987) affirme qu'en début de la lactation chez les vaches recevant à volonté des ensilages de maïs d'excellente qualité, l'amélioration de la nutrition azotée fait augmenter la production de lait tout en diminuant la mobilisation des réserves lipidiques. Cependant le taux butyreux ne diminue pas, il a plutôt tendance à s'accroître, car l'ingestion de fourrage et sa proportion dans la ration s'accroissent (**tableau 8**).

Tableau 8 : Influence du niveau des apports azotés en début de lactation sur la production et la composition du lait. (Hoden, 1987)

Distribution du fourrage Niveau d'apport azoté	limité		A volonté	
	bas	haut	bas	haut
Quantité d'ingérées kg MS				
- ensilage de maïs	10.5	10.5	11.2	13.4
- aliment concentré	5.5	5.6	4.7	4.8
Apports PDI	1430	175 0	135 0	1920
UFL	15.5	15.5	14.3	16.2
Lait (kg)	24.9	28.0	25.9	29.6
Taux butyreux g ‰	40.1	39.3	41.4	42.6
Taux protéique g ‰	32.5	32.3	32.3	32.7
Perte de poids vif (kg)	- 13	- 20	- 23	-13

Une étude (Chenais et al., 2004) compare les taux des différents acides gras du lait en fonction de différents types d'alimentation. D'une manière générale les laits d'été, issus d'une alimentation à base de fourrage en vert sont plus riches en acides gras longs et insaturés que les laits d'hiver issus d'une alimentation à base de fourrages conservés. Cet effet semble indépendant des espèces pâturées, mais il est moins marqué lorsque l'herbe pâturée est associée à de l'ensilage d'herbe ou de maïs (tableau 9).

Tableau 9 : Influence du régime alimentaire sur la composition en acides gras des laits
(Chenais et al., 2004)

Type de régime	Estival					Hivernal				
Régime	Pât-EM	Pât-EH	RGA	RGA-TB	PN	EM	EMs	EMc	EM-EH	EH
Nb de série	7	1	3	5	2	3	1	1	2	3
AG (% des AG totaux)										
AG courts	9,3	11,1	9,8	8,7	8,7	8,7	9,1	9,5	8,8	8,9
AG moyens (C12-C16)	49,8 a	50,1	43,9 b	46,4 b	44,9 b	56,3	57,9	54,3	54,6	57,4
AG longs	39,1 a	36,8	44,4 b	42,7 b	44,2 b	33,5	31,5	34,6	35,2	32,1
AG saturés	68,2 a	69,4	63,8 b	64,4 b	65,9ab	72,4	73,1	70,9	72,7	73,4
dont C16:0	30,1 a	31,7	25,8 b	27,1 b	25,2 b	35,7	35,8	31,5	35,2	36,6
C18:0	10,4 a	8,8	11,0 b	10,8 b	14,2 c	9,0	8,8	9,5	10,0	8,6
AGMI	26,2 a	24,8	29,8 b	28,7 b	27,8ab	23,1	22,6	24,4	22,9	21,7
dont C18 :1	23,7 a	21,7	27,1 b	26,0 b	25,8ab	20,1	19,6	21,6	20,2	18,7
C18 :1, t11	2,0 a	1,6	2,9 b	3,1 b	2,6 ab	1,3	1,0	1,2	2,9	1,0
trans hors vacc.	0,9	0,9	1,1	1,1	1,0	0,9	0,8	0,8	1,1	0,7
AGPI	3,6 a	3,7	4,4 b	4,4 b	4,0 ab	2,9	2,7	3,1	1,0	3,0
dont C18 :2	2,8 a	2,7	3,4 b	3,5 b	2,9 a	2,4	2,2	2,6	2,3	2,2
C18:3	0,5 a	0,7	0,7 b	0,8 b	0,8 b	0,3	0,2	0,3	0,3	0,5
CLA	0,8 a	0,7	1,4 b	1,3 b	1,0 ab	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4
AG oméga-3	0,6 a	0,7	0,9 b	1,0 b	0,9 b	0,4	0,3	0,3	0,4	0,5
AG oméga-6	2,3	2,2	2,1	2,5	2,0	2,1	2,1	2,3	2,1	2,1
Oméga-6/Oméga-3	4,4	2,9	2,5	2,6	2,3	7,5	8,3	8,0	5,6	5,2

Pât-EM : ration à base d'herbe au pâturage + ensilage de maïs Pât-EH : ration à base d'herbe au pâturage + ensilage d'herbe RGA : ration à base de pâturage de Ray Grass Anglais

RGA-TB : ration à base de pâturage de Ray Grass Anglais + Trèfle Blanc PN : ration à base de prairie naturelle

EM : ration à base d'ensilage de maïs

EMs : ration à base d'ensilage de maïs + tourteau de soja EMc : ration à base d'ensilage de maïs + tourteau de colza EM-EH : ration à base d'ensilage de maïs + ensilage d'herbe EH : ration à base d'ensilage d'herbe.

Dans une autre étude (Verdier Metz et al., 1998 in Voisin,2010), d'importantes différences de caractéristiques sensorielles ont été observées entre des fromages selon que le lait provenait de vaches recevant une ration hivernale (à base de foin et d'ensilage d'herbe) ou conduites au printemps sur un pâturage de montagne (Tableau 10).

Tableau 10 : Effet de la conservation du fourrage sur les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles des fromages (**Verdier-Metz et al., 1998** in **Voisin 2010**).

Ration	Essai 1		Essai 2	
	Ensilage d'herbe	Foin	Ensilage d'herbe	Pâturage
<i>Lait</i>				
Taux butyreux (g/kg)	35,3	36,3	36,4	37,1
Taux protéique (g/kg)	33,6	33,5	28,7**	33,6
<i>Fromage</i>				
Extrait sec (%)	54,6	54,8	52,6	52,7
Gras/sec (g/kg)	52,3	52,0	54,1**	50,5
Indice de jaune (Index de colorimétrie)	32,9**	29,9	24,7**	30,5
Texture ferme	4,6	4,5	4,3**	3,4
Texture collante	3,1	3,3	4,1*	3,5
Intensité du goût	5,4	5,3	5,0**	5,6
Intensité de l'odeur	5,2	5,2	4,6	4,4
Odeur piquante	-	-	1,3**	0,2
Amertume	3,5	3,2	1,5*	1,9

* : P < 0,05 ; ** : P < 0,01.

3. Facteurs physiologiques

3.1. Effets du stade de lactation

Les teneurs du lait en matières grasses et protéiques évoluent de façon inverse à la quantité de lait produite. Elles sont élevées en début de lactation (période colostrale), elles chutent jusqu'à un minimum au 2eme mois de lactation après un palier de 15 à 140 jours. Les taux croissent plus rapidement dans les trois derniers mois de lactation (**Pougheon et Goursaud, 2001**)

Les taux évoluent de façon inverse à la production laitière. Après un pic atteint entre 15 et 50 jours de lactation, la PL chute jusqu'à la fin de la lactation de 11 à 12 kg selon la race. Au contraire, le TB et le TP atteignent leur minimum autour du pic de lactation puis augmentent respectivement de 5,5 à 7,2 g/kg et de 6,6 à 7,2 g/kg selon la race (**Legarto et al., 2014**)

Selon **Meklati et al.(2017)**, le stade de lactation contribue de manière significative à la variation de certains paramètres physico-chimiques (acidité, densité et taux de graisse) du lait livré aux transformateurs locaux. Le profil du lait (AG) a également changé de manière

significative avec une faible proportion d'acides gras saturés (AGT) en début de lactation, en augmentation très significative en fin de lactation (respectivement 33.83 contre 38.85 %) (**tableau 11**).

D'après **Coulon et Machboeuf, (1994)**, l'augmentation du taux de calcium en seconde lactation a été accompagnée d'une diminution du taux de caséines, contrairement à la relation positive couramment observée entre ces 2 paramètres, et d'autre part, la seconde année, les taux de calcium mesurés sur des vaches en première ou en seconde lactation ont été identiques.

Dans d'autres études **Coulon et al. (1991)**, ont rapporté que les teneurs en matières grasses et en protéines évoluent de façon inverse à la quantité de lait produite. Elles sont maximales au cours des premiers jours de lactation, minimales durant les deuxième et troisième mois de lactation, et s'accroissent ensuite jusqu'à la fin de lactation. Cette augmentation est due en partie à l'avancement du stade de gestation, qui diminue la persistance de la production laitière.

Tableau 11 : Effets moyens et significatifs du stade de lactation sur la composition physico-chimique du lait (**Meklati et al., 2017**)

Paramètres physico-chimiques	Stade de lactation		
	début	milieu	Fin
pH	6.60±0.06	6.65±0.02	6.67±0.02
Acidité	17.93±0.95 ^a	17.26±0.16 ^{ab}	16.69±0.18 ^b
Densité	1030.93±0.23 ^{ab}	1030.27±0.04 ^b	1031.66±0.75 ^a
EST (g/L)	120.73±2.39 ^b	120.37±0.58 ^b	126.37±2.90 ^a
ESD (g/L)	84.93±0.04	84.20±0.15	85.02±0.93
TP (g/L)	30.43±0.87	31.64±0.34	31.86±0.70
TB (g/L)	35.80±2.80 ^b	36.17±0.66 ^b	41.11±2.72 ^a
AGT (g/L)	33.83±2.64 ^b	34.18±0.63 ^b	38.85±2.57 ^a

$p > 0,05$, dans chaque colonne, les valeurs (moyenne \pm écart type) mentionnées avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) en utilisant le test de Duncan. La lettre «a» correspond à la moyenne ajustée la plus élevée. Dans une même colonne, les valeurs avec des lettres différentes diffèrent considérablement les unes des autres

3.2. Effets numéro de lactation

Plusieurs auteurs ont confirmé que la quantité de lait et la quantité de matière grasse, augmentent avec l'âge au premier vêlage jusqu'à un maximum puis diminuent (**Cooper et al. 1982**). En effet les vaches atteignent leur maximum de production vers la 4^{ème} et la 5^{ème} lactation (**Ray et al. 1992**).

Coulon et Machboeuf (1994), ont rapporté que le taux de caséines et les différents paramètres de la coagulation du lait ont été améliorés de 20 à 30% en deuxième lactation.

Selon **Agabriel et al., (1990)**, les primipares ont des taux butyreux supérieurs (+ 0,8 g/kg en moyenne) et des taux protéiques inférieurs à ceux des multipares (- 0,6 g/kg après le 4eme mois de lactation).

D'autre part **Mattalah et al. (2015)** ont signalé que Le numéro de lactation a un effet sur la composition du lait. Les vaches en 4^{ème} lactation ont produit un lait plus riche en matières grasses et en protéines que celles en 6^{ème} lactation. D'autres part **Legarto et al. (2014)**, ont rapporté que Les multipares ont des performances différentes des primipares (L1).

Les vaches en deuxième lactation (L2) produisent, selon la race, jusqu'à 2,3 kg de lait, 0,6 g/kg de TB et 0,8 g/kg de TP de plus que les L1. Les écarts de performances entre multipares de rangs différents sont plus faibles. Les vaches en quatrième lactation et plus (L4+) produisent jusqu'à 1,8 kg de lait de plus que les L2. Les vaches en troisième lactation (L3) ont des performances intermédiaires.

Tableau 12: Influence du numéro de lactation sur la quantité et la composition du lait Produit. (**Robinson et al., 1973 in Chikhone, 1977**)

N° de lactation	Nbr de vaches	Quantité de lait produite (L/lactation)	Matière grasse (g/L)	Composition du lait %			
				ESC	MA	Caséine	Lactose
1	187	3310	41,1	90,1	33,6	27,3	47,2
2	138	3590	40,6	89,2	33,5	26,6	46,2
3	108	3840	40,3	88,2	32,8	36,3	45,9
4	102	4110	40,2	88,4	33	26,1	45,7
5	75	3930	39	87,2	32,6	25,4	45,3
6	65	4020	39,1	87,4	33	26,2	44,8
7	44	4260	39,4	86,7	32,5	25,3	44,8

3.3. L'âge au premier vêlage

Les vaches vêlant pour la première fois après 35 mois produisent selon la race 0,5 à 0,7 kg de lait en plus que celles vêlant avant 28 mois. Ces mêmes vaches produisent un lait ayant, en race Holstein, jusqu'à + 0,9 g/kg de TB et + 0,5 g/kg de TP. Les vaches Normandes vêlant à plus de 35 mois produisent + 0,5 g/kg de TB que celles vêlant précocement.

Le TP n'est pas affecté dans cette race. En Montbéliarde, ni le TB ni le TP ne sont influencés par l'âge au premier vêlage. Le profil en AG du lait est peu affecté par ce facteur. (**Legarto et al., 2014**).

Agabriel et al. (1990) rapportent que les vêlages de fin d'été et d'automne (août à octobre) conduisent ainsi à une meilleure persistance de la production et à des taux plus stables et plus élevés (+ 0,7 g/kg de taux protéique, $P < 0,01$) que les vêlages de fin d'hiver (février à avril). Les lactations démarrant en début d'été (mai à juillet), bien qu'ayant le niveau initial le plus élevé, présentent une production totale inférieure de près de 700 kg ($P < 0,01$) à celle des lactations démarrant en fin d'été ou au début d'hiver

4. Effets de la saison

La saison agit essentiellement par l'intermédiaire de la durée du jour. La plupart des travaux ont, en effet, montré qu'une durée d'éclairage expérimentale longue (15 à 16 h par jour), augmentait la production laitière et diminuait parfois la richesse du lait en matières utiles. (**Coulon et al., 1991**)

Différents indices permettent de penser qu'un effet propre de la saison intervient sur les relations entre certaines variables laitières observées, effet qui interfère avec les fortes liaisons bien connues, telles que taux de caséine-fermeté par exemple.

Pour illustrer ce propos, on citera, en particulier, le cas de deux groupes de lait (Normandes hiver et Pie-Noires-printemps), qui ont des laits très similaires du point de vue des taux de matières azotées et des dimensions des micelles et dont les qualités technologiques sont significativement très différentes : les laits des Normandes-hiver sont meilleurs pour le temps de floculation et moins bons pour le temps de raffermissement et la fermeté du caillé. Ces observations montrent la nécessité d'études plus fines concernant les variations saisonnières des laits. (**Froc et al., 1988**)

D'un autre côté et selon **Coulon et al. (1986)**, les variations saisonnières de la production laitière sont assez marquées ; il semble que les mois d'avril à juillet soient les plus favorables et ceux d'août à novembre les moins favorables, ce qui expliquerait la meilleure persistance de

production des vaches ayant vêlé en hiver. Ce résultat est vraisemblablement dû à l'effet favorable de la mise à l'herbe et du début de la période de pâturage sur la production laitière.

Selon **Chenais et al. (2004)**. Les laits d'hiver sont plus riches en acides gras moyens (+8,8 pt) et saturés (+6,5 pt). Leur rapport oméga-6 / oméga-3 est aussi significativement plus élevé (+3,3 pt). (**tableau 13**).

La production laitière est minimale de juillet à décembre et maximale de mars à mai, l'écart entre ces deux périodes étant de 1,3 kg/j en Holstein, 1,7 kg/j en Normandie et 2,8 kg/j en Montbéliarde. Les courbes d'évolution des taux sont parallèles entre elles et inverses à celle de la production laitière. Le TB est minimal en été et maximal en hiver. L'écart maximal observé est de 2,6 à 3,1 g/kg selon la race. L'amplitude des variations du TP est de 1,8 à 2,8 g/kg selon la race. (**Legarto et al., 2014**).

Tableau 13 : Influence du type de régime sur la composition des laits en acides gras (**Chenais et al. 2004**)

Type de régime	Hivernal	Estival
Nb de séries	10	18
AG (% des AG totaux)		
AG courts	8,9	9,2
AG moyens (C12-C16)	56,2	47,4
AG longs	33,3	41,4
AG saturés	72,7	66,2
dont C16:0	35,5	28,1
C18:0	9,1	11,0
AGMI	22,8	27,6
dont C18 :1	19,8	25,0
C18 :1, t11	1,2	2,5
trans hors vacc.	0,8	1,0
AGPI	2,9	4,0
dont C18 :2	2,3	3,1
C18:3	0,4	0,7
CLA	0,5	1,0
AG oméga-3	0,4	0,8
AG oméga-6	2,1	2,3
Oméga-6/Oméga-3	6,6	3,3

III. La coagulation du lait

1. Généralités

La Coagulation du lait est une étape décisive dans la fabrication de toutes les variétés de fromage. Il s'agit en général de la transformation du lait liquide en un gel, appelé coagulum ou caillé qui, après un certain nombre de transformations, deviendra un fromage (**Shieh et al. 2009; Mohamed Ahmed et al., 2010**).

Elle correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel des caséines qui flocculent puis se soudent pour former un caillot lactique ou présure, retient selon le cas plus ou moins de matière grasse, de minéraux, d'eau et des éléments solubles, ce qui a une incidence directe sur les rendements fromagers. On peut provoquer la coagulation par acidification, par l'action d'une enzyme ou encore par l'action combinée des deux (**Vignola, 2002; Fox et al., 2004; Belitz et al., 2009**).

D'après **St Gelais et Tirard, (2002)** la coagulation du lait peut se caractériser par trois paramètres

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

2. Type de coagulation

En technologie fromagère on distingue trois types de coagulation

- ✓ Coagulation par voie acide
- ✓ Coagulation par voie enzymatique
- ✓ Coagulation mixte

2.1. Coagulation par voie acide

Pendant la coagulation acide, le pH du lait diminue et les propriétés physicochimiques des micelles de caséine sont profondément modifiées.

L'abaissement du pH par acidification réduit en effet jusqu'à la neutralisation de la charge négative des micelles de caséine, due à la fixation des protons H^+ libres par certains acides aminés (acide glutamique, acide aspartique et la phospho-sérine). Au pH 5,2 (à 20°C), elles deviennent suffisamment instables pour former un début d'agglomération, alors qu'au pH 4,6 (point

isoélectrique de la caséine) la charge électrique est complètement neutre, entraînant ainsi la coagulation complète.

De plus, l'acidité du milieu a pour effet d'augmenter la solubilité des minéraux, de sorte que le calcium et le phosphore organiques de la micelle passent graduellement en solution dans la phase aqueuse. Il s'ensuit donc un caillé partiellement déminéralisé qui laisse facilement traverser le lactosérum (phénomène de synérèse).

Le caractère acide du caillé va autoriser un allongement significatif de la durée de conservation au froid des produits. (Fox et al., 2004; Tamime, 2006; Belitz et al., 2009).

Selon Brule et al., (1997) la coagulation par voies acide dépend de plusieurs facteurs

- ✓ La concentration en protéines ;
- ✓ Les conditions d'acidification (pH, vitesse d'acidification, température) ;

2.2. Coagulation par voie enzymatique

Un grand nombre d'enzyme protéolytique d'origines animale, végétale ou microbienne, ont les propriétés de coaguler le complexe caséine. La présure (mélange de chymosine et pepsine), sécrétée dans la caillette des jeunes ruminants nourris au lait, est l'enzyme coagulante la mieux connue et son mécanisme d'action est bien établi. (Corredig et Salvatore, 2016).

La présure est une enzyme protéolytique utilisée pour la fabrication de fromages affinés (type cheddar, etc.) et de la caséine. Son substrat spécifique est la caséine κ qu'elle hydrolyse à une température de l'ordre de 35°C.

La protéolyse conduit à une déstabilisation de caséines micellaire et libéré deux molécules, la para caséines κ et un macro peptide ou caséinoglyco peptide soluble, renfermant 20 à 30 % de glucides et une séquence de 64 acides aminés.

Cette action spécifique accentuée par la présence de Ca et P est dite réaction primaire de la présure. (Vierling, 2003).

2.2.1 Mécanisme de coagulation enzymatique

La coagulation du lait par la présure se déroule en trois étapes désignées communément par

- ✓ L'hydrolyse enzymatique de la caséine κ . (phase primaire)
- ✓ L'agrégation des micelles déstabilisées. (phase secondaire)
- ✓ La réticulation et la formation du gel. (phase tertiaire) (Figure 5) (Mahaut et al., 2003 ; Ronez, 2012).

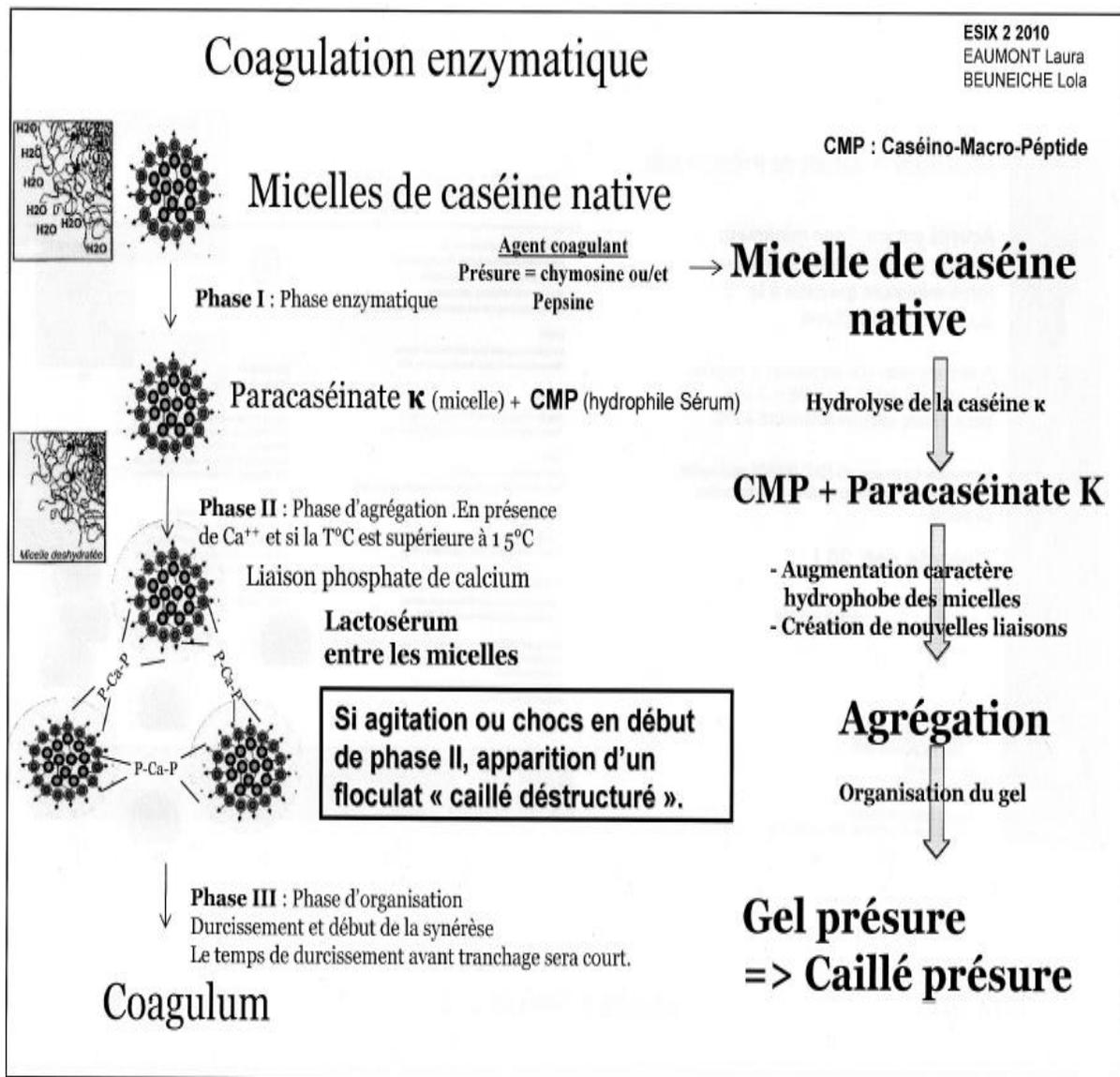


Figure 5 : Les gels laitiers et le phénomène de coagulation par la présure (Ronez, 2012).

✓ **Phase primaire ou d'hydrolyse enzymatique :**

La phase primaire ou enzymatique déclenche la coagulation par hydrolyse spécifique de caséine κ au niveau de la phénylalanine (105) et méthionine (106). Selon Corredig et Salvatore, (2016), il résulte de cette coupure deux segments inégaux possédant des caractéristiques différentes.

- ✓ **Le para caséine :** segment de 1 à 105, basique, hydrophobe et liée aux caséines α_s et β siège de la coagulation proprement dite (formation du coagulum).

- ✓ **La caséine macro peptidique** (appelée aussi glycopeptide) segment de 106 à 169, acide hydrophile et libre qui passe dans le lactosérum.

- ✓ **Phase secondaire ou phase d'agrégation :**

La réaction secondaire de la coagulation est purement chimique et nécessite la présence d'ions calcium et phosphate qui interviennent dans la formation du gel par polymérisation de para caséines. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer le mécanisme de la formation du gel, suite à un phénomène de polymérisation par condensation de deux molécules de para caséines κ . Les ions calcium initient la polymérisation en formant des ponts salins, alors que les ions phosphates conduisent à la fermeture du cycle de la polymérisation, avec l'apparition d'une valence libre. Celle-ci est capable de s'accrocher à nouveau à un autre cycle similaire et permettre ainsi la condensation avec d'autres molécules, le mécanisme conduit à la formation d'un réseau protéique plus au moins lâche qui confère au coagulum son caractère gel (**Green et al., 1987**).

Selon **Mahaut et al., (2003)** la réaction secondaire ne commence que lorsque le taux d'hydrolyse de la caséine κ atteint 80 à 90%.

- ✓ **Phase tertiaire ou de formation du gel :**

Les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations : des liaisons de nature variée s'établissent entre les micelles (électrostatiques, hydrophobes et salines) pour former un gel constitué par un réseau lâche emprisonnant le lactosérum et la matière grasse. (**Scriban, 1999 ; Ronez, 2012**).

2.3. Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. Cette méthode est utilisée pour l'obtention de fromages frais (petits-suisses, demi-sels) et de fromages à pâte molle (camembert). (**Mahaut et al., 2003**).

Dans les deux cas, après formation de coagulum, s'exsude et se détache du lactosérum. C'est la synérèse du caillé ou égouttage. Ce phénomène de synérèse est rapide pour le coagulum par emprésurage et lent pour le coagulum acide (**Lenoir, 1985**).

La floculation par voie enzymatique est plus courte que par voie acide (**tableau 14**) (**Vignola, 2002**)

Tableau 14 : Comparaison entre un caillé lactique (coagulation par voie acide) et un caillé présure (coagulation par voie enzymatique) (Vignola., 2002).

Paramètre	Type de caillé	
	Lactique	présure
Temps de floculation	long (de 6 à 15 heures)	court de 10 à 30 min
pH	faible <4,60	élevée (6.5 à 6.7)
Minéralisation	faible (0,1g Ca/100g)	élevée (1 à 1.2 g)
Structure micellaire	détruite	état micellaire
Teneur en eau	élevée	faible
Pouvoir tampon	faible	élevée
Teneur résiduel en lactose	élevée	faible
Type de mixture	plastique, fragile	élastique solide
Durée de conservation	Faible (quelques semaines)	élevée (quelques mois)

3. Facteurs influençant à l'activité coagulante

3.1. Concentration en enzyme

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme, ce qui peut se formaliser selon l'équation suivante (Mahaut et al ., 2003)

$$t_c = (K/E) + t_a$$

Avec

t_c : temps de coagulation (s).

K : inverse de la constante de vitesse.

E : concentration en enzyme.

t_a : temps écoulé entre la fin de la réaction enzymatique et le point de coagulation (s).

3.2. Température

Le phénomène de coagulation est fortement dépendant de la température (**tableau 15**)

- ✓ Au-dessous de 10°C, la coagulation du lait ne se produit pas.
- ✓ Dans l'intervalle 10 à 20° C, la vitesse de coagulation est lente.
- ✓ Au-dessus de 20°C, elle augmente progressivement jusqu'à 40 à 42°C, au-delà elle diminue.
- ✓ Au-dessus de 65°C, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme est inactivée.

La température influe considérablement sur l'étape de l'interaction micellaire relativement à son action sur l'étape de l'hydrolyse enzymatique (St Gelais et Tirard, 2002).

Tableau 15 : Impact de la température sur la coagulation du lait par la présure (St Gelais et Tirard, 2002).

Température	Impact
<10°C	Il n'y a pas de coagulation (l'enzyme à une vitesse lente)
10-20°C	La coagulation est lente
30-42°C	Il y a une augmentation progressive de la vitesse de coagulation.
42-55°C	La vitesse de coagulation diminue.
55°C et +	Il y a absence de coagulation.

3.3. pH

L'abaissement du pH du lait entraîne un temps de coagulation plus court. Cela résulte d'une part d'un effet sur l'activité de l'enzyme, dont le pH optimal d'action sur la caséine k est de 5,5, d'autre part de la diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges et de la libération d'ions calcium à partir des complexes dissous et colloïdaux (Mahaut et al., 2003).

3.4. Teneur en CaCl₂

L'addition de CaCl₂ entraîne une augmentation du calcium ionisé et du calcium colloïdal ayant pour conséquence une augmentation de la taille des micelles (plus la dimension de la micelle est grande, plus le temps de coagulation est court. (Mahaut et al., 2003).

IV. Les succédanés de présure

1. Présure

1.1. Définition

La présure de veau est composée de 80 % de chymosine et 20% de pepsine, c'est la plus ancienne enzyme de coagulation du lait. Elle est toujours la plus largement utilisée dans les procédures de fabrication de fromage. Les propriétés coagulantes de la présure de veau sont principalement dues à la chymosine, une protéase aspartique considérée comme le meilleur agent de coagulation en raison de sa haute spécificité pour le clivage de la κ -caséine de la liaison peptidique Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ (Kumar et al., 2006 ; Kurutahalli et al. 2010 ; Esposito et al., 2016).

1.2. Origine et dénomination

La présure de veau est la préparation coagulante traditionnelle la plus utilisée pour la coagulation du lait (Alais, 1984 ; Wigley, 1996). De faibles quantités sont obtenues à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau.

La dénomination présure est réservée à l'extrait coagulant provenant de la quatrième poche de l'estomac de veau de lait appelée *abomasum* ou caillette. Elle renferme deux enzymes actives. La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale le complément est apporté par la pepsine. On observe les plus fortes teneurs en chymosine chez les animaux non sevrés ; dès que la ration alimentaire renferme des aliments solides et que le jeune animal commence à brouter, la proportion de chymosine chute très fortement ; à l'inverse, la pepsine devient dominante et caractérise la sécrétion stomacale du mammifère adulte (Garg et Johri, 1993).

1.3. Composition

1.3.1. Chymosine

La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale (Ramet, 1997). Elle est synthétisée sous forme de prochymosine, activée sous l'action du suc gastrique acide. Elle subit alors une conversion en chymosine active.

La chymosine C'est une holoprotéine de 35,6 kDa, appartenant au groupe des protéases acides (pH optimal entre 4 et 5), stable à pH 5,3 – 6,3, inactivée à 7,5, dénaturée à 8. Sa température optimale d'action est voisine de 40°C. l'inactivation thermique a lieu à 50° C, elle est totale à 61° C (Lenoir et al., 1985 ; Scriban, 1999).

La chymosine bovine est une protéine globulaire constituée de 323 résidus et présentant une homologie de séquence de 55% avec pepsine. La chymosine de veau naturelle se trouve sous trois isoformes: A, B et C. La différence entre A et les formes B sont liées à un acide aminé différent résidu en position 243 de la chaîne moléculaire, qui est un Asp sous la forme A et un Gly dans le B forme (**Chitpinyol et Crabbe, 1998**). La Chymosine C apparait comme étant un produit de dégradation de la Chymosine A (**Danley et Geoghegan, 1988**).

1.3.2. Pepsine

La pepsine est le constituant mineur de la présure dont la sécrétion gastrique ne devient prépondérante qu'après sevrage (**Ramet, 1997**). Elle est produite sous forme d'un précurseur inactif, le pepsinogène. La forme pepsine active est obtenu par acidification, la pepsine à un poids moléculaire de 35 kDa (**Alais, 1984**).

La pepsine est une protéase acide qui se trouve dans l'estomac de la quasi-totalité des vertébrés ; elle présente une activité optimale entre pH 1 et 2, tandis que le pH optimal de l'estomac est de 2 à 4. La pepsine est inactivée au-delà de pH 6,0. L'enzyme catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques entre deux acides aminés hydrophobes. (**Rao et al., 1998**)

A l'opposé de la chymosine, la pepsine possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante. Bien que la pepsine puisse coaguler le lait, elle a tendance à être associée à des pertes de matière grasse plus importantes au cours de la fabrication du fromage. (**Garg and Johri, 1993**)

La pepsine est relativement stable à des pH compris entre 5 et 5,5. Son activité enzymatique est plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat. C'est une enzyme thermosensible en solution au-delà d'une température de 55°C. Elle est dénaturée par des températures de 70°C (**Graiday, 1978**).

Les pepsinogènes sont synthétisés dans la muqueuse gastrique et convertis par autocatalysation en leur forme active correspondante dans l'environnement acide du suc gastrique, en libérant les segments d'activation du NH₂-terminal. Jusqu'à présent, cinq groupes de pepsinogènes ont été classés, à savoir les pepsinogènes A, B et F, la progastricine (ou propepsine C) et la prochymosine, principalement présentes dans le suc gastrique des mammifères fœtaux et nouveau-nés (**Kageyama, 2002**). Les pepsines ont en commun, la propriété de cliver les substrats protéiques, tels que l'hémoglobine dénaturée, l'albumine sérique et les oligopeptides appropriés, dans des conditions de pH acide (**Wu et al., 2009**).

2. Propriété spécifique exigées du succédané de présure

Les enzymes de remplacement de la présure doivent répondre aux critères suivants (**Ramet, 1997**)

- Une bonne solubilité dans l'eau.
- Une odeur et une couleur faibles ou nulles.
- Une activité coagulante bonne et une durée de consommation raisonnable.
- Une absence de toxicité pour le consommateur et un degré de pureté élevé pour éviter tout accident de prolifération de microorganismes indésirables.
- La synérèse du coagulum au cours de l'égouttage et les modalités de l'affinage devrait permettre d'obtenir les caractéristiques usuelles des fromages dans un délai sensiblement égal à celui de la présure.
- Les rendements fromagers doivent être très proches ou supérieurs à ceux révélés lors de l'emploi de la présure.

3. Enzymes coagulants le lait d'origine végétale

Contrairement à la présure qui est spécifique à la κ -caséine, les *aspartyl-protéases* des plantes peuvent hydrolyser les caséines α , β et κ , ce qui provoque une acidité excessive, (**Simões et Faro, 2004**). Plusieurs préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures (**Ramet, 1997**).

La plupart des protéases végétales isolées et caractérisées ont été classés comme protéases à cystéine, qui sont largement utilisées dans plusieurs procédés de l'industrie alimentaire.

L'inconvénient majeur de l'utilisation des protéases à cystéine est lié à leur activité facilement réduite par l'oxydation de l'air et les ions métalliques. Par conséquent, l'application de ces enzymes nécessite des réducteurs et agents chélatants et, par conséquent, ne sont ni économiques ni pratiques (**Tomar et al., 2008**). En revanche, les protéases sérine

sont à la fois stables et actives dans des conditions défavorables de températures et pH élevés, ainsi qu'en présence de l'un ou l'autre des tensioactifs ou agents oxydants. Ainsi, les sérines protéases sont plus utiles et économiques pour applications industrielles (**Tripathi et al., 2011**)

Plusieurs enzymes coagulantes ont été identifiées dans différentes espèces végétales; Cependant, de nombreuses préparations enzymatiques sont jugées inappropriées car elles produisent des fromages extrêmement amers (**Egito et al., 2007 ; Beigomi et al., 2014**). Les activités protéolytiques excessives de la plupart des coagulants végétaux ont limité leur utilisation dans la fabrication de

fromage en raison des faibles rendements en fromage, de la saveur amère et des défauts de texture. La recherche de nouvelles enzymes potentielles de coagulation chez les plantes se poursuit encore afin de répondre à la demande mondiale croissante pour une production de fromages diversifiés et de bonne qualité (Shah et al., 2014).

Les protéases végétales les plus couramment utilisées sont les cystéine endopeptidases papaine, bromélaïne et la ficine. En outre, les protéases aspartique jouent un rôle important dans l'industrie alimentaire, par exemple, l'industrie du fromage. Les cardosines sont les protéases aspartique obtenues à partir des fleurs de *Cynara cardunculus* L. (Verissimo et al. 1996 ; Oliveira et al. 2010), dont l'activité de coagulation du lait, a été exploitée en Espagne et au Portugal depuis de nombreuses années. Les propriétés moléculaires et enzymatiques de cardosine A, la plus abondantes, ont été étudiées en détail (Frazao et al. 1999 et Sarmento et al. 2006)

4. Enzyme coagulant le lait d'origine animale

Des succédanés de présure sont produits par plusieurs mammifères comme le chameau (Siboukeur, 2005), le buffle (Mohanty et al., 2003), de chèvre (kumar et al., 2006) et même par les viscères de poissons (El-Beltagy et al., 2004 ; Zhou et al., 2007 et Wu et al., 2009).

L'étude comparative des activités coagulantes et protéolytiques de ces enzymes a révélé qu'elles présentent des caractéristiques proches de celles de la présure (Polaina et Macabe, 2007).

De nombreuses protéases d'origine animale ont fait l'objet d'études en vue d'une utilisation potentielle en fromagerie. Selon Findlay et al. (1984), La pepsine extraite du proventricule de poulet permettrait la fabrication de Cheddar si la maturation n'excède pas trois mois.

Les pepsines ont une activité protéolytique assez voisine de celle de la chymosine ; leurs sensibilités aux variations des facteurs de milieu sont semblables sauf pour l'effet pH ; elles ont un caractère plus acide avec un optimum au voisinage de pH 1,5-2,0 (Ramet, 1997).

Certains succédanés d'origine animale peuvent être considérés comme des produits de remplacement acceptables de la présure de veau.

Les pepsines aviaires du poulet (Bohak, 1969), de la caille (Esumi et al., 1980), du canard (Pichová et Kostka, 1990) et de la dinde (Temiz et al., 2007 ; Temiz et al., 2008) sont considérées comme des sources adéquates de la pepsine

4.1. Pepsine aviaire

4.1.1. Tractus digestif de la dinde

Quel que soit l'espèce aviaire, l'appareil digestif, (**Figure 6**) se distingue globalement par : Un bec remplaçant les lèvres des mammifères ; deux estomacs mécanique et chimique et une partie terminale ou cloaque dans lequel aboutit à la fois le rectum, les voies urinaires et génitales.

Les deux estomacs sont spécifiés par : le ventricule succenturié, ou proventricule considéré comme l'estomac sécrétoire chimique.

L'estomac : il se divise généralement en deux parties, une glandulaire et une musculaire. Une fois sortie du jabot, la nourriture se dirige vers le proventricule qui correspond à la partie glandulaire, où des glandes spécialisées sécrètent le suc gastrique, nécessaire à une digestion chimique des éléments composant le bol alimentaire. Puis, elle est emmenée vers la partie musculaire de l'estomac : le gésier (ou ventricule). Il s'agit d'un organe à parois épaisses et musculaires qui ne possèdent pas de glandes. Grâce à ses mouvements et aux gastrolithes présentes dans le gésier, la nourriture sera broyée (**Alamargot, 1982**).

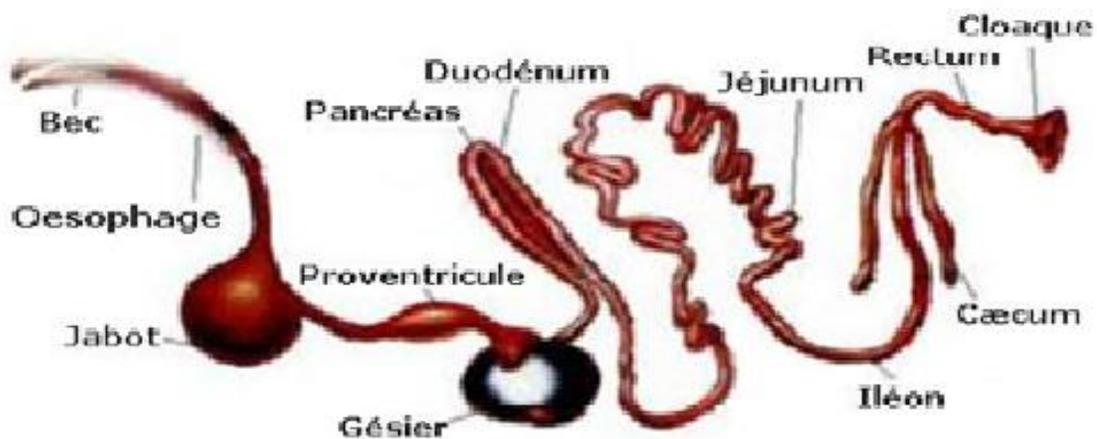


Figure 6 : Appareil digestif de la dinde (**Alamargot, 1982**)

4.1.2. Composition de la pepsine de dinde

La séquence prédictive de l'enzyme pepsine-like de *Meleagris gallopavo* **XP_010709067** a été comparée au programme BLAST disponible au site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> à celle du précurseur de l'enzyme pepsine-like du poulet (*Gallus gallus*) **NP_990209** (**Sakamoto et al., 1998**). L'alignement montre une identité d'acides aminés de 95%, suggérant que les enzymes pepsine-like de la dinde et du poulet sont très proches, anticipant une relation séquence / structure élevée entre ces enzymes

5. Enzymes coagulants le lait d'origine microbienne

Les micro-organismes élaborent un large éventail de protéases, qui sont intra ou extracellulaires. Parmi les protéases, les protéases aspartate trouvent leur application dans l'industrie fromagère.

Différentes alternatives microbiennes sont utilisées pour la production de chymosine, mais ces techniques ne conviennent pas à la production de fromage de qualité. Elles sont responsables du goût amer (**Kumar et al., 2006 ; Walsh et Li, 2000**). Une autre caractéristique frappante qui empêche l'utilisation de la présure microbienne est leur grande stabilité thermique. L'activité protéolytique élevée provoque une protéolyse indésirable, entraînant une perte de saveur et un goût amer (**Garnot, 1985**).

Les protéases (EC 3.4.23.6) commercialisées, sont extraites de trois microorganismes: *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* et *Cryphonectria parasitica* (**Corredig et Salvatore, 2016**)

Les présures microbiennes de différentes sources diffèrent par leur poids moléculaire, leurs points isoélectriques, leur activité spécifique, leur composition en acides aminés et leur nature en glycoprotéines (**Kurutahalli et al., 2010**).

5.1. Enzymes d'Origine bactérienne

De nombreuses espèces de bactéries ont été étudiées, notamment celles appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* tels que *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans*. Les résultats ont été en général décevants en raison de l'activité protéolytique généralement très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure. La protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière. En effet, un fromage type

cheddar préparé avec une protéase de *Bacillus subtilis* présentait, d'une part une saveur acceptable, cependant, le rendement est très faible suite à une protéolyse excessive (**Ramet, 1997**).

Les enzymes provenant de souches bactériennes ont également été signalées, principalement à partir de *Bacillus sp.* *Myxococcus sp.* (**Poza et al.2003**) et *Nocardioopsis sp.* (**Cavalcanti et al. 2005**). Par ailleurs, le cas de *Bacillus licheniformis* USC13 est intéressant à signaler. En effet il a été utilisé pour la production d'enzyme coagulant le lait, cependant, des études ont révélé que l'enzyme était une protéinase de type sérine. (**Yegin and Dekker, 2013**)

Mateos et al. (2015), ont signalé la production de protéases extracellulaires, qui résistent au traitement à haute température (UHT), sont responsables de la détérioration du lait, entraînant une saveur amère et une gélification du lait UHT pendant le stockage.

5.2. Enzymes d'Origine fongique

Contrairement aux protéases bactériennes, les protéases fongiques ont donné de meilleurs résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure (**Luquet, 1987**).

Parmi les substituants de la chymosine, les enzymes de *Mucor pusillus* et de *M. miehei* ont connu le plus large développement. De par ses propriétés, la protéase de *M. miehei* se rapproche le plus de la présure animale, notamment pour ce qui concerne le ratio activité coagulante/ activité protéolytique (**Joyeaux, 1982 ; Garg et Johri, 1993 ;Tiezhu, 2011**).

Par ailleurs, les enzymes fongiques se caractérisent par une stabilité thermique analogue à celle de la présure (**Goursaud, 1993**).

Kurutahalli et al. (2010) ont également signalé la production d'une enzyme coagulant le lait par *Aspergillus oryzae* MTCC 5341, présente une faible activité protéolytique et une faible stabilité thermique,.

6. Chymosine recombinante

Le génie génétique est utilisé pour produire des microorganismes génétiquement modifiés capables de synthétiser la chymosine recombinante, chimiquement et fonctionnellement identique à l'enzyme native produite par les ruminants (**Espinoza-Molina et al., 2016**). La chymosine de veau (variante génétique B) est largement produite par la technologie de l'ADN recombinant par des micro-organismes tels qu'*Aspergillus niger* et *Kluyveromyces lactis*. D'autres chymosines recombinantes sont obtenues à partir de chèvre et de buffle (**Corredig et Salvatore, 2016**).

O’Sullivan et Fox (1991) ont comparé les fromages produits par la chymosine de veau et sa forme recombinante exprimée en *K. lactis*. Il a été prouvé que les deux enzymes se comportaient de manière similaire sous toutes les conditions environnementales étudiées et il n'y avait pas de différence entre les fromages produits.

Cette méthode constitue l’une des voies porteuses d’espoir pour la synthèse d’enzymes utilisables dans l’industrie laitière.

La chymosine B est produite à partir de champignon *A. niger* (Chymax de Chr. Hansen) et la levure laitière *K. lactis* (Maxiren de DSM Food Specialties) et les deux produits sont disponibles dans le commerce en différentes qualités de pureté pour les fromagers. Différentes études comparatives ont été réalisées pour déterminer les différences entre la chymosine recombinante et la chymosine standard de veau (**Yegin and Dekker, 2013**)

V. Fromage frais

1. Généralités

La qualité et les propriétés du lait de mélange issu de la ferme, ont un effet direct sur les propriétés fonctionnelles du fromage. Des facteurs tels que: la race des bovins, le stade de la lactation, la saison de traite et l'alimentation affectent la composition du lait, et donc les propriétés du fromage (**Lucey et al., 1992**). La standardisation du lait est réalisée pour minimiser certaines variations en composition avec un rapport caséine-matière grasse cible. (**Scott et al., 1998**).

Les fromages fabriqués en Algérie restent peu nombreux. Il s'agit essentiellement du camembert et autres pâtes pressées, des fromages frais et des fromages fondu (**Khoualdi, 2017**).

Les fromages frais sont traditionnellement des fromages qui résultent d'une coagulation lente du lait par action de l'acidification combinée ou non de celle d'une faible quantité de présure, ils sont fabriqués à partir de laits ou de crème propres à la consommation humaine. Les fromages frais présentent une grande diversité selon le degré d'égouttage du coagulum et la teneur en matière grasse du lait mis en œuvre. Les différents fromages à pâte fraîche sont caractérisés par (**Mahaut et al., 2000**)

2. Différents types de fromage frais

Il existe deux types de fromage frais (**Veisseyre, 1979**) :

- ✓ A coagulation Lente :
 - Fontaine bleu
 - Neufchâtel frais
 - Suisse
- ✓ A coagulation Rapide :
 - Fromage à la pie

3. Petit suisse

La définition précise du petit suisse, se traduit par les caractéristiques suivantes :

- Forme cylindrique
- Poids de 60g environ,
- Teneur en matière grasse de 4 %
- Teneur en extrait sec totale 30 % de fromage. (**Veisseyre, 1979**).

4. Fabrication du fromage

4.1. Préparation du lait

La qualité du lait de fromagerie peut être définie comme son aptitude à donner un bon fromage dans les conditions de travail normales avec un rendement satisfaisant. Elle dépend d'un certain nombre de caractéristiques du produit : sa composition chimique notamment sa richesse en caséines, sa charge microbienne, la nature de sa microflore et son aptitude au développement des bactéries lactiques. Elle dépend aussi de son comportement vis-à-vis de la présure (**Thapon, 2005**).

4.2. Standardisation

La standardisation consiste à ajuster la composition du lait de mélange afin d'obtenir une teneur minimale en extrait sec (ES) et en matières grasses (MG) dans le fromage élaboré. Elle est réalisée par le mélange du lait entier à du lait écrémé ou de la crème à du lait écrémé dans des proportions calculées.

4.3. Homogénéisation

L'homogénéisation mécanique est un traitement industriel employé principalement pour stabiliser l'émulsion de la matière grasse du lait afin d'éviter la séparation de la crème par gravité. Elle a pour but principal de diminuer le diamètre des gouttelettes de la phase dispersée en fractionnant les globules gras en de plus petits globules.

Parce qu'elle présente l'avantage de stabiliser l'émulsion de la matière grasse uniformément dispersée dans tout le liquide, l'homogénéisation possède d'autres effets sur le lait, tel que le blanchiment de sa couleur, l'augmentation de sa tendance à mousser, la réduction de la prédisposition à l'auto oxydation et ainsi à la formation de saveurs non désirées. Enfin, les globules gras perdent leur capacité de s'agglutiner au cours du refroidissement, à la suite de l'inactivation des agglutinines. Ce traitement donne au lait une saveur et une texture plus douces, plus onctueuses pour la même teneur en matière grasse (**Eck et Gillis 1997**).

4.4. Traitement thermique

La pasteurisation est un chauffage suffisant pour détruire tous les germes pathogènes. La température de la pasteurisation la plus fréquente est comprise entre 65 à 75°C et parfois 80°C pendant 15 à 20 secondes. Ensuite, le lait pasteurisé est conduit vers des tanks de stockage où la température est de 10 à 12°C (**Veisseyre, 1975**).

4.5. Prématuration

La prématuration a pour objectif d'enrichir le lait en phosphate mono calcique, chlorures de calcium et d'autres ingrédients, afin de renforcer la coagulation et la cohésion du caillé et de rétablir l'équilibre chimique des composants du lait (**Lenoir et al., 1983**).

4.6. Maturation

L'addition des levains lactiques en maturation chaude (30 – 35°C) pendant 1 à 2 heures a pour rôle d'acidifier le lait au pH d'emprésurage désiré et de diriger l'acidification pendant la phase d'égouttage. La microflore lactique doit être présente dans le lait avant l'emprésurage (**Lenoir et al., 1983**).

4.7. Emprésurage

Il correspond au moment où l'on ajoute la présure en vue de provoquer la coagulation : Cette dernière se traduit par une floculation des micelles de caséines qui s'unissent pour former un gel accompagné d'une phase liquide appelée lactosérum. Après maturation, le lait est additionné de 19 à 23 ml de présure pour 100 litres de lait. Le caillage est obtenu au bout de 10 à 15 min (**Pointurier et al., 1985**).

4.8. Coagulation

La coagulation du lait, se traduit par la formation d'un gel, résulte des modifications physico-chimiques intervenant au niveau des micelles de caséine. Les mécanismes proposés dans la formation du coagulum diffèrent totalement suivant que ces modifications sont induites par acidification et /ou action d'enzymes coagulantes (**Ramet, 2006**).

4.9. Egouttage

L'égouttage résulte d'un processus actif, la synérèse, qui est un phénomène physique de séparation de la phase dispersante, fréquent dans les systèmes biologiques contenant des polymères organisés en réseau et l'aptitude d'écoulement du gel. Macroscopiquement, l'égouttage se traduit par une élimination progressive du lactosérum qui s'accompagne d'une rétraction et d'un durcissement corrélatif du gel : il conduit à la formation d'une masse de caillé dont l'extrait sec est plus ou moins concentré et qui correspond au fromage (**Mahaut et al., 2000**).

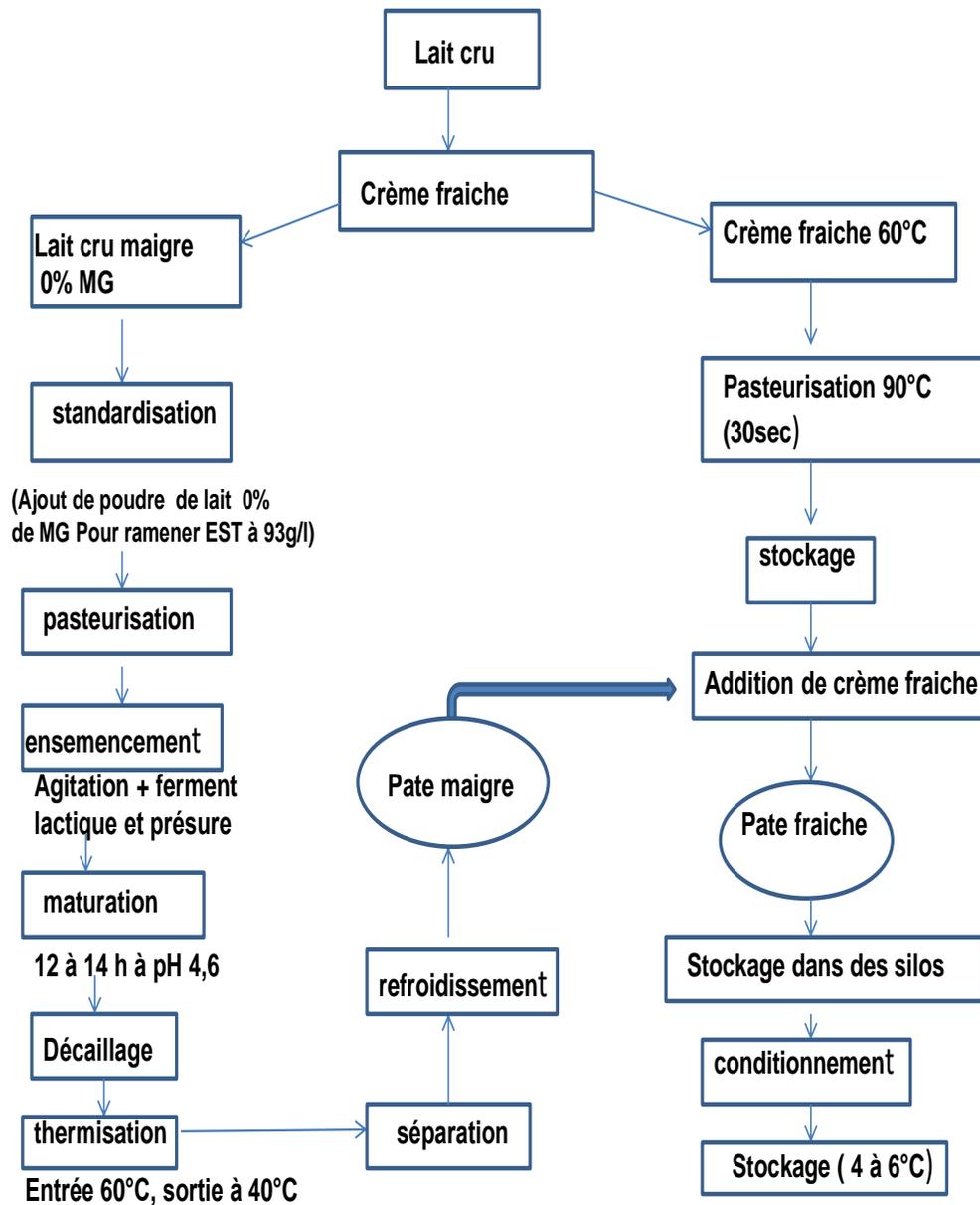


Figure 7 : Diagramme de fabrication du fromage petit suisse par la laiterie ARIB (GIPLAIT)

5. Qualité sensorielles des fromages

Plusieurs hypothèses sur les relations entre l'alimentation en herbe et le fromage sont évoquées. Tout d'abord, il y a l'hypothèse d'un transfert de composés de l'herbe vers le fromage contribuant directement ou indirectement à l'arôme des fromages. Une autre hypothèse est celle d'une influence indirecte du pâturage, entraînant, via l'animal, des modifications des constituants physico chimiques et microbiologiques du lait et du fromage. (Voisin, 2010).

L'évaluation de la texture d'un aliment donné est basée, d'une part, sur le choix des caractéristiques sensorielles à percevoir, et d'autre part sur la formation et l'entraînement du panel de dégustation (**Figure 8**)

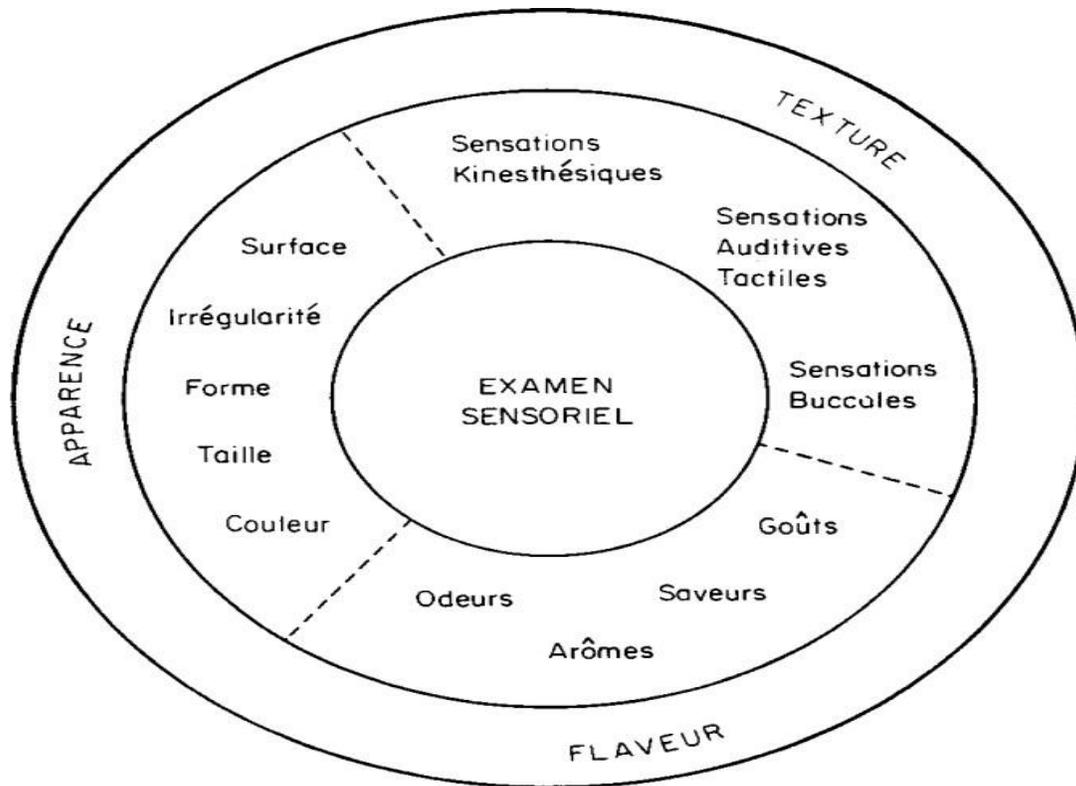


Figure 8 : Les caractéristiques sensorielles de l'appréciation des fromages (**Lavanchy et al., 1993**).

Pour les fromages, la texture contribue le plus souvent à l'expression de l'arôme : à l'extrême elle emprisonne l'arôme qui ne sera libéré que par saccades au gré de la mastication. Par ailleurs, la texture peut atténuer, « amortir » un défaut d'arôme en l'empêchant de s'exprimer pleinement. Ainsi dans l'appréciation des fromages, la texture occupe une place non négligeable (**Lavanchy et al., 1993**).

Ainsi, un écrémage partiel visant à standardiser le rapport matières grasses/protéines du lait fait pratiquement disparaître l'effet de la race sur la texture du fromage, puisque cet effet est justement largement lié aux différences de ce rapport d'une race à l'autre. De même, le traitement thermique du lait semble masquer les effets de l'alimentation sur la flaveur du fromage. Il est donc vraisemblable que certaines pratiques de fabrication fromagère soient plus aptes à permettre l'expression de l'effet des facteurs de production que d'autres. (**Coulonet et al 2005**)

MATERIEL
ET METHODES

I. Présentation de la ferme d'étude

Cette étude a été menée dans des conditions d'élevage intensif, au niveau d'une exploitation d'élevage collective (EAC Garamida), située à Ain-sultan, Khemis-Miliana dans la wilaya d'Ain-defla.

Sa superficie totale (SAT) est de 32 hectares, répartie comme suit :

- Orge : 08 hectares
- Foin : 16 hectares
- Blé tendre: 08 hectares

Elle dispose actuellement d'un effectif global de 45 vaches laitières en lactation, 12 génisses, 14 vaches, 20 veaux de race Montbéliarde et Holstein. Il existe deux modes de reproduction pour maintenir l'effectif : l'insémination artificielle et l'accouplement.

Le choix de l'exploitation est basé sur les critères suivants :

- ✓ Disponibilité d'un nombre suffisant de vaches laitières en phase de lactation et pouvant assurer une production laitière jusqu'à la fin de la période expérimentale ;
- ✓ Facilité d'accès à la ferme ;
- ✓ Coopération de l'éleveur ;
- ✓ Bon état de santé des vaches ;
- ✓ Disponibilité de l'information.

1. Caractéristiques de la nourriture et des animaux

Quarante-cinq vaches laitières, dont vingt-cinq de race Montbéliarde et vingt vaches de race Holstein, ont été étudiées pour une période expérimentale de 5 mois (janvier-mai).

Le régime alimentaire est basé sur le foin et fourrage vert. Ce régime est complété avec 10 kg / jour / vache d'aliments concentrés (V-LB 17) à base de maïs et de soja, repas distribué deux fois par jour (5 kg le matin et 5 kg le soir) au moment de la traite pendant toute la période expérimentale.

II. Matériel biologique

1. Lait

Le lait est récolté chez le producteur, y reste seulement quelques heures (de 12 à 48 heures, voire 72 heures selon la région et les périodes de l'année), avant d'être collecté et ensuite traité dans un établissement de transformation (lait, fromage ...).

2. Proventricules de dinde

les proventricules bruts ont été extraits du système digestif de la dinde (*Meleagris gallopavo*) au niveau de l'abattoir de Khemis-Miliana (W.Ain-Defla) (**Figure 9**). L'étude a portée sur 500 g d'échantillon frais débarrassé de ses graisses, lavé plusieurs fois dans de l'eau distillée, coupé et conditionné dans des sacs en plastique scellés et, enfin, conservé à -18°C jusqu'à son utilisation.



Figure 9: photographie du proventricule de dinde

3. Substrat de Berridge

Le lait est obtenu, par reconstitution à 12 % (m/v) dans une solution de CaCl_2 (0.01M) d'une poudre de lait écrémé (low heat type loya), préparant ainsi le substrat de Berridge. Après reconstitution, le lait est conservé à 4°C pendant une nuit, pour assurer l'équilibre physico-chimique d'une part, la stabilité et la réhydratation des micelles d'autre part (**annexe 1**).

4. Présure commerciale

Nom: CHY-MAX poudre NB

Fabricant : CHR HANSEN (Danemark)

Dosage: IMCU/L de lait, avec une force 1/10000^{ème} (1g de poudre pour 10g d'eau à agiter le tout pour 100litres de lait).

III. Méthodes d'analyses

1. Analyses physico-chimiques du lait

Pour déterminer les caractéristiques du lait et l'extrait brut de pepsine de dinde après extraction, différentes analyses physico-chimiques ont été effectuées.

1.1. Détermination de la matière grasse totale

Elle est déterminée par La méthode de **GERBER** (acido-butyrométrie), norme NF 04-210 (**AFNOR, 1986**). Après dissolution des protéines par addition d'acide sulfurique, la séparation de la matière grasse du lait par centrifugation dans un butyromètre est favorisée par l'addition d'une quantité d'alcool iso amylique.

1.2 Analyse chromatographique phase gazeuse

L'analyse chimique de référence pour déterminer la composition en acides gras repose sur l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse. Cette technique d'analyse nous permet d'individualiser et de doser les acides gras après estérification complète de l'extrait lipidique qui permet la transformation des composés en produits plus volatils.

Conditions Chromatographiques pour esters méthyliques (**Annexe 2**).

1.3. Dosage du lactose (Méthode de Bertrand)

Après défécation au ferrocyanure de zinc, le lactose est dosé dans le filtrat, grâce à son pouvoir réducteur par la méthode de Bertrand.

On exprime généralement le résultat en lactose hydraté celui-ci ne sera valable que si le lactose n'a subi aucun début d'hydrolyse. (**Annexe. 3**)

1.4. Détermination de l'azote total du lait

La détermination de l'azote total du lait ainsi que l'azote soluble à pH 4,6 (NST ou azote non caséique) et l'azote soluble dans le TCA à 12% (NNP ou azote non protéique), est réalisée en appliquant la méthode Kjeldhal selon la norme : NF V04-211 (AFNOR, 1986) (Annexe n°6).Après le dosage des différentes fractions du lait on pourra déterminer les composants suivants :

- Taux de matières azotées totales (MAT) = NT x 6,38 ;
- Taux protéique (TP) = (NT – NNP) x 6,38 ;
- Taux de caséines (C) = (NT – NST) x 6,38 ;
- Taux de protéines solubles (PS) = (NST – NNP) x 6,38 ;
- Taux d'azote non protéique (NNP) = NNP x 6,38. (**annexe 4**)

1.5. Acidité titrable

Le principe consiste à titrer l'acidité lactique du lait reconstitué substrat de Berridge) par l'hydroxyde de sodium (0,1N) en présence de phénolphthaléine (1g dans 100 mL d'éthanol 96%) comme indicateur de couleur de neutralisation selon la norme française V 04-206 (AFNOR, 1986). Le résultat est exprimé en en grammes d'acide lactique par unité de volume.

2. Extraction enzymatique

L'extraction a été réalisée selon la méthode de **Tsouli (1974)** avec quelques modifications. Le tissu du proventricule a été broyé dans du NaCl à 5% et de l'acide borique à 0,2% dans un rapport de 1/2 (poids / volume) du mélange d'extraction, congelé à -18 ° C pendant 24 h, puis décongelé et macéré à 4 ° C sous agitation douce pendant 24 h, et le mélange obtenu est filtré sur une bande à gaze et le filtrat est centrifugé à 3200 g à 4 ° C pendant 20 min et enfin, le surnageant récupéré est filtré sur papier filtre. Le pH de l'extrait enzymatique brut a été ajusté à 2,0 avec du HCl 0,1 M et laissé reposer pendant 15 minutes à température ambiante, puis réajusté à pH 5,0 avec du NaOH 0,1 M (**Figure 10**).

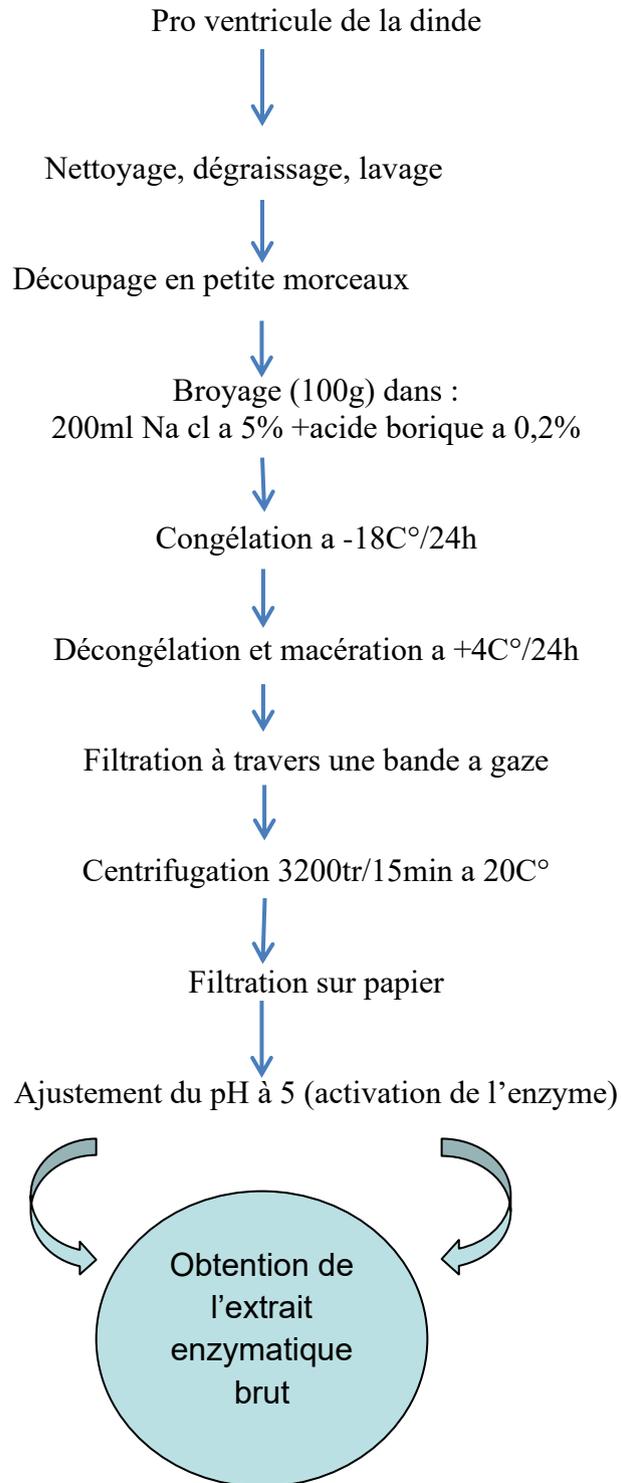


Figure 10: Principales étapes d'extraction de l'enzyme brut à partir du pro-ventricule de la dinde (Tsouli, 1974).

2.1 Détermination du taux de protéines totales de l'extrait enzymatique

Le taux de protéines totales de l'extrait enzymatique est déterminé par la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**).

Le principe de cette méthode est basé sur la coloration des protéines de la solution par le bleu de coomassie G-250. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéine dans le milieu. C'est une méthode très sensible détectant des teneurs en protéines inférieures à 10 µg/mL. L'intensité de la coloration est mesurée à 595 nm au spectrophotomètre.

La concentration en protéine est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec le sérum albumine bovin (BSA), (**Annexe 5**).

2.2. Expression du rendement de l'extraction

Le rendement d'extraction de la présure est exprimé par unités présures totales rapportées au volume final obtenu après extraction et à l'unité de masse de proventricules frais. Le rendement d'extraction relatif à l'extrait enzymatique brut coagulant de dinde obtenu après macération de 100 g de proventricules dans 300 mL de solution d'extraction est exprimé par unités présures totales rapportées au volume d'extraction final et à l'unité de masse de proventricules frais ainsi que par la force coagulante.

2.3. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

2.3. 1. L'activité coagulante

La méthode est basée sur la mesure du temps de floculation, qui consiste à l'intervalle de temps compris entre le moment de l'emprésurage et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu. (**Alais, 1984**).

L'activité coagulante est mesurée selon la méthode de **Berridge (1945)** sur le lait de vache frais et le lait UHT. La technique consiste à ajouter 1 mL d'extrait enzymatique à 10 mL de substrat contenant 0,01 M du CaCl₂. Le pH est ensuite ajusté à 6,5 à l'aide d'une solution de NaOH 0,1 N. Le temps de coagulation est le temps d'apparition des petits flocons dans un mince film de lait s'écoulant sur la paroi du tube après l'addition du substrat à 30°C.

L'activité est exprimée en unité présure (UP) qui correspond au nombre d'unités de poids ou de volumes de lait qui peuvent être coagulés par 1 mL de préparation coagulante en 100 secondes à 30 °C. Elle est calculée en utilisant l'équation de **Berridge (1945)** suivante :

$$UP = 10 \times V / Tc \times Q \quad (1)$$

Où :

UP = unité présure ;

V = volume de substrat standard utilisé ;

Q = volume d'extrait coagulant ;

Tc = temps de coagulation.

3. Méthodes de purification

3.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium a été réalisée selon la méthode de *Harris et Angal (1989)*. L'addition du sulfate d'ammonium à une solution protéique provoque une déshydratation et précipitation des protéines (macromolécules), induisant ainsi le phénomène de relargage.

La pré-purification a été réalisée avec des étapes successives de précipitation au sulfate d'ammonium à 25, 50 et 75% de saturation (saturation à 100% correspond à 760 g / L de sulfate d'ammonium à 25 ° C) sur un extrait enzymatique brut.

3.2. Dialyse

Pour éliminer les sels d'ammonium avant FPLC (chromatographie liquide rapide des protéines) sur colonne échangeuse d'ions, les fractions obtenues après chaque précipitation sont dialysées sur des membranes de (8000 Dalton) découpées en boudins, contre un grand volume de Tris / HCl (pH 7) à 4°C pendant 24 h sous agitation.

3.3. Chromatographie échangeuse d'ions (FPLC)

La chromatographie échangeuse d'ions permet la séparation des protéines selon la charge nette. Pour cela, des résines échangeuses d'ions sont utilisées (Hi-Trap SP-FF échangeuse de cations et Mono Q HR 5/5 échangeuse d'anions). (**Annexe 6**)

3.3.1. Chromatographie échangeuse de cations

Le culot obtenu avec 50% de saturation en sulfate d'ammonium a été mis en suspension dans le formiate de sodium à pH 3,5, puis purifié par FPLC sur une colonne Hi-Trap SP-FF (5x1mL) échangeuse de cations reliée à un appareil ÄKTA-Purifier. L'élution s'effectue en utilisant un gradient en palier de NaCl de force ionique allant de 0 à 0.5M. Le débit d'élution est maintenu constant à 1 mL/min. La lecture de l'absorbance est réalisée à 280 nm.

Les fractions actives sont collectées, lyophilisées et conservées pour réaliser une électrophorèse.

3.3.2. Chromatographie échangeuse d'anions

Les fractions présentant une activité coagulante ont été regroupées et dialysées contre du tampon Tris / HCl à pH 7,0 sur une membrane de 8 000 Da pendant 24 h dans une chambre froide maintenue à 4 ° C. La solution dialysée a été ensuite chargée sur une colonne Mono Q HR 5/5 échangeuse d'anions connectée à l'appareil ÄKTA-Purificateur. Un gradient de NaCl 0-0,5 M a été appliqué pendant 20 min à un débit de 1 mL/ min. Les fractions de coagulation ont été ensuite analysées par SDS-PAGE .

3.4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)

Principe

Un échantillon protéique est chauffé à 100°C pendant 5 mn, en présence d'un détergent anionique le dodécylsulfate de sodium (SDS ; 10% p/v) et d'un agent réducteur chargé de rompre les liaisons disulfure, le 2-mercaptoéthanol (2-ME ; 4% v/v). La plupart des polypeptides sont dans ce cas dissociés, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques, les polypeptides acquièrent alors une forte charge négative et ne seront séparés que suivant leur taille dans un gel de porosité appropriée.

3.4.1. Conditions expérimentales

La méthode en tampons discontinus de **Laemmli (1970)** est utilisée. Le gel (système de migration verticale) est formé d'un gel de concentration (5 %) ; en tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 0,1% (p/v) de (SDS) et d'un gel de séparation (12%) en tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8 contenant 0,1% (m/v) de SDS.

Le tampon d'électrodes (pH 8,3) est composé de 50 mM de Tris, de 384 mM de glycine et de 0,1% (m/v) de SDS.

Les échantillons subissent alors un traitement thermique à 100°C pendant 3 min. Des dépôts de 20 µL sont effectués dans les puits du gel. La migration électrophorétique est effectuée sous des conditions électriques de 500 mA, 250 W et 200 V (pour 2 gels) pendant 45 min environ, à 4°C.

3.4.2. Révélation des protéines par le bleu de Coomassie

Après migration électrophorétique, les protéines sont fixées dans le gel par l'acide trichloracétique (TCA) à 12% (p/v) pendant 15 min, puis révélées pendant 2 h par une suspension colloïdale de bleu de Coomassie R250 à 0,1% (m/v) dans un mélange d'éthanol à 50% (v/v) et de TCA à 2% (p/v). La décoloration est effectuée par plusieurs lavages dans une solution d'éthanol à 30% (v/v) et d'acide acétique à 7,5% (v/v). Le gel est ensuite séché entre deux feuilles de Cellophane dans un sécheur à gel et conservé sous cette forme.

3. 5. Chromatographie liquide haute performance à phase inversée (RP-HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur colonne de phase inverse permet la séparation des constituants d'un mélange selon leur hydrophobie relative. La phase stationnaire est majoritairement composée de silice greffée par des groupements hydrophobes, le plus souvent des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C-8 et C-18). La phase mobile est un solvant polaire. Ainsi, les composés sont élués dans l'ordre de leur hydrophobie croissante. La détection en sortie de colonne est réalisée par mesure d'absorbance en UV.

Pour identifier les différentes formes actives possibles dans l'extrait enzymatique, les fractions de coagulation obtenues par chromatographie d'échange de cations ont été séparées par RP-HPLC sur une colonne PTH-C18 à alésage étroit (220 × 2,1 mm, granulométrie 5 µm, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) connecté au système Biopolymer Micro de purification et d'analyse modèle 172 (Applied Biosystems). Un volume d'échantillon de 200 µL a été chargé sur la colonne. Un gradient d'acétonitrile de 2-70% contenant de l'acide trifluoroacétique à 0,1% (v / v) a été appliqué pendant 60 minutes. Le débit était de 250 µL/min et la détection a été effectuée à 215 nm. Les fractions ont été recueillies et soumises à un test de coagulation.

4. Caractérisation de l'extrait enzymatique purifié

Pour mieux caractériser l'extrait enzymatique du proventricule de la dinde, nous avons déterminé les conditions optimales de l'activité coagulante, en faisant varier les paramètres suivants : le pH, la température et la concentration en CaCl₂ du lait. L'activité coagulante est exprimée en U.P. et mesurée selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante où tous les paramètres sont fixés sauf celui à étudier (T°: 35°C ; pH: 6,4 ; [CaCl₂]: 0,01M).

4.1. Détermination de la température optimale d'activité coagulante

La température optimale de coagulation du lait par l'extrait enzymatique a été déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait porté à des températures variables (30 à 70 °C), en fixant la température aux valeurs suivantes : 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70. La valeur de chaque activité coagulante correspond à la moyenne de trois essais.

L'activité coagulante est mesurée pour chaque valeur de T° (en U.A.C/ml). La valeur de chaque activité coagulante correspond à la moyenne de trois essais.

4.2. Détermination du pH optimal de coagulation enzymatique

Le pH a une forte influence sur l'activité enzymatique de ces préparations et par conséquent sur le temps de floculation du lait.

Le pH du substrat de Berridge a été ajusté dans la plage de 5,2 à 7,0 avec des solutions de HCl 0,1 M ou de NaOH 0,1 M. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, le pH a été mesuré et le temps de coagulation du lait a été déterminé. La température d'incubation est fixée à 35°C. La valeur de chaque activité coagulante correspond à la moyenne de trois essais.

4.3. Détermination de la concentration de CaCl₂ sur l'activité coagulante

La concentration en CaCl₂ optimale de coagulation du lait par l'extrait enzymatique coagulant a été déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait à différentes concentrations de CaCl₂ (0,01 à 0,08 M), à température de 35°C et à pH 6,4.

4.4. Effet des inhibiteurs sur l'activité coagulante

Différents types d'inhibiteurs de protéinase ont été ajoutés à l'EEP pour obtenir la concentration finale désignée. EDTA à (5 mM), pepstain A à (20µM) et 2- mercaptoéthanol à (5 mM). Après incubation du mélange à la température ambiante (26-28 ° C) pendant 15 min, l'activité restante a été mesurée. (Zhou et al., 2007).

5. Prédiction des séquences primaires en acides aminés

La prédiction de la séquence primaire de la pepsine de dinde a été faite par le logiciel protparam qui est un outil qui permet de calculer divers paramètres physiques et chimiques pour une protéine donnée stockée dans la banque de données Swiss-Prot (banque de données biologiques de séquences protéiques) ou pour une séquence protéique saisie par l'utilisateur. Les paramètres calculés comprennent le poids moléculaire, le pHi théorique, la

composition en acides aminés, la composition atomique, le coefficient d'extinction, la demi-vie estimée, l'indice d'instabilité, l'indice aliphatique et la grande moyenne d'hydropathicité (GRAVY) (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

L'alignement des séquences des acides aminés a été fait par le logiciel blast du NCBI (National Center for Biotechnology Information), permettant la comparaison des séquences de nucléotides et de protéines. (Site : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

6. Essai de fabrication de fromage à pâte fraîche « petit suisse »

6.1. Préparation de lait

Le lait cru de vache préalablement étudié est transformé en caillé par l'addition de la présure d'une part pour le premier essai et par l'enzyme brut de dinde pour le deuxième essai d'autre part. Le lait a une acidité de 16°D, il va subir une pasteurisation à température de 90°C pendant 20 sec et refroidi par la suite à 25°C à 28°C.

6.2. Emprésurage

la coagulation est réalisée par l'ensemencement d'une culture mixte de 1 g de levains mésophiles additionnée de 10 mL de l'extrait enzymatique brut ou 1 g de levains mésophiles additionné de 3 mg de présure puis fermentation pour une durée 12 à 14 h .C'est l'opération la plus importante dans la fabrication de fromage, elle correspond à une déstabilisation micellaire originale du lait.

6.3. Découpage

Lorsque son acidité atteint 75 à 80°D, le caillé est brassé pendant 10 à 15 min, puis subira une thermisation à 63°C pendant 6min.

6.4. Séparation

C'est une opération qui complète la coagulation, elle a pour but la séparation de la phase solide (caillé) de la phase aqueuse.

Le rôle de la séparation ne se limite pas à amener le coagulum à une teneur définie en eau, elle permet aussi de régler sa minéralisation.

Une fois cette opération est déterminée le caillé brassée subit une séparation du sérum et du caillé, ce dernier passe dans un refroidisseur de 4 à 6°C.

Le caillé refroidi est additionné de crème fraîche à raison de 40 g/L de matière grasse par litre.

6.5. Analyse physico-chimique du lait

6.5.1. Détermination de l'acidité

Titration de l'acidité par une solution de soude en présence de phénolphthaléine. Selon la méthode **AFNOR (1986)**.

Mode opératoire

Prendre (10mL) de l'échantillon à analyser, ajouter quelques gouttes de phénolphthaléine, faire le titrage avec la soude à (N/9), attendre l'apparition d'une couleur rose claire puis lire la chute de burette (V).

$$A = V \times 10 \quad (2)$$

Avec :

A = acidité par degré du Dornic.

6.5.2. Détermination de la matière sèche totale (EST)

L'extrait sec total est obtenu par la dessiccation du lait, par évaporation d'une certaine quantité d'eau et pesée du résidu sec. Elle est mesurée à l'aide d'un dessiccateur à infrarouge (MA 30 Presisa), muni d'une balance permettant la lecture directe de la matière sèche exprimée en gramme pour 100ml de lait (**AFNOR, 1986**).

L'extrait sec dégraissé (**ESD**) est déduit directement à partir de l'extrait sec total (EST) et de la matière grasse du lait par la formule : $EST \text{ (g/l)} - MG \text{ (g/l)}$

6.6. Contrôle microbiologique du fromage

L'objectif de ces analyses est de déterminer l'évolution de la flore bactérienne suivante :

- Germes aérobies mésophiles totaux.
- Coliformes totaux/fécaux.
- Clostridium S/R.
- Salmonelles. Staphylococcus aureus.

Pour le dénombrement et les milieux de culture (**Voir annexe 7**).

III. Analyse statistique

Les données expérimentales sont présentées sous forme de moyennes et d'écart-type de trois essais. Pour confirmer ou infirmer la présence d'une différence significative de certains facteurs de mesure des données expérimentales, une analyse de la variance (ANOVA) au seuil de 5% est effectuée par l'utilisation du logiciel XL-Stat (2010).

1. Test de Student (Test t)

Le test t compte parmi les procédures statistiques les plus fréquemment employées. Il sert à comparer les différences de moyennes entre deux groupes. Le test suppose que les variables sont normalement distribuées et que les variances de chaque groupe sont égales.

2. Test de corrélation

La corrélation permet d'étudier l'intensité de la liaison qui peut exister entre plusieurs variables. La mesure de cette corrélation est obtenue par le calcul du coefficient de corrélation linéaire compris entre -1 et 1. La matrice de corrélation regroupe les corrélations de plusieurs variables entre elles, les coefficients indiquant l'influence que les variables ont les unes sur les autres.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Variation de la composition du lait en fonction de quelques facteurs de production.

Plusieurs facteurs influencent la composition du lait de vache. Cette étude consiste à évaluer les effets des facteurs de variation (l'alimentation et la race) sur la composition physico-chimique du lait de vache (taux butyreux, taux protéique, l'extrait sec, la densité et l'acidité).

1. Effet de la race sur la composition physico-chimique du lait

La comparaison entre races, présentée dans le **tableau 16**, fait apparaître des différences non significatives pour la majorité des paramètres physico-chimiques de la composition laitière, mise à part la teneur en extrait sec dégraissé qui présente une valeur significative d'après les résultats statistiques $83,75 \pm 1,27$ pour la race Montbéliarde contre $80,2 \pm 1,01$ pour la Holstein, avec un écart 3.55 avec ($P < 0,05$).

Tableau 16 : Effet de la race sur les caractéristiques physico-chimiques du lait

Paramètres	Moyenne \pm écart-type Holstein	Moyenne \pm écart-type Montbéliarde	ddl	P	Signification
Acidité ($^{\circ}$ D)	$16,85 \pm 0,36$	$17,2 \pm 0,16$	3	0,13	NS
Densité	$1030,45 \pm 0,32$	$1030,35 \pm 0,17$	3	0,67	NS
EST (g/L)	$115,2 \pm 1,58$	$118,25 \pm 0,52$	3	0,08	NS
ESD (g/L)	$80,2 \pm 1,01$	$83,75 \pm 1,27$	3	0,01	*
Lactose (g/L)	$47,18 \pm 0,64$	$47,65 \pm 0,65$	3	0,42	NS
Protéines (g/L)	$32,9 \pm 1,24$	$33,05 \pm 0,21$	3	0,85	NS
MG (g/L)	$35 \pm 0,5$	$34,5 \pm 0,86$	3	0,45	NS

*: significative ($P < 0,05$) ; NS: Non significative, ddl : degré de liberté

Le test de student, permet de comparer les moyennes obtenues pour les variables laitières pour les deux races (Holstein et Montbéliarde).

L'acidité du lait de la Montbéliarde $17,2 \pm 0,16$ est plus élevée que celle du lait de la race Holstein $16,85 \pm 0,36$ avec un écart de 0.35. L'effet race n'a pas de signification sur l'acidité, même si la Montbéliarde produirait un lait légèrement acide, ces résultats obtenus pour les deux races restent conformes aux normes.

La variabilité du taux de lactose est faible entre les laits des deux races (Holstein et Montbéliarde), avec une teneur de 47.18 ± 0.64 contre 47.65 ± 0.65 respectivement. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues par **Frog et al. (1988)** dans une étude similaire.

L'extrait sec $118,25 \pm 0,52$ est plus élevé chez la race Montbéliarde que la Holstein $115,2 \pm 1,58$, mais cette différence est non significative. Cependant cette valeur est inférieure aux valeurs rapportées par (Alais, 2003).

Pour la densité elle est légèrement supérieure pour le lait de Holstein $1030,45 \pm 0,32$ par rapport à celle du lait de Montbéliarde $1030,35 \pm 0,17$, avec un écart de 0.10. Le lait de la Holstein est plus dense que celui de la Montbéliarde, ce résultat est en rapport avec la richesse en matière grasse.

1.1. Effet de la race sur la matière grasse et les protéines

Le taux butyreux des Holstein $35 \pm 0,5$ est supérieur à celui des Montbéliardes $34,5 \pm 0,86$, avec un écart de 0.5g/l en faveur de la race Holstein (Figure 11). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Larbaoui et al. (2013) dans une étude similaire.

Le taux protéique du lait de la race Montbéliarde $33,05 \pm 0,21$ est supérieur à celui des Holstein $32,9 \pm 1,24$, avec un écart de 0.6 g/L, d'un point de vue statistique cette différence est non significative. (Figure 11)

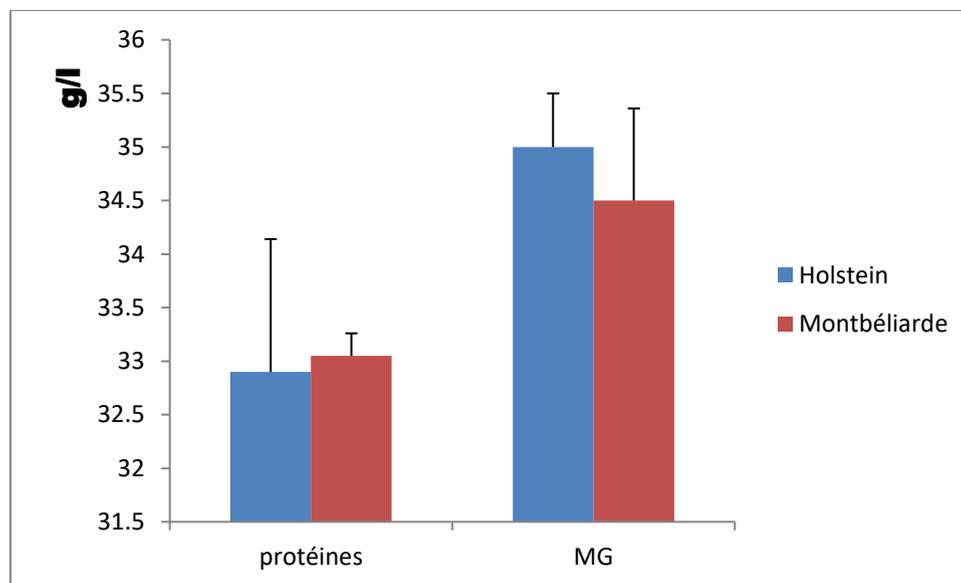


Figure 11 : Variation des teneurs en matières grasses et en protéines en fonction de la race

1.2. Effet de la race sur les acides gras

Les résultats relatifs au profil en acide gras, sont rapportés dans le tableau 17 et permettent de faire les observations suivantes :

1.2.1. Acides gras saturés

Le profil des acides gras des laits, indique que le niveau en acides gras saturés est plus élevé chez la race Montbéliarde, avec 42,84 % pour **AGSCMC** et 11,91% pour **AGSLC**.

Comparativement, au lait de la race Holstein 38,96% pour **AGSCMC** et 10,18% **AGSLC**.

1.2.2. Acides gras insaturés

Le profil des acides gras des laits, indique que le niveau en acides gras insaturés est plus élevé chez la race Montbéliarde, avec 2,76 % pour **AGICMC** et 28,26 % pour **AGILC**.

Comparativement, au lait de la race Holstein 2,22 % pour **AGICMC** et 27,5% **AGILC**.

(**Figure 12**). Cependant, plusieurs auteurs ont montré la race est un facteur de variation important de la composition en acides gras du lait. Selon **Boichard et al. (2014)**, chez les bovins, les AG Saturés (AGS) exprimés en % du lait présentent une héritabilité moyenne à forte, tandis que les AG insaturés (AGI) présentent une héritabilité faible à modérée.

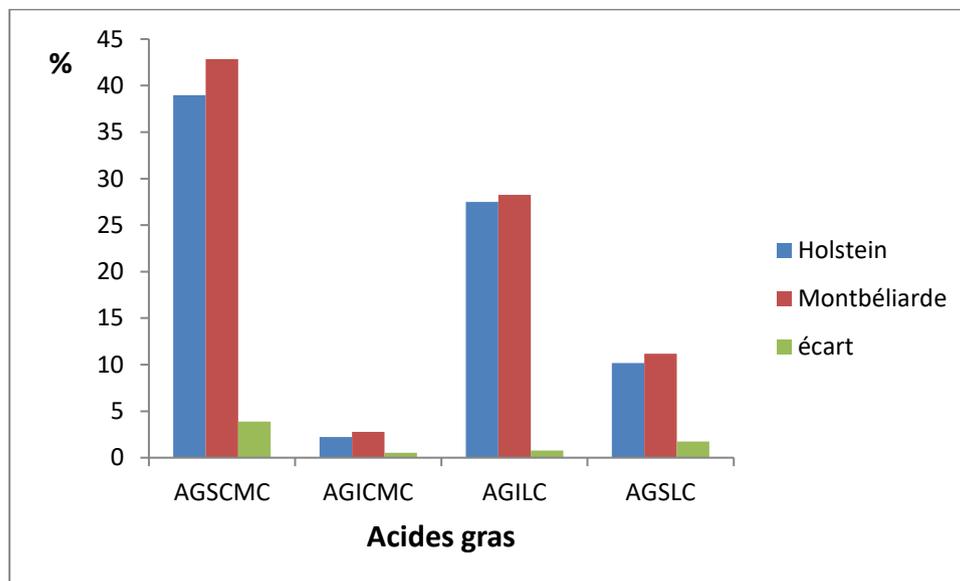


Figure 12 : Variation des proportions des acides gras à courte et moyenne chaîne et les acides gras à longue chaîne en fonction de la race

D'après **tableau 17**, les acides gras à courte et moyenne chaîne, présentent un pourcentage élevé en acide palmitique (C16 :0) avec un pourcentage de 25,78% chez la Montbéliarde contre 23,39% pour la Holstein. De même, l'acide stéarique (C18 :0) représente un pourcentage de 8,55% pour le lait de la Montbéliarde contre 7,32% pour le lait de la Holstein.

Par ailleurs, les AG insaturés à longues chaînes, l'acide oléique (C18:1) est le plus représenté, dans le lait des deux races, avec 21.37% et 17.86% respectivement pour la Montbéliarde et la Holstein.

Tableau 17 : Variation de la composition en acides gras du lait en fonction de la race

Acides gras	Dénomination	Holstein % AG%	Montbéliarde % AG	écart %
C4:0	butyrique	1,58	1,75	0,17
C6:0	A,caproïque	0,89	0,89	0
C8:0	A,caprylique	0,59	0,56	-0,03
C10:0	A,caprique	1,49	1,61	0,12
C12:0	A,Laurique	2,01	2,41	0,4
C13:0	A,Tridécénoïque	0,11	0,18	0,07
C14:0	A,Myristique	7,41	8,19	0,78
C15:0	A,Pentadécénoïque	1,11	1,23	0,12
C16:0	A,Palmitique	23,39	25,78	2,39
C17:0	A,Margarique	0,38	0,24	-0,14
AGSCMC		38,96	42,84	3,88
C14:1	A,Tridécénoïque	0,97	1,21	0,24
C16:1	A,Palmitoléique	0,68	0,66	-0,02
C17:1	A,Margaroléique	0,57	0,89	0,32
AGICMC		2,22	2,76	0,54
C18:1	A,Oléique	17,86	21,37	3,51
C18:2	A,Linoléique	5,51	2,89	-2,62
C18:3	A,Linolénique	0,74	1,99	1,25
C20:1	A,Gadoléique	3,39	2,01	-1,38
AGILC		27,5	28,26	0,76
C18:0	A,Stéarique	7,32	8,55	1,23
C20:0	A,Arachidiue	1,51	1,39	-0,12
C22:0	A,Béhinique	1,35	1,97	0,62
AGSLC		10,18	11,91	1,73

2. Effet de l'alimentation sur la composition physico-chimique du lait

La substitution du régime foin et fourrage vert par l'orge et le bersim, montre des effets significatifs sur la majorité des paramètres physico-chimiques des différents laits, mis à part la densité et le lactose qui présentent des résultats non significatifs (selon l'analyse statistique).

Tableau 18: Effet de l'alimentation sur les caractéristiques physico-chimiques du lait

paramètres	Moyenne ± écart-type Témoin	Moyenne ± écart-type Expérimental	ddl	P	signification
Acidité (°D)	15,33±0.76	17.16±0.76	2	0.04	*
Densité	1030.30±0,1	1030,43±0,32	2	0.56	NS
EST (g/L)	113,80±0,32	128,20±0,73	2	0.000	**
ESD (g/L)	77,80±1.97	86,20±2.88	2	0.01	*
Lactose (g/L)	47,26±0,28	48,43±0,76	2	0.08	NS
Protéines (g/L)	33,1±0,08	33,79±0,26	2	0.04	*
MG (g/L)	35±1,73	42±2.64	2	0.03	*

*: significative (P< 0,05) ; ** : hautement significative (P< 0,01), NS: Non significative
ddl : degré de liberté

2.1 Acidité

Selon **tableau 18**, l'acidité du lait du lot expérimental 17.16±0.76 est plus élevée que celle du lait du lot témoin 15,33±0.76 avec un écart de 1.83. L'effet de l'alimentation est significatif sur l'acidité

2.2 Lactose

La variabilité du taux de lactose des différents laits est élevée entre les deux lots (témoin et expérimental), avec une teneur de 47,26±0,28 contre 48,43±0,76 respectivement. Les variations des résultats entre les différents laits ne sont pas significatives (selon l'analyse statistique).

2.3 EST

L'extrait sec 128,20±0,73 est plus élevé, dans le lait du lot expérimental que dans le lait du témoin 113,80±0,32. Cependant, les résultats de l'analyse statistique montre que cette différence est hautement significative.

Néanmoins, la teneur en extrait sec du lait issu du lait témoin, reste dans l'intervalle des normes établies.

Par ailleurs, il est bien connu que la teneur en extrait sec du lait varie selon la saison, ainsi, elle est faible en hiver qu'en été (115g/1000 en hiver et 123g/1000 en été). Les variations journalières de matière sèche au cours de trois semaines de fabrication ont été plus accentuées au pâturage (**Garel et Coulon, 1990**).

Selon **Croguennec et al., (2008)**, l'augmentation ou la diminution de l'extrait sec total est directement liée à une variation du taux de protéines et de la teneur en matière grasse,

2.4 Densité

L'évaluation de la densité des différents laits, montre qu'elle est légèrement supérieure dans le lait du lot expérimental par rapport du lait du lot témoin $1030,43 \pm 0,32$ contre $1030,30 \pm 0,1$ respectivement, avec un écart 0.13.

2.5 Protéines

Selon **tableau 18**, on note une augmentation de la teneur en protéines du lait pour le lot expérimental $33,79 \pm 0,26$ contre $33,1 \pm 0,08$ pour le lait du témoin avec un écart de 0.69 (**Figure 13**).

Agabriel et al. (1993), rapportent qu'une augmentation d'un apport énergétique se traduit généralement par un accroissement de la teneur en protéines et de la production laitière. L'alimentation permet d'agir à court terme, et de manière différente, sur le taux des protéines et de matières grasse. Le taux protéique varie dans le même sens que l'apport énergétique (**Hoden et Coulon, 1991**).

Selon **Vignola (2002)**, la teneur en matière grasse et en protéines du lait varie selon la saison, elle diminue pendant l'hiver et printemps.

Selon **Sutton (1989)**, la teneur en protéines peut varier grandement en raison de facteurs alimentaires. En effet, ce paramètre augmente linéairement avec l'apport énergétique. Ainsi la mise à l'herbe, il n'est pas rare d'observer une réduction importante des écarts (de 3 à 5g/kg) entre les taux butyreux et protéique selon les situations (**Agabriel et al 1995**).

Les rendements en fromage les plus élevés ont été obtenus avec les régimes à base de foin et d'herbe pâturée et avec les vaches montbéliardes. La baisse du taux protéique du lait liée au régime ensilage d'herbe s'est traduit par une réduction du rendement en fromage (**Garel et Coulon, 1990**)

2.6 Matière grasse

La matière grasse $42 \pm 2,64$ est plus élevée, dans le lait du lot expérimental que dans le lait du témoin $35 \pm 1,73$. Cependant, les résultats de l'analyse statistique montre que cette différence est significatif ($P < 0,05$).

Par ailleurs, le taux butyreux dépend de l'apport d'aliment concentré dans la ration. Il peut être sensiblement augmenté par certains aliments (ensilage de maïs, betteraves) (**Hoden et Coulon 1991**).

Selon **Sutton et al. (1987)**, les concentrés riches en amidon abaissent beaucoup plus les taux butyreux du lait que ceux riches en fibres. La diminution du taux butyreux (TB) observée lors de l'utilisation de rations riches en concentré et/ou en lipides est surtout une conséquence d'une synthèse réduite de matières grasses dans la mamelle.

Les causes de cette réduction sont multiples et liées aux modifications de l'environnement ruminal provoquées par ce type de régime (**Bauman et al., 2001**).

Selon d'autres études, les rations à base d'herbe permettent l'augmentation du taux butyreux (**Agabriel et al., 1993**).

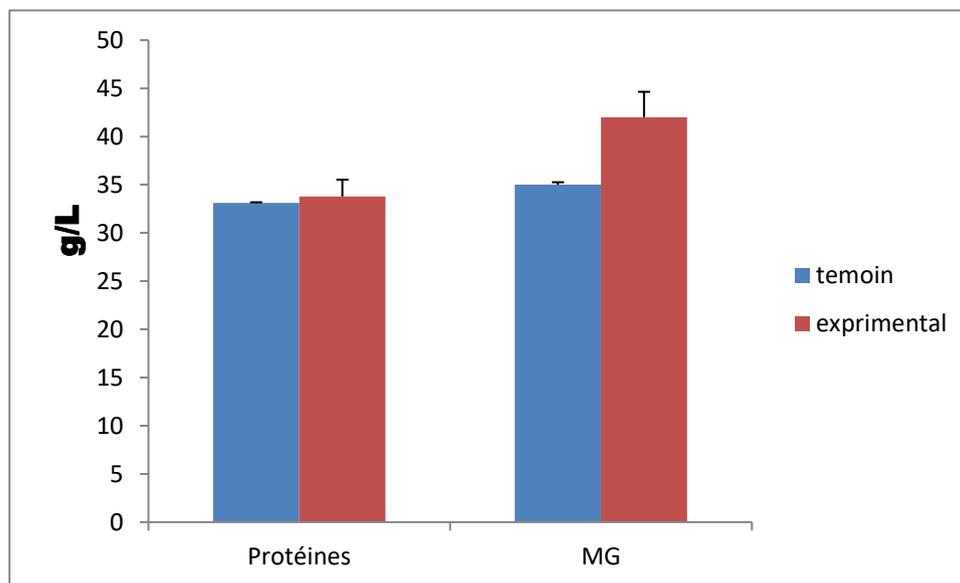


Figure 13 : Variation des teneurs en matières grasses et en protéines en fonction de l'alimentation

2.6.1 Acides gras

Les résultats relatifs à l'effet du régime fourrage vert (bersim) et orge sur le profil en AG sont rapportés dans le (**tableau 19**). Le pourcentage des **AGSCMC** (C14:0, C16:0) du lot expérimental (38.27%) est inférieur à celui du lot témoin (38.69%).

Par contre le pourcentage des **AGICMC** du lot expérimental (3,05 %) est supérieur à celui du lot témoin (2,64 %) (**Figure 14**).

Pour les **AGILC** (C18 :1, C18 :2, et C18 :3), le pourcentage du l t expérimental (32.11%) est supérieur à celui du l t témoin (30.11 %). Ces résultats sont conformes à ceux indiqués par la littérature (**Legarto et al., 2014**).

Les écarts observés seraient dus principalement aux différences de profil en AG du fourrage : l'herbe est riche en C18:3 n-3, l'apport plus important d'AGPI par l'herbe verte concourt à l'augmentation de ces mêmes AG dans le lait, malgré leur hydrogénation partielle.

Tableau 19: Variation de la composition en acides gras du lait en fonction de l'alimentation

Acides gras	Dénomination	Témoin (%)	Expérimental (%)	�cart (%)
C4:0	butyrique	1,41	1,44	-0,03
C6:0	A,caproique	1,07	1,21	-0,14
C8:0	A,caprylique	0,44	0,73	-0,29
C10:0	A,caprique	1,49	2,39	-0,9
C12:0	A,Laurique	1,86	3,06	-1,2
C13:0	A,Trid�c�noique	0,28	0,33	-0,05
C14:0	A,Myristique	7,4	8,85	-1,45
C15:0	A,Pentad�c�noique	0,98	0,81	0,17
C16:0	A,Palmitique	23,39	19,2	4,19
C17:0	A,Margarique	0,37	0,25	0,12
AGSCMC		38,69	38,27	0,42
C14:1	A,Trid�c�noique	0,91	1,32	-0,41
C16:1	A,Palm�toleique	1,12	1,23	-0,11
C17:1	A,Margarol�ique	0,61	0,5	0,11
AGICMC		2,64	3,05	-0,41
C18:1	A,Ol�ique	20,28	21,18	-0,9
C18:2	A,Linol�ique	5,58	6,43	-0,85
C18:3	A,Linol�nique	0,79	1,08	-0,29
C20:1	A,Gadol�ique	3,46	3,429	0,031
AGILC		30,11	32,11	-2,009
C18:0	A,Stéarique	7,33	6,35	0,98
C20:0	A,Arachidiue	1,85	1,78	0,07
C22:0	A,B�hinique	1,38	1,26	0,12
AGSLC		10,56	9,39	1,17

Selon **Chenais (2004)**, les régimes à base d'herbe pâturée donnent des laits riches en acides gras longs et insaturés et en acides gras de bonne valeur nutritionnelle.

Les laits du régime ensilage herbes se différencient nettement des laits issus du régime maïs complétement avec du soja. Ils sont plus riches en acides gras longs, avec parallèlement une réduction des acides gras courts et surtout moyens. Ils sont par ailleurs moins riches en acides gras saturés, notamment en acide palmitique, avec en contrepartie une augmentation de la teneur en acides monoinsaturés (acide oléique C18:1) et polyinsaturés (acide linoléique C18:3).

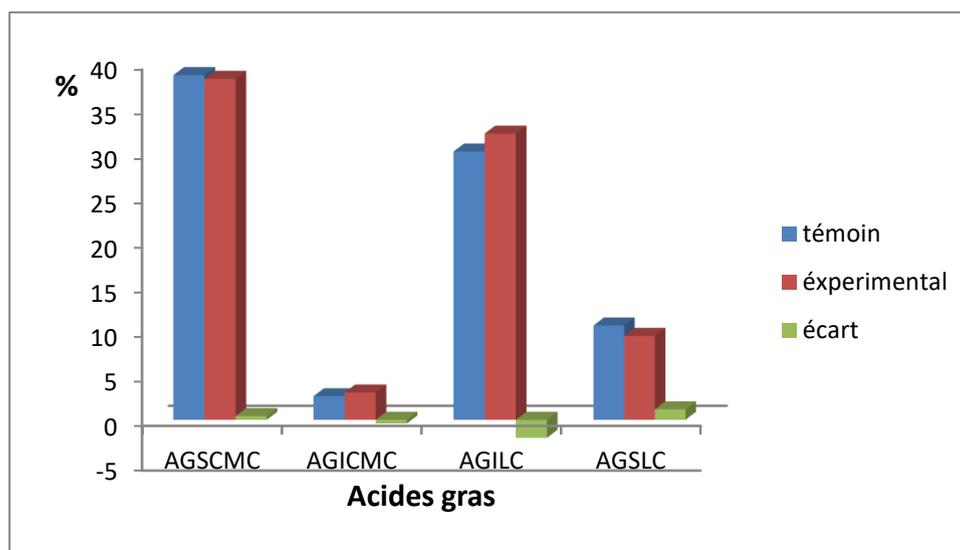


Figure 14 : Variation des proportions des acides gras à courte et moyenne chaîne et les acides gras à longue chaîne en fonction de l'alimentation

3. Etude de la corrélation entre les facteurs de production et les variables physicochimiques et technologiques du lait

Le test de corrélation est effectué pour mettre en évidence les relations de dépendance qui peuvent exister entre les différents variables physicochimiques et technologiques pour les facteurs étudiés (race et alimentation).

Au seuil de signification total $\alpha = 0,05$, on peut rejeter l'hypothèse nulle (absence de corrélation significative entre les variables). Les matrices de corrélation résultantes sont présentées dans les **tableaux 20.1** et **20.2**.

Les résultats de la matrice de corrélation relatif au facteur race, **tableau 20.1**, confirme des propriétés bien connues : il existe une corrélation très hautement significative entre :

- L'acidité et ESD ($r = 0.89$), et une corrélation négative entre l'acidité et le taux de lactose et MG avec respectivement des coefficients de corrélation de : ($r = -0.97$) et EST ($r = -0.99$)
- La densité et EST ($r = 0.98$) et temps de coagulation pour protéase dinde ($r = 0.95$) et

corrélation négative entre la densité et taux protéique ($r = -0.99$)

- Il y'a une corrélation hautement significative entre l'ESD et AGS, AGI et temps de coagulation présure avec respectivement des coefficients de corrélation de : ($r = 0.94, 0.94, 0.94$) et EST avec taux protéique ($r = -1$).
- Il y a une corrélation négative pour le facteur race du taux protéique avec AGS, AGI et le temps de coagulation soit pour présure ou protéase dinde avec respectivement des coefficients de corrélation de : ($r = -0.91, -0.91, -0.91$ et -0.98). C'est le même cas pour MG avec AGS, AGI et temps de coagulation soit pour présure ou protéase dinde avec respectivement des coefficients de corrélation de : ($r = -0.87, -0.87, -0.87$ et -0.75).

Tableau n° 20.1 : Matrice de corrélation entre les variables physicochimiques et technologiques du lait pour la race

Variables	acidité	densité	ESD	EST	lactose	proteines	MG	AGS	AGI	t,coag,pr(sec)	t,coag,p,d(sec)
acidité	1,00										
densité	0,36	1,00									
ESD	0,89	0,75	1,00								
EST	0,53	0,98	0,86	1,00							
lactose	-0,97	-0,13	-0,76	-0,32	1,00						
proteines	-0,45	-0,99	-0,81	-1,00	0,23	1,00					
MG	-0,99	-0,50	-0,95	-0,65	0,92	0,59	1,00				
AGS	0,78	0,87	0,98	0,94	-0,61	-0,91	-0,87	1,00			
AGI	0,78	0,87	0,98	0,94	-0,61	-0,91	-0,87	1,00	1,00		
t,coag,pr(sec)	0,78	0,87	0,98	0,94	-0,61	-0,91	-0,87	1,00	1,00	1,00	
t,coag,p,d(sec)	0,64	0,95	0,92	0,99	-0,44	-0,98	-0,75	0,98	0,98	0,98	1,00

Les résultats de la matrice de corrélation relatif au facteur alimentation, **tableau 20.2**, confirme des propriétés bien connues :

- Il y a une forte corrélation entre l'acidité et MG AGS, AGI, avec r respectivement (0.95, 1 et 1).
- Forte corrélation pour le taux protéique et le temps de coagulation pour la présure et la protéase de dinde avec r (0.74 et 0.79) respectivement. Le comportement d'un lait lors de la coagulation varie essentiellement en fonction du taux de protéines (**Remeuf et al., 1991**).

- Il y a une corrélation positive entre MG et AGS et AGI avec r (+0.94) et négative pour le temps de coagulation pour présure et protéase dinde avec r (-0,82 et -0.78) respectivement.

Tableau n° 20.2 : Matrice de corrélation entre les variables physicochimiques et technologiques du lait pour l'alimentation

variables	acidité	densité	ESD	EST	lactose	proteines	MG	AGS	AGI	t,coag,pr(sec)	t,coag,p,dinde(sec)
acidité	1,00										
densité	0,59	1,00									
ESD	0,99	0,70	1,00								
EST	-1,00	-0,51	-0,97	1,00							
lactose	-0,33	-0,96	-0,47	0,24	1,00						
proteines	-0,53	0,38	-0,39	0,61	-0,63	1,00					
MG	0,95	0,82	0,98	-0,91	-0,62	-0,22	1,00				
AGS	1,00	0,58	0,99	-1,00	-0,32	-0,53	0,94	1,00			
AGI	1,00	0,59	0,99	-1,00	-0,33	-0,53	0,94	1,00	1,00		
t,coag,pr(sec)	-0,96	-0,34	-0,91	0,98	0,05	0,74	-0,82	-0,96	-0,96	1,00	
t,coag,p,dinde(sec)	-0,94	-0,28	-0,88	0,97	-0,02	0,79	-0,78	-0,94	-0,94	1,00	1,00

II. Extraction et purification de la protéase du proventricule de la dinde *Meleagris gallopavo*

Les viscères de volailles, en particulier les proventricules de dinde, sont une source de protéases coagulantes du lait, actuellement sous-exploitées alors qu'ils sont disponibles tout au long de l'année. Ils nécessitent une meilleure valorisation pour l'industrie fromagère, En revanche de la présure des ruminants, dont la disponibilité est moindre et le coût est plus important. La pepsine est l'une des protéases d'origine animale qui a été testée pour son utilisation potentielle dans l'industrie fromagère en tant que substitut à la présure (**Benyahia-Krid et al., 2017**).

1. Extraction de la protéase de dinde

L'extraction de la protéase de dinde, a été réalisée par macération du proventricule dans NaCl à 5% (p/v), l'extrait brut est doué d'une activité coagulante de 11,1 UP/mL avec un taux de protéines de 9.2 mg/mL et une activité spécifique de 1.2 UP/mg (tableau 21). Le processus d'extraction des protéases coagulant le lait à partir de *Cynara cardunculus* L, dans un milieu salin a déjà été rapporté par **Tsouli, (1974)** et confirmé par **Beka et al. (2014)** . Le NaCl peut jouer un rôle dans la récupération de l'enzyme. En effet, **Beka et al. (2014)** ont obtenu une activité coagulante de l'extrait brut de 2,43 U/ mL pour une concentration de 5% de NaCl, alors que **Temiz et al. (2008)** ont obtenu une activité coagulante de 7,83 U/ mL pour une concentration de NaCl de 10%. Ces résultats suggèrent que la méthode appropriée pour l'extraction des enzymes coagulantes dépend fortement de la concentration de NaCl.

2. Purification de l'extrait coagulant brut de la dinde

Dans cette étude, le proventricule de dinde (*Meleagris gallopavo*) a été utilisé pour la purification de la protéase coagulant le lait. La procédure de purification développée dans cette étude a permis de révéler une bande active d'une masse moléculaire apparente de 36,5 kDa, qui correspond à la masse moléculaire rapportée par **Rao et al. (1998)**. Les protéases coagulant le lait, tant animales que microbiennes, appartiennent à une classe de protéases aspartiques qui ont des masses moléculaires comprises entre 30 000 et 40 000 Da. Les différentes étapes de purification de la protéase coagulante extraite du proventricule de dinde sont résumées dans le **tableau 21**.

Tableau 21: Différentes étapes de purification de la protéase de dinde (*Méleagris gallopavo*)

Étape de purification	Activité de coagulation (UP)	Quantité de protéines totales (mg /mL)	Activité spécifique (UP/ mg)	Facteur de purification	Rendement de purification (%)
Extrait brut	11,1 ± 0,2	9,20	1,2 ± 0,1	1	100
Sulfate d'ammonium (50%)	3.2 ± 0.4	2,11	1,5 ± 0,2	1,26	29
FPLC échangeuse de cations					
Fraction 12	2,2 ± 0,3	1,14	1,9 ± 0,2	1,27	69
Fraction 13	2,4 ± 0,6	0,95	2,5 ± 0,6	1,28	107
Fraction 14	2.8 ± 0.6	1,08	2,6 ± 0,6	1,02	116
Fraction 15	2,9 ± 0,6	1,41	2,1 ± 0,4	0,81	106
Fraction 16	2,6 ± 0,1	0,95	2.8 ± 0.1	1,32	89
FPLC échangeuse d'anions					
Fraction 22	0.4 ± 0.1	0,105	3,3 ± 0,8	1,20	13
Fraction 23	0,5 ± 0,2	0.115	4,6 ± 2,0	1,38	151

Cependant, la première étape de purification de l'enzyme coagulant le lait, est réalisée par la précipitation au sulfate d'ammonium à différents taux de saturation de l'extrait enzymatique brut. L'électrophorèse après précipitation au sulfate d'ammonium, a révélé une bande active d'enzyme purifiée pourrait indiquer une protéase monomère. (**Figure15**)

L'activité spécifique dans l'extrait brut augmente de 1,2 à 4,6 après purification par FPLC; cela s'explique par l'élimination des protéines inactives dans l'extrait brut.

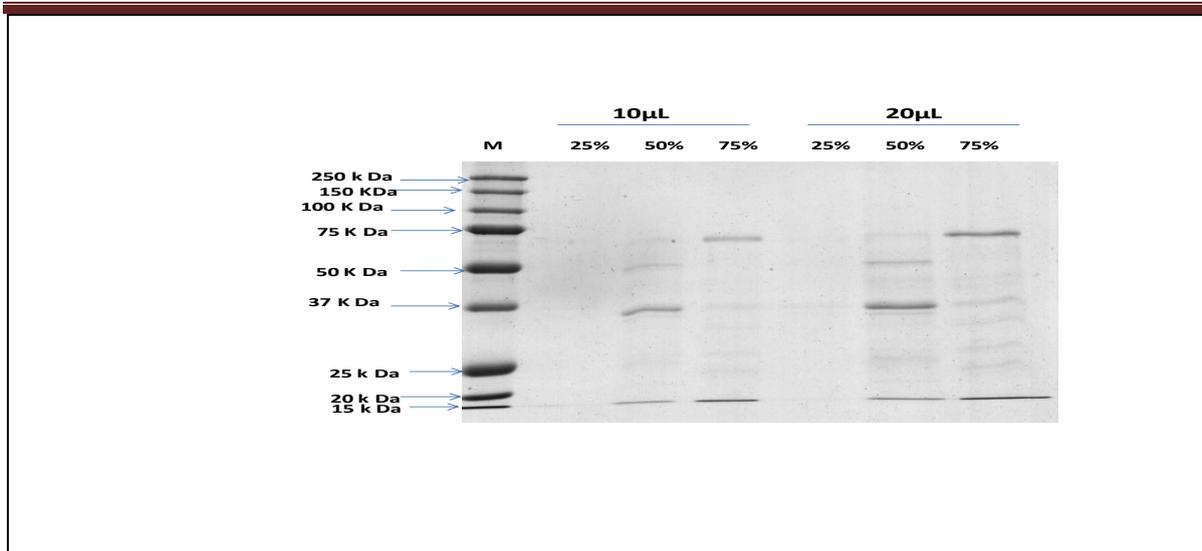


Figure 15 : Profil électrophorétique des bandes protéiques après précipitation par le sulfate d'ammonium à des taux de saturation de 25%, 50% et 75%. M : marqueurs protéiques, avec injection de 10µL et 20 µL d'échantillon

Les protéines obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium sont purifiées par chromatographie (FPLC). Les fractions protéiques actives ont été récupérées et soumises à une électrophorèse pour vérifier leur homogénéité, selon la méthode décrite dans matériel et méthodes.

La fraction caractérisée par l'activité coagulante a été obtenue par précipitation au sulfate d'ammonium à saturation de 50%. Elle est caractérisée par une activité coagulante de 3,2 UP/mL et une activité spécifique de l'ordre 1,5 UP/mg de protéine.

Le facteur de purification est de 1,26, ce qui correspond à un rendement de purification de l'ordre de 29%. **El-Beltagy et al. (2004)** ont obtenu une fraction coagulante précipitée par le sulfate d'ammonium entre 40 et 60% de saturation des viscères de boliti (*Tilapia nilotica*), avec une activité spécifique de 0,25 U/ mg en protéine, un facteur de purification de 4,16 et un rendement de purification de 42%. De même, **Zhou et al. (2007)** ont préparé un extrait d'enzyme de coagulation par précipitation au sulfate d'ammonium entre 20 et 60% de saturation de la dorade (*Sparus latus Houttuyn*) avec une activité spécifique de 3,0 U/ mg en Protéine, un facteur de purification de 1,4, et un rendement de purification de 64%.

Le profil Chromatographique obtenu par FPLC échangeuse de cations (**Figure 16**) montre 4 pics , et l'activité de coagulation a été mise en évidence dans les fractions recueillies 12-16 (fraction : 1 mL) éluées avec une concentration en Na Cl de 0,4 à 0,5 M et correspond aux matériaux (protéines inactives) les plus fortement adsorbé sur la colonne (quatrième pic).

Les fractions actives ont été analysées par SDS-PAGE (**Figure 17**) et une bande unique caractérisée par une masse moléculaire apparente de 36,5 kDa a été révélée. Ces résultats confirment ceux de **Temiz et al. (2007)** , qui ont obtenu dans une étude similaire, une masse moléculaire apparente de 36 kDa pour une enzyme de coagulation partiellement purifiée. De plus, cette masse moléculaire apparente était en accord avec la longueur de la chaîne polypeptidique de la protéine mature_prédite XP_010709067 (337 acides aminés). L'enzyme mature affiche une masse moléculaire de 36 831,18 Da et un point isoélectrique de 4,37 (déterminé avec le programme ProtParam disponible sur (<https://www.expasy.org/proteomics>)). En comparaison, la chaîne mature de la pepsine bovine A (séquence de référence NCBI: NP_001001600) a une masse moléculaire plus faible de 34 646,02 Da (326 résidus d'acides aminés) et un point isoélectrique plus acide de 3,34.

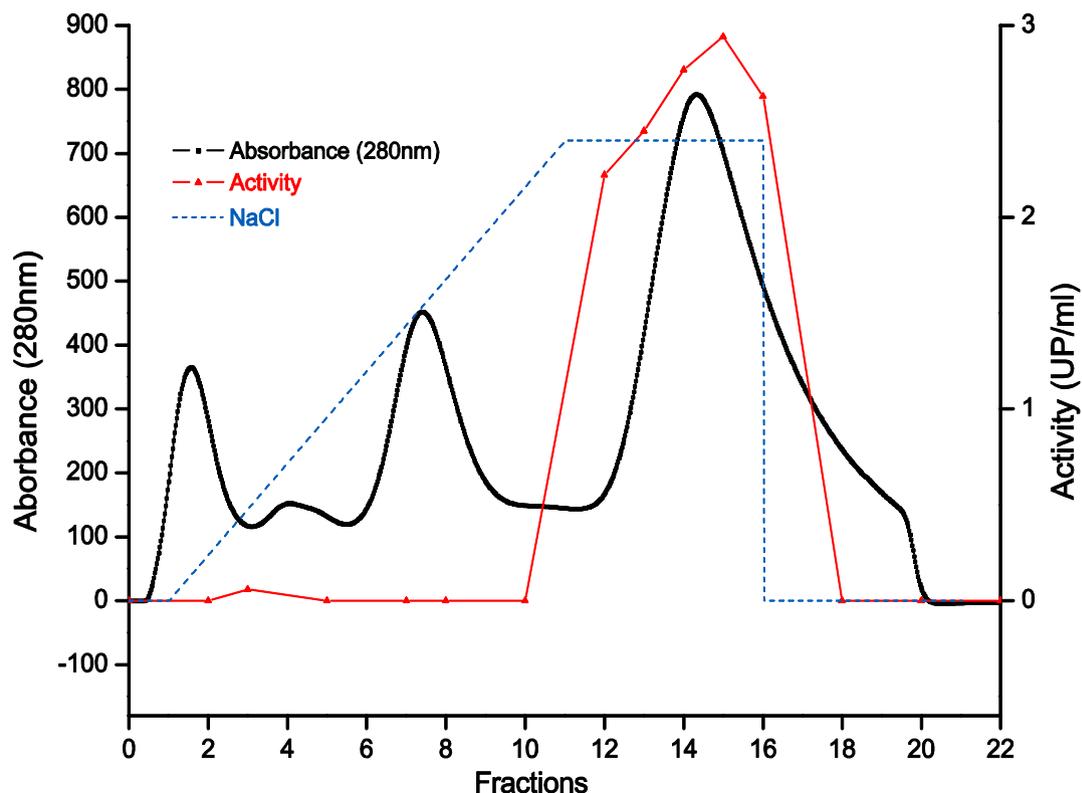


Figure 16 : Profil d'éluion sur colonne Hi-Trap SP-FF échangeuse de cations de l'extrait coagulant de proventricule de la dinde après précipitation au sulfate d'ammonium 50% de saturation. (FPLC AKTA Purifier), tampon d'éluion formiate de sodium (0,05 M, pH 3.5), gradient NaCl (0-0,5M), débit : 1 mL/mn, fraction : 1 mL). Absorbance 280nm (▪), Activité coagulante (UP/mL) (▲), NaCl-----

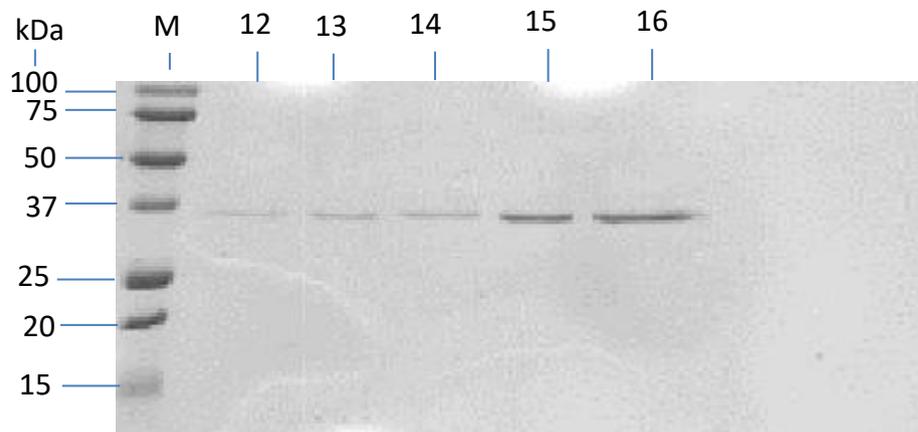


Figure 17 : Electrophoregramme des fractions coagulantes issues de la Hi-Trap SP-FF.

M : marqueurs protéiques, piste 12, 13, 14, 15,16 : fractions coagulantes

Les fractions coagulantes n° 12-16 ont été regroupées et dialysées avant une seconde étape de séparation par FPLC d'échange d'anions. Le profil chromatographique d'échange d'anions a révélé au moins sept pics distincts (**Figure 18**). Les fractions 22 et 23 éluées à NaCl 0,44 à 0,47 M et correspondent au pic majeur ont montré une activité de coagulation de 0,4 et 0,5 UP, respectivement, et affichée par SDS-PAGE une seule bande avec une masse moléculaire apparente de 36,5 kDa (**Figure 19**).

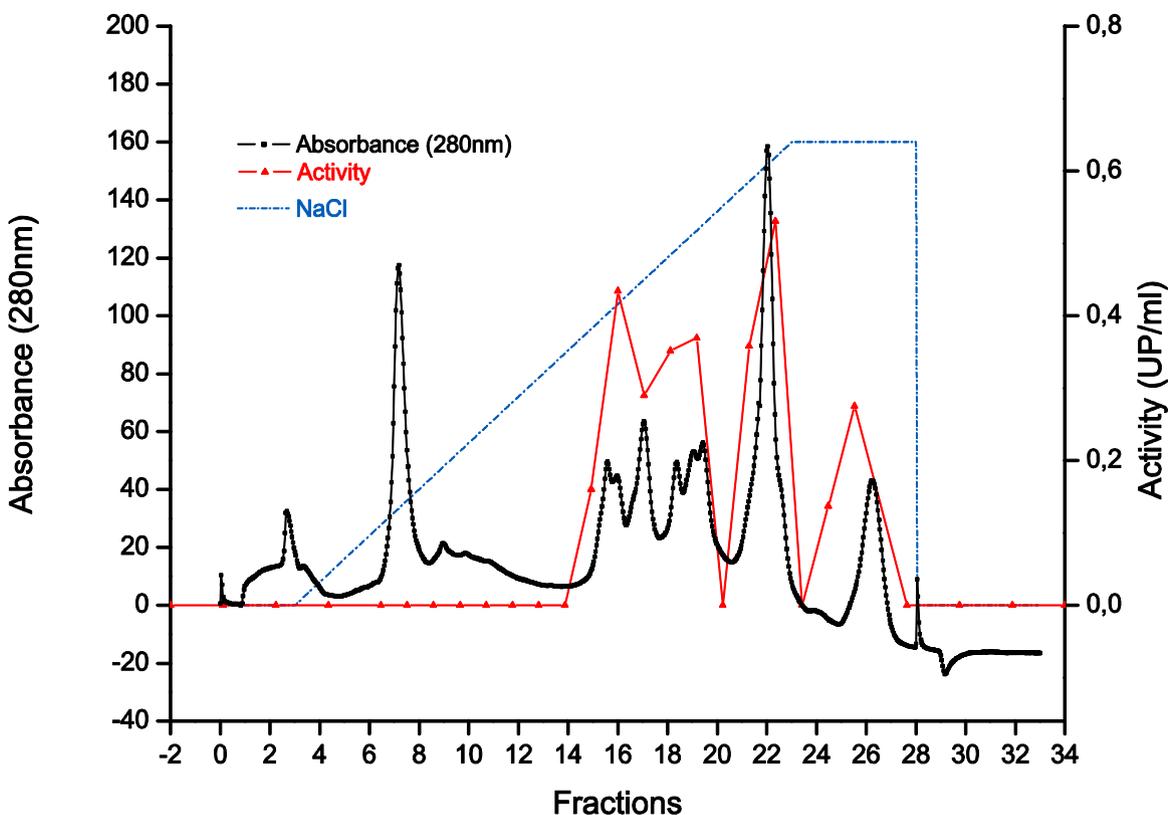


Figure 18: Profil d'éluion sur colonne Mono Q HR 5/5 échangeuse d'anions des fractions coagulantes (12, 13, 14,15 ; 16) dialysées sur membrane 8000Da contre le tampon tris HCl à pH 7. (FPLC AKTA Purifier), tampon d'éluion tampon Tris HCl 0,02 M, pH 7), gradient NaCl (0-0,5M), débit : 1 mL/mn, fraction : 1 mL). Absorbance 280nm (■), Activité coagulante (UP/mL) (▲), NaCl-----

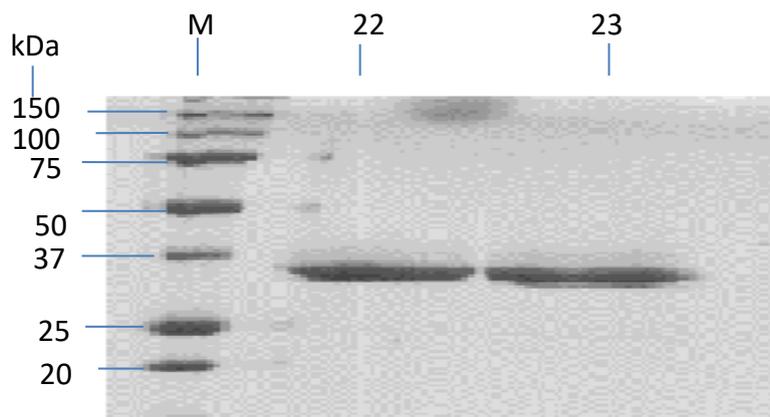


Figure 19 : Electrophoregramme des fractions coagulantes issues de la Mono Q HR 5/5.
M : marqueur protéique, piste 22 et 23 fractions coagulantes.

3. RP-HPLC des fractions obtenues par FPLC échangeuse de cations

Les fractions 12-16 recueillies à l'étape précédente de Chromatographie par échange de cations ont été séparées sur une colonne C18 à alésage étroit afin d'améliorer la purification de l'enzyme de coagulation de 36,5 kDa et de déterminer si une autre forme active d'enzyme de coagulation pouvait exister. Cependant, le profil chromatographique montre quatre pics parmi lesquels, seul le troisième pic au temps de rétention de 18,9 min, correspond à une fraction ayant une activité de coagulation de 0,1 UP (**Figure 20**).

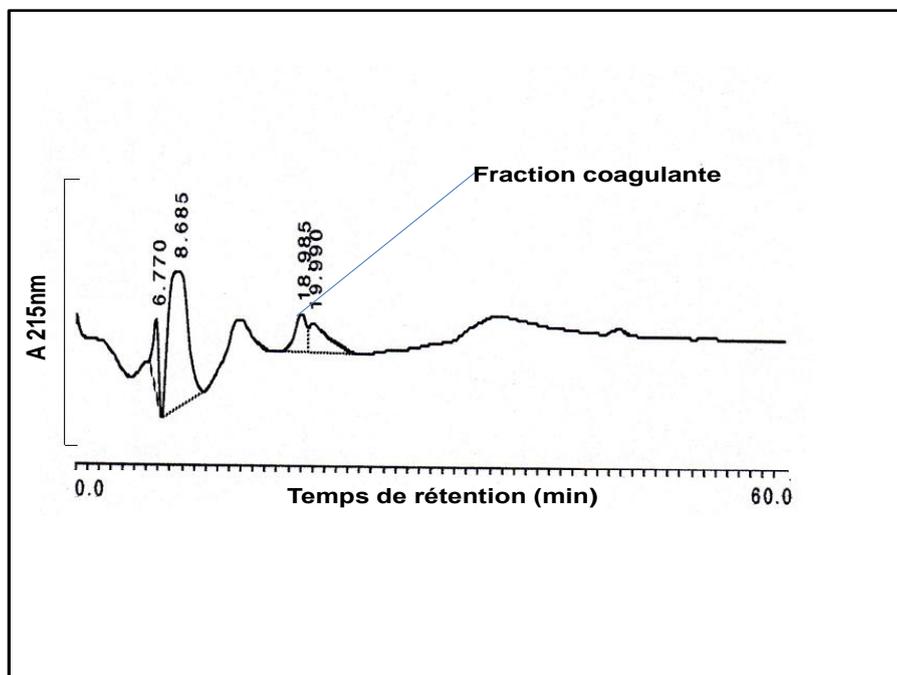


Figure 20: Profil chromatographique RP- HPLC de la fraction active obtenue par échangeuse de cations Hi-Trap SP-FF des fractions coagulantes (12 à16) de la protéase de dinde. Colonne C18 (220x2, 1), phase mobile: solvant A: Acétonitrile 2% Acide trifluoroacétique (TFA) 0,1%, solvant B : Acétonitrile 100% Acide trifluoroacétique (TFA) 0,1%, débit: 250 μ l/mn, détection a 215nm.

4. Caractérisation de l'extrait enzymatique purifié

Dans cette partie, nous avons déterminé les paramètres physico-chimiques d'activité de l'extrait coagulant de la dinde.

4. 1. Détermination de la température optimale d'activité de l'EEP

La **Figure 21** montre l'influence des différentes températures sur l'activité de l'EEP et de la présure. L'activité relative augmente avec la température de 30 à 55 ° C, puis diminue; Cependant, aucune activité n'a été détectée à 70 ° C. L'activité enzymatique de l'EEP coagulant le lait, extraite du proventricule de dinde, et de la présure est de 55 ° C et 50°C respectivement, la température optimale pour la présure de veau a été trouvée à 40 ° C (**Fox, 1969**). Ce paramètre étant d'une importance primordiale dans la fabrication du fromage (**Gordin & Rosenthal, 1978**).

La température optimale pour la coagulation du lait par la présure à pH 6,6 est de 45°C, et de 30-35°C pour la fermeté du gel. Le taux d'agrégation des micelles déstabilisées, augmente fortement avec l'augmentation de la température. (LUCEY, 2002a),

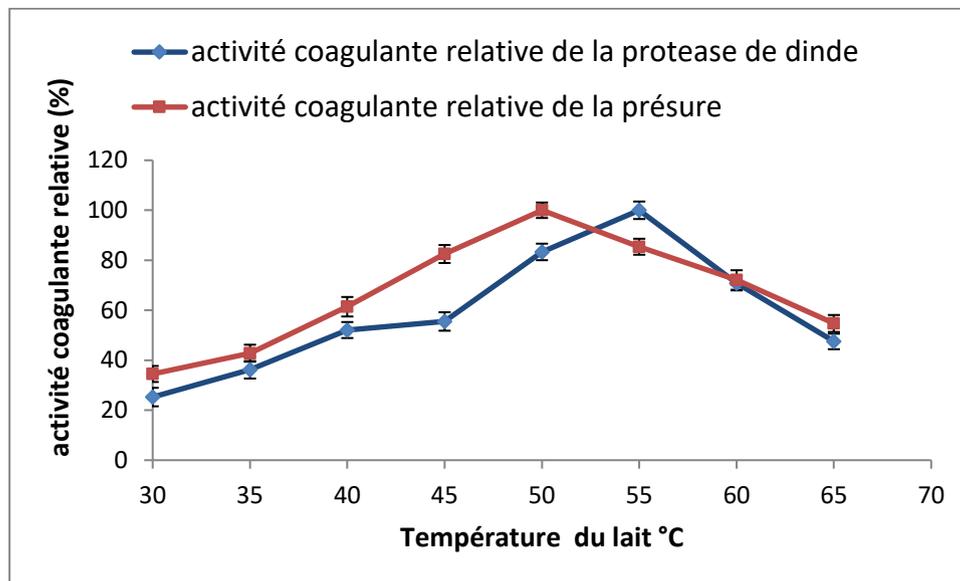


Figure 21 : Influence de la température sur l'activité de la protéase de dinde et de la présure commerciale

4.2. Détermination du pH optimal d'activité de l'EEP

L'activité coagulante la plus élevée de la protéase de dinde et de la présure commerciale est obtenue à pH 5,4 et 5,2 respectivement. Au-delà de pH 6, l'activité coagulante de la protéase de dinde et de la présure chute, et sont complètement inactivées à pH 7 (**Figure 22**).

Dans d'autres études similaires, le pH optimal d'activité coagulante du lait a été obtenu à pH 4,0 pour la pepsine de canard (**Pichová et Kostka, 1990**) et à pH 5,8 pour la présure de veau (**Fox, 1969**).

Selon **Gordin et Rosenthal (1978)**, l'acidité du lait a été reconnue comme l'un des paramètres critiques de la production fromagère.

L'adsorption de la chymosine sur la caséine **K** passe de 0 % au pH 7,0 à 90 % au pH 5,0. Cette augmentation d'adsorption entre enzyme et K-caséine due à la réduction du pH a pour effet d'accélérer le processus d'agrégation et de diminuer le temps de la coagulation (**Larsson et Andren 1997**),

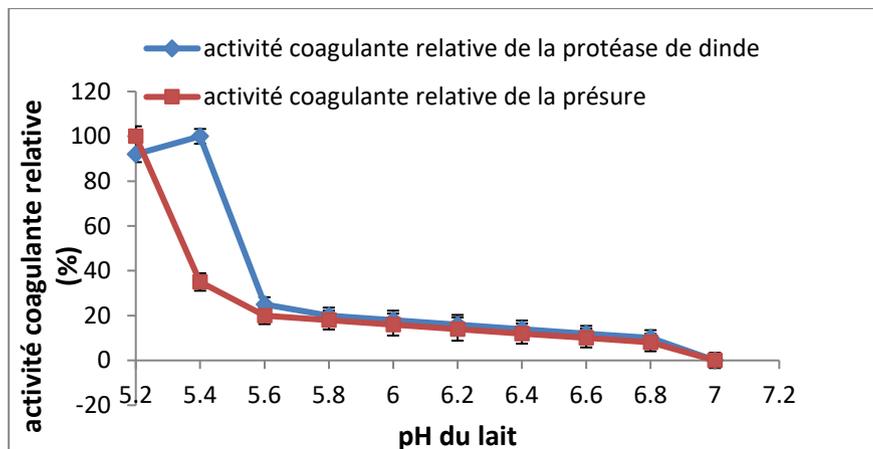


Figure 22 : Influence du pH sur l'activité de la protéase de dinde et de la présure commerciale

4.3. Détermination de la concentration optimale d'activité en CaCl_2

L'influence du calcium sur l'activité coagulante de la protéase de dinde des extraits purifiés de dinde et de la présure commerciale a été étudiée en faisant varier sa concentration dans le lait de 0,01 à 0,08 M.

Les résultats indiqués par la **Figure 23**, montrent que l'activité coagulante augmente avec la concentration en CaCl_2 du lait. Nous constatons que l'optimum d'activité pour la protéase de dinde et de la présure est obtenu à 0,04 M et 0,03 M respectivement. Au-delà de cette valeur, l'activité coagulante baisse par un effet inhibiteur de l'ion calcium, dans les deux cas (protéase de dinde et présure).

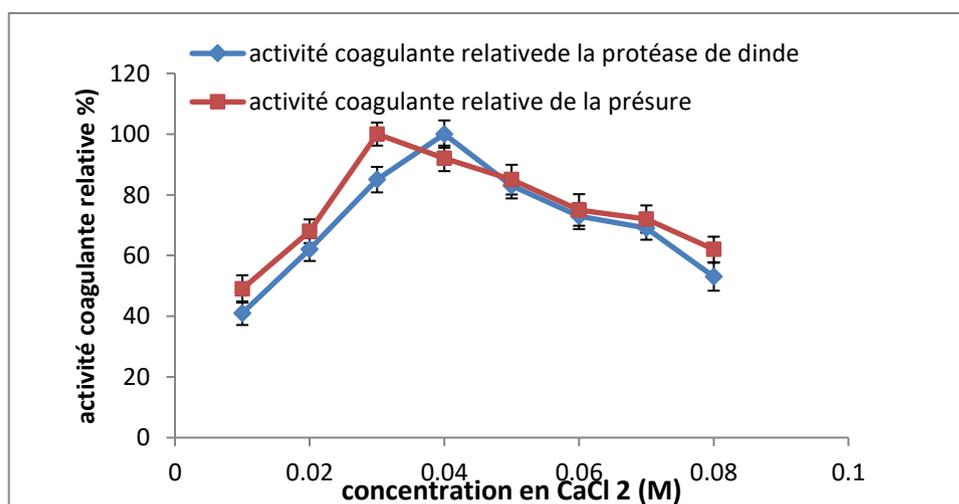


Figure 23 : Influence du CaCl_2 sur l'activité de la protéase de dinde et de la présure commerciale

D'après **Gordin et Rosenthal (1977)**, l'activité coagulante enzymatique dépend de la concentration du CaCl_2 . Ce facteur, à des concentrations élevées, réduit le temps de coagulation et par conséquent augmente significativement l'activité coagulante

Selon **Najera et al., (2002)**, et **Lagaude et al., (2004)**, l'addition du CaCl_2 réduit le pH du lait et donc accélère la réaction de l'hydrolyse. La phase secondaire semble également être influencée par la teneur en calcium du milieu. Cet ion pourrait induire une diminution du potentiel de surface micellaire, accélérant de ce fait, la vitesse d'agrégation des particules en entraînant une augmentation de la fermeté du coagulum.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Nouani et al. (2009)** pour la concentration en CaCl_2 0.04M pour la présure.

Garnot et Martin (1980) ont signalé que l'activité optimale pour la présure animale a été constatée pour une concentration en CaCl_2 de l'ordre de 0,02 M.

4.4. Stabilité de l'EEP à la conservation

L'estimation de la stabilité au cours de la conservation a été déterminée par l'entreposage de l'EEP à des températures distinctes de $+4^\circ\text{C}$ et -18°C , ceci pendant huit (08) semaines ou l'activité résiduelle est évaluée périodiquement chaque semaine.

Le mode de conservation à $+4^\circ\text{C}$, montre une baisse d'activité résiduelle à 25% pour la première semaine et se stabilise au cours de la 7^{ème} et 8^{ème} semaine avec une perte de 57% d'activité coagulante résiduelle. (**Figure 24**)

Nouani (2009), indique une baisse de 80.43% d'activité coagulante résiduelle au-delà de 21 jours de conservation à $+4^\circ\text{C}$ pour la pepsine purifiée de poulet.

La conservation de l'EEP à -18°C , indique une baisse d'activité résiduelle de 30% au bout de la 8^{ème} semaine.

Ait Amer Meziane (2008), signale une baisse d'activité résiduelle de 40% pour la pepsine de poulet vers la 4^{ème} semaine de conservation à -18°C .

Les mêmes résultats ont été obtenus par **Adoui (2007)**, qui a rapporté que L'extrait congelé de pepsine de poulet a conservé 72,3 % de son activité initiale, après 4 semaines de congélation à -18°C . Les résultats obtenus pour la conservation de l'EEP à -18°C , sont en accord avec ceux obtenus par **Adoui (2007)** et **Ait Amer Meziane (2008)**.

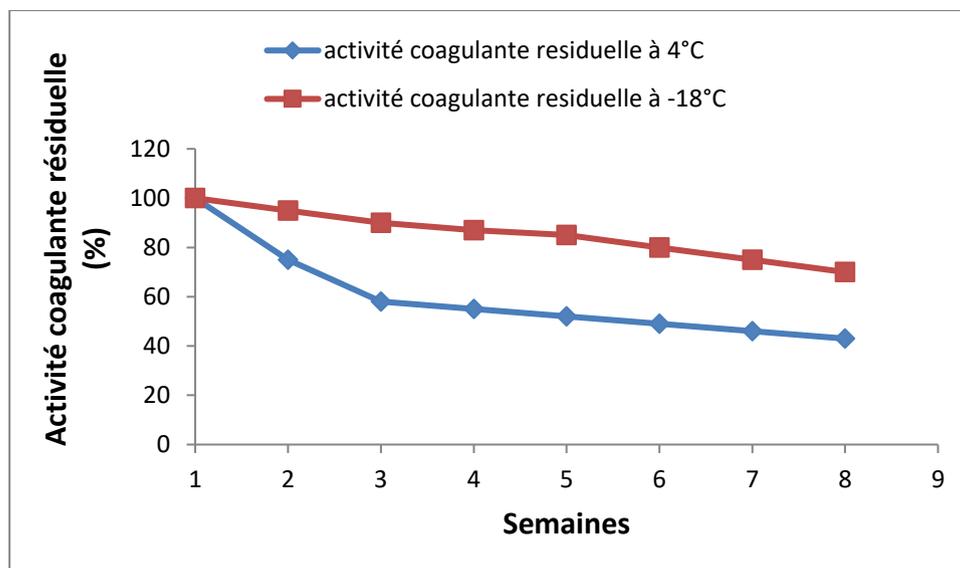


Figure 24 : Stabilité de l'EEP à la conservation à 4°C et -18°C

4.5. Effet de quelques effecteurs sur l'activité coagulante

L'effet d'un certain nombre d'inhibiteurs de protéase a été étudié pour élucider le type de protéase purifiée.

L'inhibition de l'activité coagulante de l'EEP a été examinée vis-à-vis de 3 effecteurs en l'occurrence : EDTA, 2-Mercaptoethanol et la Pepstatin A, les résultats sont rapportés dans le **tableau 22**.

Tableau 22: Effet des inhibiteurs sur l'activité coagulante l'EEP de dinde

Inhibiteur	Concentration (mM)	Activité enzymatique UP/mL	Activité résiduelle
Contrôle	0	453	100
2-Mercaptoethanol	5	400	88.3
EDTA	5	400	88.3
Pepstatin A	0.01	10	2.2

La **Figure 25**, montre que la pepstain A, est l'inhibiteur le plus puissant avec une activité résiduelle de 2.2% par rapport aux autres inhibiteurs, en l'occurrence EDTA et 2-Mercaptoethanol avec 88.3% d'activité résiduelle pour les deux inhibiteurs. **Yegin et Dekker, (2013)** indiquent, que toutes les protéinases aspartiques sont inhibées par la pepstatine, un peptide provenant d'espèces de Streptomyces

L'activité de la pepsine a été fortement inhibée par la pepstatine A, qui est un pentapeptide, capable d'interagir de façon non covalente avec le site actif de protéinases aspartiques, tandis

que l'EDTA, inhibiteur de la serine protéinase spécifique, à un l'effet négligeable sur l'activité de l'EEP. Par conséquent, les résultats ont confirmé que les inhibiteurs de l'enzyme purifiée de dinde appartiennent aux protéinases aspartiques.

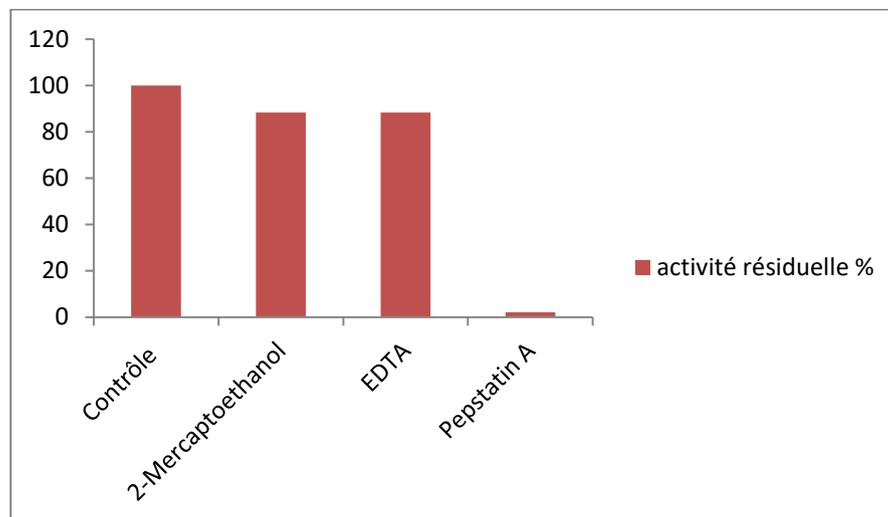


Figure 25 : Effet de quelques effecteurs sur l'activité coagulante de l'EEP de dinde

Nos résultats se rapprochent avec ceux obtenus par **Sitthipong et al (2010)** dans une autre étude similaire, avec une activité résiduelle de 5.27 % pour la pepstatin A et 96.26% pour l'EDTA.

III. Analyse de la séquence en acides aminés de l'enzyme pepsin-like de *Meleagris gallopavo*

La traduction du génome de *Meleagris gallopavo* présente deux séquences prédictives qui pourraient correspondre à des enzymes de type pepsine.

Le numéro de référence NCBI (National Centre for Biotechnology Information) pour ces séquences prédictives est **XP_010709067** et **XP_010709199**. Le premier est caractérisé par la présence d'un peptide signal Met¹-Gly¹⁷ et la présence d'un propeptide qui commence au résidu Ile¹⁸ et se termine à His⁴⁶, deux sites actifs prédits 93-96 et 276-278 (**Figure 26**). La deuxième séquence est caractérisée par la présence d'un seul site actif (région 64-66) (**figure 27**).

```

MMKLLLLLSL VALAQCGIHR IPLQKGKSLR KQLKEHGLE DFLKKHPYNP ASKYNPVLTA
                                propeptide
      70          80          90          100          110          120
TESYEPMTNY MDASYGTIS IGTPQQDFTV IFDTGSSNLW VPSVYCKSSA CSNHKLFNPS
                                Site catalytique
      130          140          150          160          170          180
KSSTYVSTNE TVYIAYGTGS MSGILGYDTV AVSSIDVKNQ IFGLSETEPG SFFYYCNFDG

      190          200          210          220          230          240
ILGLAFPSIS SSGATPVFDN MMSQDLVAQD LFSVYLSKDG ESGSFVLFGG IDPNYTTKGI

      250          260          270          280          290          300
HWVPLSAETY WQITMDRVTV GKKYVACFFT CQAIVDTGTSLV LLVMPQAYN RIIRDLGVNS
                                Site catalytique
      310          320          330          340          350          360
DGEISCDDIS KLPDVTFHIN GHAFTLPPSA YVLNEDGSCS LGFENMGTPT ELGEQWILGD

      370          380
VFIREYYVIF DRGNNKVGFS SLS

```

Figure 26 : Séquences prédictive d'acides aminés de pepsine A de dinde (*Meleagris gallopavo*), séquence de référence NCBI **XP_010709067**

```

MLQDSGVLGE LLLQQALSPA VKHRCTTME LLENYMDIFI DLDLSYVTTI SISTPAQQFS
      70      80      90      100      110      120
VIFDTGSANL WVPSVYCSP ACANRQRFNL ARSSTYCSTT ISMVTRYGTG SMVGVLAYDT
Site catalytique
      130      140      150      160      170      180
ITVGSIQVQN QMVGLSQWES GSFLIHMPFN GFLGLAFPRI ASSGATLLFD NMMSKGLEAQ
      190      200      210      220      230      240
DLFSIYLNDS ERNGSFVFFG GIDSSHFTGN LSLIPLTAQT YWQIKVDRIA MHGLPITCIH
      250      260      270      280      290      300
GCKAILDSGT SMLAGPGLSM RHIHYKMGAT HSPTDLVNGS CMSGFAYAL PMATDELWIL
      310      320
GNIFLRCYYS IFDRANSMVG LAPRCLRCG

```

Figure 27 : Séquences prédictive d'acides aminés de pepsine A-like de dinde (*Meleagris gallopavo*), séquence de référence NCBI: **XP_010709199**.

La séquence prédictive de l'enzyme pepsine A de *Meleagris gallopavo* **XP_010709067** a été comparée au programme BLAST disponible à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> à celle du précurseur de l'enzyme du poulet (*Gallus gallus*) **NP_990209** (Sakamoto et al., 1998) (Figure 28). L'alignement montre une identité d'acides aminés de 95%, suggérant que les enzymes pepsine A de la dinde et du poulet sont très proches, anticipant une relation séquence / structure élevée entre ces enzymes. D'un autre côté, l'alignement de l'enzyme pepsine-like de dinde **XP_010709199** avec celle du poulet montre cependant une identité d'acides aminés inférieure de 47% (Figure 29). L'alignement des séquences **XP_010709067** et **XP_010709199** avec la séquence partielle de la pepsine A du canard colvert (*Anas platyrhynchos*; numéro d'accès GenBank **EOA94711**) montre un même pourcentage d'identité en acides aminés de 53% pour les deux enzymes

(**Figure 30** et **Figure 31**) Selon les analyses de l'alignement de la séquence primaire des deux séquences de la pepsine A de dinde **XP_010709067** et pepsine-like de dinde **XP_010709199** , on pense que la séquence prédite **XP_010709067** semblait être la bonne, la seconde **XP_010709199** pourrait ne pas correspondre à une protéine exprimée.

```

Query 2 MKLLLLLSLVALAQC GIHR IPLQKGKSLRKQLKEHGLLEDFLKKHPYNPASKYNPVL TAT 61
      MKLLLLLSLVALAQC IHR+PL+KGKSLRKQLK+HGLLEDFLKKHPYNPASKY+PVL TAT
Sbjct 1 MKLLLLLSLVALAQC SIHRVPLKKGKSLRKQLKDHGLLEDFLKKHPYNPASKYHPVL TAT 60

Query 62 ESYEPMTNYMDASYYGTIS IGTPQQDFTVIFDTGSSNLWVPSVYCKSSACSNHKLFNPSK 121
      ESYEPMTNYMDASYYGTIS IGTPQQDFTVIFDTGSSNLWVPS+YCKSSACSNHK F+PSK
Sbjct 61 ESYEPMTNYMDASYYGTIS IGTPQQDFTVIFDTGSSNLWVPSIYCKSSACSNHKRFDP SK 120

Query 122 SSTYVSTNETVYIAYGTGSMGILGYDTVAVSSIDVKNQIFGLSETEPGSFFYYCNFDGI 181
      SSTYVSTNETVYIAYGTGSMGILGYDTVAVSSIDV+NQIFGLSETEPGSFFYYCNFDGI
Sbjct 121 SSTYVSTNETVYIAYGTGSMGILGYDTVAVSSIDVQNQIFGLSETEPGSFFYYCNFDGI 180

Query 182 LGLAFPSISSSGATPVFDNMMSQDLVAQDLFSVYLSKDGESGSEFVLFGGIDPNYTTKGIH 241
      LGLAFPSISSSGATPVFDNMMSQ LVAQDLFSVYLSKDGE+GSFVLFGGIDPNYTTKGI+
Sbjct 181 LGLAFPSISSSGATPVFDNMMSQHLVAQDLFSVYLSKDGETGSEFVLFGGIDPNYTTKGIY 240

Query 242 WVPLSAETYWQITMDRVTVGKKYVACFFTCQAIVDVTGTSLLVMPQGAYNRIIRD LGVNSD 301
      WVPLSAETYWQITMDRVTVG KYVACFFTCQAIVDVTGTSLLVMPQGAYNRII+DLGV+SD
Sbjct 241 WVPLSAETYWQITMDRVTVGNKYVACFFTCQAIVDVTGTSLLVMPQGAYNRIIKDLGVSSD 300

Query 302 GEISCDDISKLPDVTTFHINGHAFTLPPSAYVLNEDGSCSLGFENMGTPTELGEQWILGDV 361
      GEISCDDISKLPDVTTFHINGHAFTLP SAYVLNEDGSC LGFENMGTPTELGEQWILGDV
Sbjct 301 GEISCDDISKLPDVTTFHINGHAFTLPASAYVLNEDGSCMLGFENMGTPTELGEQWILGDV 360

Query 362 FIREYYVIFDRGNNKVGFSLS 383
      FIREYYVIFDR NNVG S LS
Sbjct 361 FIREYYVIFDRANNKVGLSPLS 382

```

Figure 28 : Alignement des séquences d'acides aminés de la pepsine A de dinde (*Meleagris gallopavo*) **XP_010709067** et du précurseur de la pepsine A de Poulet (*Gallus gallus*) **NP_990209**, effectuées avec le programme BLAST disponible à l'adresse <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Query	2	LQDSGVLGELLQALSPAVKHR----CTTTMELLENYMDIFIDLDSYVTTISISTPAQ	57
		L+D G+L + L + +PA K+ T + E + NYMD SY TISI TP Q	
Sbjct	32	LKDHGLEDLFLKHPYNPASKYHPVLTATESYEPMTNYMDA-----SYYGTISIGTPQQ	85
Query	58	QFSVIFDTGSANLWVPSVYCS SPACANRQRFNLARSSTYCSSTISMVTRYGTGSMVGVLA	117
		F+VIFDTGS+NLWVPS+YC S AC+N +RF+ ++SSTY ST ++ YGTGSM G+L	
Sbjct	86	DFTVIFDTGSSNLWVPSIYCKSSACSNHKRFDPKSSSTYVSTNETVYIAYGTGSMGILG	145
Query	118	YDTITVGSIQVQNMVGLSQWESGSEFLIHMPFNGFLGLAEPRIASSGATLLEDNMMKGL	177
		YDT+ V SI VQNQ+ GLS+ E GSF + F+G IGLAEP I+SSGAT +FDNMS+ L	
Sbjct	146	YDTVAVSSIDVQNIQIFGLSETEPGSFFYYCNFDGILGLAEP S I S SSGATPVFDNMMSQHL	205
Query	178	EAQDLFSIYLNSDERNGSFVFFGGIDSSHFTGNLSLIPLTAQTYWQIKVDRIAMHGLPIT	237
		AQDLFS+YL+ D GSFV FGGID ++ T + +PL+A+TYWQI +DR+ + +	
Sbjct	206	VAQDLFSVYLSKDGETG SFVLFGGIDPNYTTKGIYWPLSAETYWQITMDRVTVGNKYVA	265
Query	238	CIHGCKAILDSGTSMLAGPGLSMRHIHYKMGATH----SPTDL-----	276
		C C+AI+D+GTS+L P + I +G + S D+	
Sbjct	266	CFFTCQAI VDTGTSLLVMPQGAYNRIIKDLGVSSDGEI SCDDISKLPDVTFHINGHAFTL	325
Query	277	-----VNGSCMSGFEAYALPMATDELWILGNIFLRCYYSIFDRANSMVGLAP	323
		+GSCM GFE P E WILG++F+R YY IFDRAN+ VGL+P	
Sbjct	326	PASAYVLNEDGSCMLGFENMGTPTELGEQWILGDVFIREFYVIFDRANNKVGLSP	380

Figure 29: Alignement des séquences d'acides aminés Pepsine A prédictive (*Meleagris gallopavo*) XP_010709199 et précurseur de la pepsine A Poulet (*Gallus gallus*) NP_990209, effectuées avec le programme BLAST disponible à l'adresse <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

```

Query 77 GTISIGTPQQDFTVIFDTGSSNLWVPSVYCKSSACSNHKLFP SKSSTYVSTNETVYIAY 136
          G ISIGTP Q F V+FDTGSS+LWVPSV C S AC H+ F+P S+T+ +T + V I Y
Sbjct 1 GAISIGTPPQQFLVLFDTGSSDLWVPSVDCFS PACVGHFERFDPRLSATHQATGQP VSIQY 60

Query 137 GTGSMSGILGYDTVAVSSIDVKNQIFGLSETEPGSFFYYCNFDGILGLAFPSISSSGATP 196
          GTGSMSG+L YDTV V +I + NQ LS+ EPGSF + FDGILGLAFPSI+SSGA P
Sbjct 61 GTGSMSGVLAYDTRVVGNIQISNQAISLSKKEPGSFLTHHAFDGI LGLAFPSIASSGAVP 120

Query 197 VFDNMSQDLVAQDLFSVYLSKDGESGSFVLFGGIDPNYTTKGIHWVPLSAETYWQITMD 256
          VFDNMSQ LVA+DLFS+YLS +GSFV+ GG+D + + + W+PLSAETYWQI +D
Sbjct 121 VFDNMSQGLVAEDLFSIYLSKSRITG SFVMLGGMDSSCFSGRLRWIPLSAETYWQIAVD 180

Query 257 RVTVGKKYVACFFTCQAI VDTGTSLLVMPQGAYNRIIRD LGVNS----DGEISCDDISKL 312
          R+ + + VAC CQA+VD+GT LL P I R +G + +ISC L
Sbjct 181 RIIMRGRVVACPRGCQAVVDSGIMLLAGPPRDIATIQRHIGASEYPSGQYKISCR AKKSL 240

Query 313 PDVIFHINGHAFTLPPSAYVLN-EDGSCSLGFENMGIPTELGEQWILGDV FIREYXVIFD 371
          PD+ F I G F +P Y+ G C GFE++ PTEL WILG VF+R+YY +FD
Sbjct 241 PDIVFVIGGTFKFPVPAKTYIQIYLYGCKSGFESITV PTEL---WILGQVFLRQYYSVFD 297

Query 372 RGNNKVGFS 380
          R + +VG +
Sbjct 298 RAHRRVGLA 306

```

Figure 30 : Alignement des séquences d'acides aminés de la pepsine A (*Meleagris gallopavo*) XP_010709067 et la Séquence partielle de Pepsine A du canard colvert (*Anas platyrhynchos*) GenBank: EOA94711, effectuées avec le programme BLAST disponible à l'adresse <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

```

Query 50  ISISTPAQQFVIFDITGSANLWVPSVYCSSPACANRQRFNLARSSTYCSSTIISMVTRYGT 109
          ISI TP QQF V+FDITGS++LWVPSV C SPAC +RF+ S+T+ +T + +YGT
Sbjct 3  ISIGTPPQQFLVLFDTGSSDLWVPSVDFCFSPACVGHFERFDPRLSATHQATGQPVSIQYGT 62

Query 110 GSMVGVLAYDTITVGSIQVQNQMVGLSQWESGSFLIHMPFNGFLGLAFPRIASSGATLLF 169
          GSM GVLAYDT+ VG+IQ+ NQ + LS+ E GSFL H F+G LGLAFP IASSGA +F
Sbjct 63 GSMVGVLAYDTVVRVGNIQISNQAISLSKKEPGSFLTHMAFDGILGLAFPRIASSGAVPVF 122

Query 170 DNMMSKGLEAQDLFSIYLNSDERNGSFVFFGGIDSSHFTGNLSLIPLTAQTYWQIKVDRI 229
          DNMMS+GL A+DLFSIYL+S R GSFV GG+DSS F+G L IPL+A+TYWQI VDRI
Sbjct 123 DNMMSQGLVAEDLFSIYLSKSRITGSFVMLGGMDSSCFSGRLRWIPLSAETYWQIAVDRI 182

Query 230 AMNGLPITCINGCKAILDSGTSMLAGPGLSMRHIHYKMGATHSPT-----D 275
          M G + C GC+A++DSGT +LAGP + I +GA+ P+ D
Sbjct 183 IMRGRVVACPRGCQAVVDSGTMMLAGPPRDIATIQRHIGASEYPSGQYKISCRAKKSLPD 242

Query 276 LVN-----GSCMSGFEAYALPMATDELWILGNIFLRCYYSIFDRA 315
          +V G C SGFE+ +P ELWILG +FLR YYS+FDRA
Sbjct 243 IVFVIGGTFKFPVPAKTYIQQIYLYGCKSGFESITVPT---ELWILGQVFLRQYYSVFDRA 299

Query 316 NSMVGLAP 323
          + VGLAP
Sbjct 300 HRRVGLAP 307

```

Figure 31 : Alignement des séquences d'acides aminés de la pepsine A-like de dinde (*Meleagris gallopavo*) **XP_010709199** et la Pepsine A, partielle du canard colvert (*Anas platyrhynchos*) GenBank: **EOA94711**, effectuées avec le programme BLAST disponible à l'adresse <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

IV. Application de la pepsine de dinde : élaboration d'un fromage à pâte fraîche (petit suisse)

La fabrication du fromage à pâte fraîche type petit suisse a été réalisée à la laiterie Arib, groupe Giplait (Ain-defla), selon le diagramme technologique adopté par cette unité. Les essais sont menés à l'échelle pilote sur un volume d'environ 10 litres de lait de vache et de chèvre, en utilisant l'EEB dinde et présure.

1. Analyses physico-chimiques

Dans la première partie de notre travail, nous avons montré la variabilité du lait en fonction de certains paramètres de production.

Les laiteries utilisant, pour la fabrication de fromage un lait dit de grand mélange. Pour cela nous avons déterminé, préalablement, la composition du lait utilisé pour la fabrication du fromage avec la présure et son succédané, EEB de dinde.

1.1. Le lait

Les laits de chèvre et de vache sont caractérisés par des teneurs en protéines de 35.89 g/L et 33.85 g/L respectivement. Le taux de protéine est le reflet de la concentration en caséine qui intervient dans la coagulation du lait et le rendement en fromage (**tableau. 23**). Pour l'extrait sec et la matière grasse, il est requis pour certains fromages un taux minimum de « gras » sur extrait sec (G/S), qui est fixé, pour nombre d'entre eux, à 45%. Cependant, une trop grande quantité de matières grasses dans le lait peut limiter l'égouttage et diminuer la qualité du fromage. (**Zeller, 2005**).

Il est communément admis que le lait des races à faible potentiel laitier des zones méditerranéennes et tropicales sont, généralement, plus concentrés en MG, en EST et en protéines, que celui des races fortement productrices des régions tempérées (**Kouniba et al., 2007**).

Selon **Voutsinas et al. (1988)**, Le lait de races caprines indigènes présente une teneur en MG élevée.

Tableau 23 : Analyse physico-chimiques des laits de vache et de chèvre

paramètres	Lait de vache	Normes (AFNOR ,1986)	Lait de chèvre	Normes (FAO, 1995)
L'acidité (°D)	15.65±0.15	14-18	15±0.23	14-18
pH	6.5±0.26	6.5-6.8	6.55±0.51	6.45-6.60
Densité	1030.45±0.86	1028-1034	1032.30±0.26	1027-1035
Matière sèche(EST) (g/L)	121.5±0.35	120-130	138.70±0.19	136-140
(ESD) (g/L)	86±0.63	87	96.70±0.61	93-97
Matière grasse (g/L)	35.5±0.29	30-38	42±0.39	43
Protéines (g/L)	33.85±0.45	32-36	35.89±0.52	28-35

1.2. Les fromage à pâte fraîches

Les résultats présentés dans le **tableau 24**, montrent que les paramètres étudiés, concernant le fromage à pâte fraîche (MG, acidité, EST, ESD et protéines), sont conformes aux normes (**AFNOR, 1986**).

Tableau 24: caractéristiques physico-chimiques du fromage petit-suisse à base de lait cru de mélange de vache et de lait de chèvre.

Paramètres	Lait de vache		Lait de chèvre		Normes AFNOR, 1986
	Fromage fait avec l'EEB	Fromage fait avec la présure	Fromage fait avec l'EEB	Fromage fait avec la présure	
EST (g/Kg)	189±1.8	202±1.9	199±2.3	201±2.2	200-204
MG (g/Kg)	40	40	40	40	40
ESD (g/Kg)	149±1.7	162±1.8	159±1.9	163±1.8	160-164
Protéines (g/Kg)	33.85±0.6	33.65±0.8	35.80±0.4	35.75±0.9	32-36
pH	4.58±1.56	4,43±2.36	4.65±1.25	4.45±1.28	4,5-4,6
G/S (%)	21.16±1.6	19.80±1.9	20.10±1.8	19.90±1.7	20

*Nb : la matière grasse est standardisée

Les valeurs de l'extrait sec total pour le fromage à base de lait de vache est de 189 g/Kg et 202 g/Kg avec l' EEB et avec la présure respectivement, en revanche l'extrait sec total pour le lait de chèvre est plus élevé par rapport au lait de vache, avec 199 g/Kg et 201 g/Kg pour l'EEB et la présure respectivement (**Figure 32**).

Selon **Colin et al. (1992)**, l'augmentation de la teneur en MS des fromages, pour les fromages à TP élevé, est associée à une expulsion de lactosérum (exprimée en pourcentage par rapport à l'eau du lait mis en œuvre) plus faible en début d'égouttage.

Le TB (taux butyreux) étant peu variable d'un groupe à l'autre, cette diminution de la synérèse de début d'égouttage correspondrait à l'augmentation de la teneur en caséines pour les laits à TP (taux protéique) élevé.

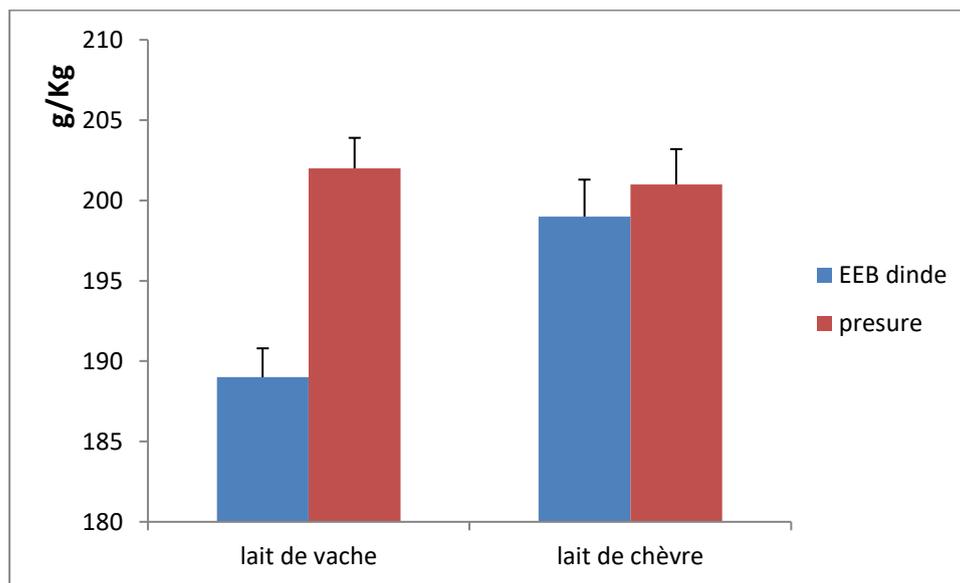


Figure 32 : Valeurs moyennes des EST du fromage (petit suisse) à base des laits de vache et de chèvre élaboré avec l'EEB et avec la présure

D'après le **tableau 24**, l'extrait sec total du fromage à pâte fraîche présente des valeurs proches des normes décrites par le guide **AFNOR (1986)**.

Les protéines représentent 33.85g/Kg et 33.65g/Kg pour le petit suisse issu de lait de vache, fabriqué avec L'EEB et avec la présure respectivement et 35.80g/Kg et 35.75g/Kg pour petit suisse issu à base de lait de chèvre obtenu avec L'EEB et la présure respectivement (**Figure 33**).

St-Gelais et al. 1999 in Boumendjel et al., (2017), indiquent que lors de la fabrication fromagère, c'est la caséine qui est la principal constituant du fromage, tandis que les protéines solubles restent dans le lactosérum. La transformation du lait en fromage par la présure ou autres enzymes, n'altère pas la qualité nutritive des protéines.

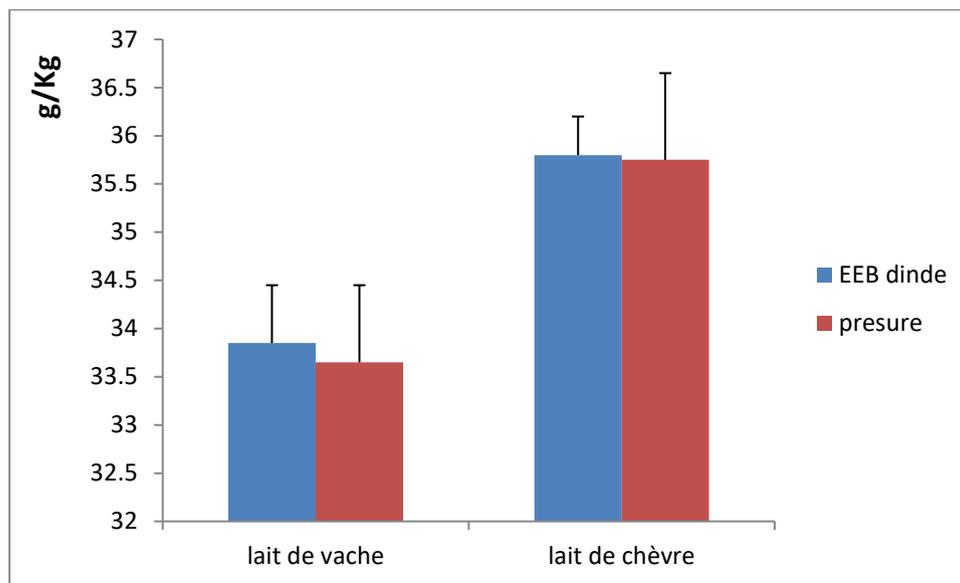


Figure 33 : Valeurs moyennes du taux protéique du fromage (petit suisse) à base des laits de vache et de chèvre élaborés avec l’EEB et la présure

Dans la pratique, le rapport Gras/Sec du fromage petit suisse est un paramètre clé qui nécessite un contrôle systématique pour une standardisation éventuelle. En effet, une forte teneur en matière grasse affecte négativement le déroulement de l’égouttage. La matière grasse du petit suisse est standardisée à 40g/L avec un gras/sec de 20%.

Selon **Fox in Kouniba et al. (2007)**, la composition chimique du lait, plus particulièrement les concentrations en caséines, MG, calcium et pH ont une influence majeure sur plusieurs aspects de la production fromagère, en particulier, l’aptitude à la coagulation par la présure, la fermeté du gel, l’aptitude à la synérèse ainsi que, la composition du fromage et le rendement fromager.

Les valeurs du pH des laits de vache et de chèvre sont respectivement de 6.5 et 6.55. Après ensemencement, le pH du lait diminue en fin de caillage (après 18h d’incubation). Cette diminution du pH s’accroît dans le temps pour atteindre des valeurs de 4.58 et 4.43 et de 4.65 et 4.45 pour les fromages, de lait de vache et de chèvre, élaborés respectivement avec l’EEB et la présure. Ceci s’explique par une acidification du milieu grâce à l’action des ferments lactiques qui transforment progressivement le lactose en acide Lactique (**Figure 34**).

Selon **Ramet, (1987)** les valeurs du pH d'un fromage frais obtenu à partir d'une acidification lactique varient entre 4.3 à 4.5. Ces valeurs sont en accord avec nos résultats pour les laits de vache et de chèvre.

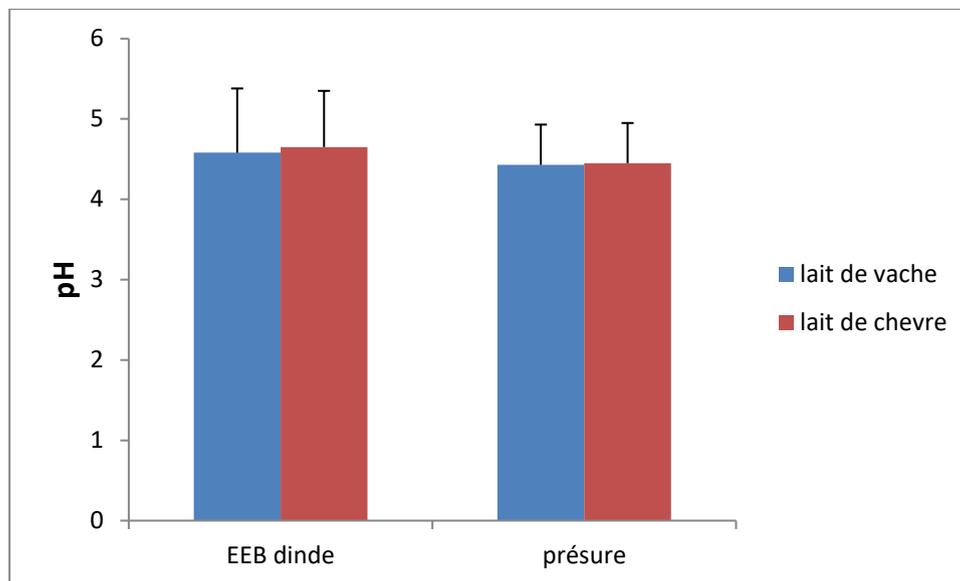


Figure 34 : Valeurs moyennes du pH du fromage (petit suisse) à base des laits de vache et de chèvre élaborés avec l'EEB et la présure

2. Analyses microbiologiques du lait et du fromage

2.1. Le lait

La qualité microbiologique du lait utilisé pour l'élaboration du fromage a été déterminée, les résultats sont rapportés dans le **tableau 25**

Tableau 25: Analyses microbiologiques de la matière première.

Germes	Lait de vache	Lait de chèvre	Normes (J.O.R.A N°35 du 27Mai 1998)
GAMT (10^5)	20	25	10^5 UFC/ml
Coliformes fécaux (10^3)	7	2	10^3 UFC/ml
Streptocoques fécaux (10^3)	Abs	Abs	abs/0,1ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abs	Abs	Abs/100ml
Clostridium sulfito- réducteurs	Abs	Abs	50

D'après les analyses microbiologiques effectuées sur le produit fini (pâte fraîche) élaboré avec la présure ou de d'EEB mentionné dans le **tableau 25**, indiquent une absence totale des germes pathogènes recherchés excepté des GAMT qui présentent une charge élevée en coliformes fécaux, qui ne dépassent pas le seuil d'acceptabilité. Ceci implique que le fromage obtenu est conforme aux normes (**J.O.R.A N°35 du 27Mai 1998**).

2.2. Analyses microbiologiques du Fromage

La qualité microbiologique du fromage a été déterminée, les résultats sont rapportés dans le **tableau 26**.

Tableau 26 : qualité microbiologique du fromage

Germes	Fromage fait avec présure		Fromage avec L'EEC		Norme (J.O.R.A N°35 du 27Mai 1998)
	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait de vache	Lait de chèvre	
Coliformes totaux	45	86	29	57	100
Coliformes fécaux	5	3	8	4	10
Streptocoque Fécaux	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Clostridium S/R	0	0	0	0	0
Salmonelles	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
<i>Staphylococcus Aureus</i>	0	0	0	0	0
Leveurs	0	0	0	0	0
Moisissures	0	0	0	0	0

Selon les normes indiquées au **tableau 26**, et d'après les résultats d'analyses, on note l'absence totale de germes pathogènes : streptocoques fécaux, *Staphylococcus aureus*, Salmonelle, levures et moisissures dans le produit fini. Néanmoins le nombre de coliformes totaux et fécaux présentent une charge acceptable.

3. Rendement fromager

Le principe est basé sur la mesure de l'extrait sec dégraissé (ESD) retrouvé dans le fromage. Selon **Eck (1990)**, le rendement fromager s'exprime par la formule suivante :

$$\text{coefficient} = \frac{10 \times \text{ESD} \times \text{P}}{\text{V}} \quad (3)$$

Avec :

P : poids de fromage obtenu en Kg.

V : quantité de lait mise en œuvre en L

ESD : extrait sec dégraissé du fromage (ESD= EST-MG)

Les résultats relatifs au rendement fromager, indiquent qu'il est plus élevé pour les fromages à base de lait de chèvre obtenu avec l'EEB (17.25%) et la présure (17.35%). Pour les agents coagulants EEB et présure, le rendement pour les fromages à base de lait de vache n'est que 14,30% et 15,7% respectivement (**Figure 35**).

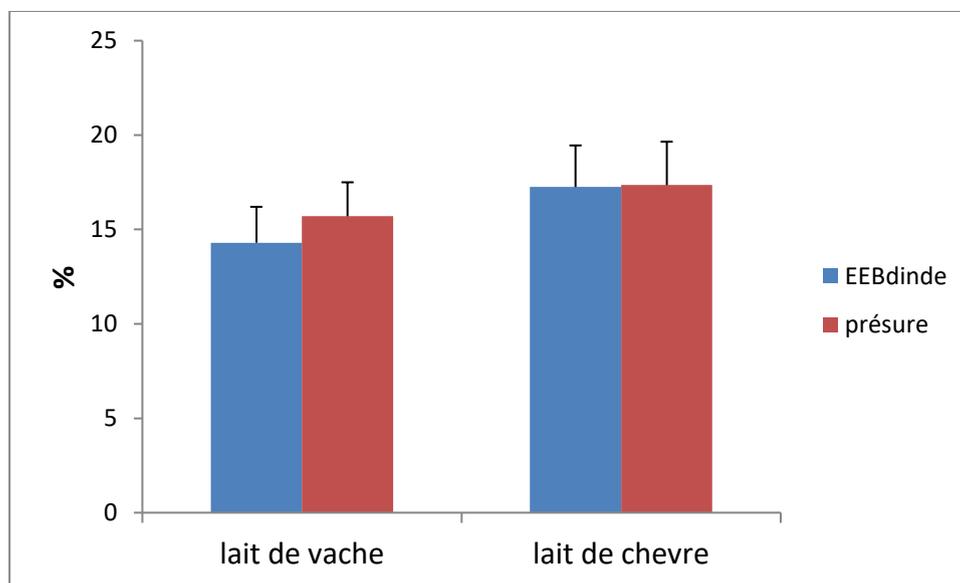


Figure 35: Valeurs moyennes des rendements en fromages obtenus à partir des laits de vache et chèvre avec les agents coagulants EEB dinde et présure

Les rendements obtenus en fromage sont en faveur de la teneur élevée en protéines. En effet, le lait de chèvre est plus riche en protéines que le lait de vache.

Par ailleurs, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Kouniba et al. (2007)** dans une étude similaire.

Selon **Colin et al. (1992)**, les teneurs en protéines et en matière grasse permettent d'expliquer 77% des variations du rendement fromager frais.

Un bon rendement nécessite un taux élevé en extrait sec et plus précisément en protéines (caséine) et des concentrations élevées en matière grasse (**Macedo et al., 1993 in Nouani, 2009**)

D'après **Remeuf et al. (1991)**, le coefficient de récupération de la matière sèche semble plus particulièrement influencé par les paramètres qui conditionnent l'aptitude à la coagulation par la présure, à savoir la teneur en caséines, les proportions de caséines α_S , le degré de minéralisation calcique des micelles et leur diamètre moyen.

En effet, l'augmentation de cet extrait sec a un intérêt dans la structure et l'équilibre minéral en réduisant la forte stabilité du lait et permet d'obtenir un caillé plus ferme, ce qui conduit à une diminution des pertes en matière sèche dans le lactosérum.

Selon **Evette (1975)**, le traitement thermique conduit à des interactions entre caséine et protéines du sérum ou entre les protéines du sérum elles-mêmes, cela fait précipiter ces protéines avec les caséines et augmente le rendement fromager.

Toutefois, selon **Ramet (1985)**, la moyenne en rendement pour les fromages à pâte fraîche est situé entre 12 et 14kg /100L de lait ce qui n'est pas très loin des rendements obtenus avec les fromages préparés à base d'extraits coagulants bruts EEB et de la présure.

4. Analyses sensorielles du fromage

La qualité sensorielle des fromages dépend d'un grand nombre de facteurs liés, à la fois à la technologie de fabrication et aux caractéristiques chimiques et microbiologiques, de la matière première mise en œuvre. Ces dernières dépendent elles-mêmes de nombreux facteurs d'amont (d'origine génétique, physiologique, alimentaire...). Ces facteurs d'amont sont de plus en plus au centre des préoccupations des consommateurs qui s'interrogent en particulier sur l'alimentation offerte aux animaux. (**Coulon et al., 2005**).

Les fromages des laits de vache et de chèvre ont été présentés de façon anonyme à un jury de dégustation, interrogé sur les caractères de la pâte : l'aspect, la texture, la couleur et le goût des quatre (04) types de fromages qui ont été notés sur une échelle de 10 (**Figure 36**).

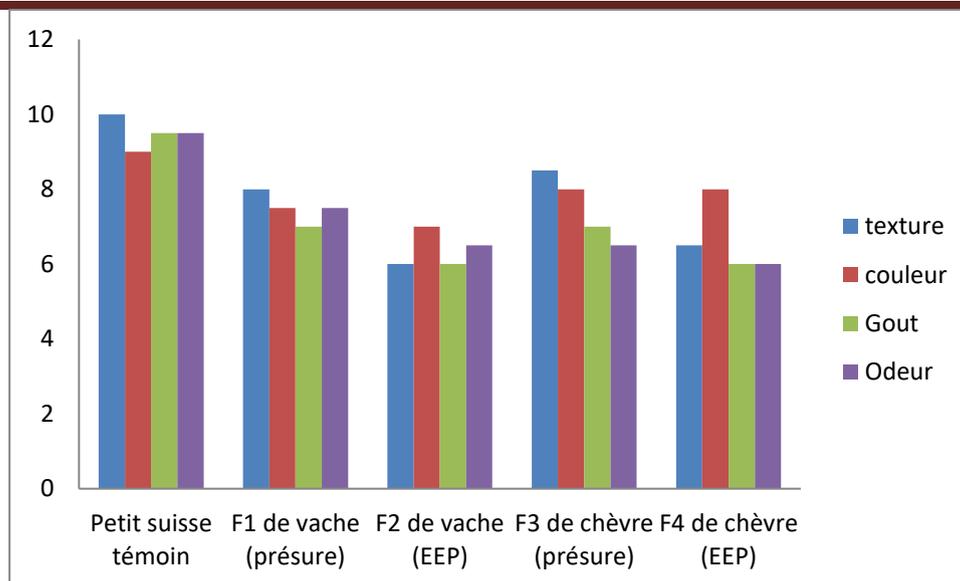


Figure 36: Valeurs moyennes d'appréciation de la texture, de la couleur, du goût et de l'odeur des fromages à base de lait de vache et de chèvre

Pour les deux fromages obtenus à partir du lait de vache, les panelistes ont remarqué :

- ✓ Pour le fromage de vache coagulé par l'extrait enzymatique purifié de dinde (EEB) 65% du jury lui ont attribué une couleur légèrement jaunâtre, 60% du jury ont remarqué un aspect lisse avec texture crémeuse.

70% du jury ont ressenti un arrière-goût d'amertume et une odeur de crème.

- ✓ Pour le fromage de vache coagulé par la présure, 80% des panelistes l'ont trouvé lisse avec une texture onctueuse et ferme.

70% du jury lui ont attribué une couleur légèrement jaunâtre, 60% du jury lui ont trouvé un goût légèrement acide avec goût de laitage.

Pour les deux fromages obtenus à partir du lait de chèvre, les panélistes ont remarqué :

- ✓ Pour le fromage de chèvre coagulé par la présure, 85% du jury lui ont attribué un aspect lisse et une texture pâteuse et ferme, 60% des panélistes ont ressenti une odeur de chèvre, 40% du jury lui ont trouvé un goût légèrement acide.

- ✓ Pour le fromage de chèvre coagulé par l'extrait enzymatique pur de dinde (EEB),

80% du jury ont constaté une texture granuleuse, 70% du jury l'ont trouvé d'un goût légèrement amer avec une odeur de chèvre.

Tableau 27 : Analyse sensorielle des fromages frais à base d'EEB de dinde et de présure

Désignation	texture	couleur	Gout	Odeur
Petit suisse témoin	10	9	9.5	9.5
Fromage frais de vache à base présure	8	7,5	7	7,5
Fromage frais de vache à base (EEB dinde)	6	7	6	6,5
Fromage frais de chèvre à base présure	8,5	8	7	6,5
Fromage frais de chèvre à base (EEB dinde)	6,5	8	6	6

Discussion

La qualité sensorielle des fromages dépend d'un grand nombre de facteurs, liés à la fois, à la technologie de fabrication et aux caractéristiques chimiques et microbiologiques de la matière première mise en œuvre. Ces dernières dépendent elles-mêmes de nombreux facteurs d'amont (d'origine génétique, physiologique, alimentaire...) (**coulon et al., 2005**).

Les fromages de chèvres se caractérisent par une couleur blanche qui est due à l'absence de la beta carotène dans le lait de chèvre, par contre le fromage de vache présente une couleur légèrement jaunâtre due à la présence de la beta carotène dans le lait de vache. Dans une autre étude **Coulon et al. (2005)**, indiquent que l'alimentation en maïs conduit à des fromages plus blancs, légèrement plus fermes et globalement moins appréciés des dégustateurs. Des résultats récents montrent que le foin de luzerne, comparativement à l'ensilage de maïs, conduit à des fromages ayant une flaveur plus intense.

Le goût léger d'amertume observé pour les deux fromages, de chèvre ou de vache, est dû probablement à la protéolyse excessive de l'extrait enzymatique purifié de dinde (EEP), contrairement à la présure commerciale qui donne un fromage de gout de laitage acceptable par le jury.

Selon **Corredig et Salvator (2016)**, l'activité protéolytique élevée se traduira par la production de peptides de petite et moyenne taille, qui donnera des goûts amères ou désagréables au fromage et réduiront le rendement.

En analyse sensorielle, l'odeur des fromages issus de laits en début et en fin de lactation est moins agréable que celle des laits en milieu de lactation. Les fromages de laits en fin de lactation sont plus fondants et moins fermes que ceux de laits en début ou en milieu de lactation. Leur goût est plus intense et plus persistant. A la dégustation, ils sont moins appréciés que les autres. Ces différences sont liées à une protéolyse accrue dans les fromages fabriqués avec des laits de lactation tardive. (**coulon et al., 1998**)

Heil et Dumont, (1993) ont rapporté que pour le fromage de chèvre, le stade de lactation plus avancé fait apparaître des différences sur la fermeté et le «goût chèvre»

Les caractéristiques sensorielles des fromages, et en particulier leur texture, ont varié sensiblement selon la nature des fourrages consommés (**Bugaud et al., 2002**).

Quand les laits sont plus riches en plasmine, la protéolyse primaire des fromages est plus forte, avec pour conséquence une moindre résistance mécanique et une moindre élasticité de ces fromages, due à des modifications de la matrice protéique. Par ailleurs, plus les laits sont riches en acides gras insaturés moins la résistance mécanique des fromages est forte, car la présence de ces acides gras augmente la fluidité de la matière grasse (**Hurtaud et al., 2001**).

Par ailleurs, **Bugaud et al. (2001b)** ont observé que le pH du lait à l'emprésurage lié au type de pâturage, influence la texture des fromages d'abondance.

La composition des protéines du lait est un facteur primordial dans la texture du lait. En effet l'aptitude à la coagulation du lait dicte les qualités de texture du fromage. Cependant la qualité et le type des caséines produites ne semblent pas liés au type d'alimentation, mais plutôt à la génétique (**Voisin, 2010**). En effet, dans d'autres études **coulon et al., (2005)**, ont rapporté que les fromages issus de vaches Holsteins ont été moins fermes et plus fondants que ceux issus de vaches Montbéliardes en raison du rapport gras/sec plus élevé, ce qui est lié à un rapport taux butyreux/taux protéique supérieur chez les Holsteins.

D'autres part, la relation entre la teneur en acides gras longs insaturés et la déformation à la fermeté du fromage montre, en effet, une relation étroite entre les deux paramètres. Plus il y a d'acides gras longs insaturés dans la composition du fromage, plus la déformation à la fracture (autrement dit la fermeté) est faible (**Bugaud et al., 2002**)

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

L'objectif de ce travail a consisté, d'une part à évaluer la variabilité de la composition du lait en fonction de quelques facteurs de production en l'occurrence la race et l'alimentation. Et d'autre part examiner la possibilité d'exploiter les sous-produits de volaille (dinde) comme source potentielle et alternative d'obtention de succédanés de présure.

- les différences des taux protéique et butyreux sont dues à la fois aux facteurs race et alimentation. Les résultats obtenus montrent que, pour tous les constituants analysés, le lait de Holstein est en moyenne plus riche en matière grasse et moins riche en protéines que le lait de Montbéliarde. Ces variations dues à la race sont réduites par rapport à celles dues à l'alimentation. Ainsi, le taux protéique, légèrement réduit, est moins influençable par le changement de l'alimentation que le taux butyreux.

- Le profil en acides gras, indique que les acides gras saturés était plus élevé chez la race Montbéliarde, pour **AGSCMC** et **AGILC**, comparativement à la race Holstein pour les acides gras court et moyenne chaîne saturés **AGSCMC** et des acides gras à longue chaîne insaturé **AGILC**.

Par ailleurs les acides gras insaturés à longues chaînes, l'acide oléique (C18:1), présente le pourcentage le plus élevé pour le lait des deux races par rapport aux autres acides gras insaturés avec un pourcentage de 21.37% en faveur de la Montbéliarde contre 17.86% pour la Holstein.

L'alimentation influence significativement la composition physico-chimique du lait, en effet l'ajout du bersim et de l'orge au régime alimentaire, à base de foin et de concentré a conduit à la modification importante des paramètres physico-chimiques du lait, en particulier l'EST (+14.4g/L) du lô expérimental par rapport au témoin qui est hautement significatif ($P < 0,01$). De même le taux de matière grasse et de protéines présentent des résultats significatifs ($P < 0,05$).

L'alimentation a un effet sur les acides gras saturés à longues chaînes par une diminution de 1.17% du lô expérimental par rapport au lô témoin. En revanche, le taux d'acides gras insaturés à longues chaînes présente une augmentation de 2% du lot expérimental par rapport à celui du lô témoin, ceci s'explique par l'effet de l'apport du fourrage vert (bersim) et de l'orge à l'alimentation.

L'extrait brut de la protéase de dinde *Meleagris gallopavo*, a été purifié pour la première fois à partir du proventricule de dinde par précipitation avec le sulfate d'ammonium à un taux de saturation de 50%, avec un rendement de purification de 29%. La chromatographie liquide des

Conclusion générale

protéines rapide (FPLC) sur colonne mono S échangeuse de cations Hi-Trap SP-FF, a montré une activité coagulante des fractions 12-16 éluées avec NaCl 0,4 à 0,5 M et correspondant aux matériaux (protéines inactives) les plus fortement adsorbés sur la colonne (quatrième pic).

Les fractions actives ont été analysées par SDS-PAGE, qui a révélé une bande unique avec une masse moléculaire apparente de 36,5 kDa en accord avec la chaîne polypeptidique de la protéine mature prédictive XP_010709067 (337 acides aminés). L'enzyme mature affiche une masse moléculaire de 36 831,18 Da et un point isoélectrique de 4,37 (déterminé avec le programme ProtParam disponible sur <https://www.expasy.org/proteomics>)

Le profil chromatographique d'échange d'anions (mono Q), a révélé que les fractions 22 et 23 éluées par NaCl et correspondant au pic majeur caractérisé par une activité de coagulation de 0,4 et 0,5 UP/mL respectivement, l'électrophorèse SDS-PAGE fait apparaître une seule bande caractérisée par une masse moléculaire apparente de l'ordre de 36,5 kDa.

Les fractions obtenues par chromatographie échangeuse de cations ont été séparées par HPLC inverse, afin d'améliorer la purification de l'enzyme coagulante. Cependant, le profil chromatographique montre quatre pics parmi lesquels seul le troisième pic au temps de rétention de 18,9 min correspond à une fraction ayant une activité de coagulation de 0,1 UP/mL.

Les variations des facteurs, température, pH et concentration en CaCl_2 sur la protéase coagulante ont été étudiées. Les optima de température, de pH et de concentration en CaCl_2 , étaient de 55 °C, 5,4 et 0,04 M respectivement.

L'étude de l'aptitude à la coagulation du lait de vache et de chèvre, par la protéase purifiée sur la fabrication d'un fromage à pâte fraîche type (petit suisse) est en faveur de lait de chèvre.

Les protéines représentent 33.85 g/Kg et 33.65 g/Kg pour le petit suisse à base de lait de vache, élaboré avec L'EEP et la présure respectivement et de 35.80 g/Kg et 35.75 g/Kg pour petit suisse à base de lait de chèvre élaboré avec L'EEP et la présure respectivement.

Les résultats relatifs au rendement fromager, indiquent qu'il est plus élevé pour les fromages à base de lait de chèvre obtenu avec l'EEP (17.25%) et la présure (17.35%). Pour les agents coagulants EEP et présure, le rendement pour les fromages à base de lait de vache n'est que 14,30% et 15,7% respectivement

Conclusion générale

Les rendements en fromage sont en faveur de lait de chèvre, ceci s'explique par la teneur élevée en protéines et en extrait sec. Un bon rendement nécessite un taux élevé en extrait sec et plus précisément en protéines (caséine) et en matière grasse.

Le lait influe sur la qualité sensorielle des fromages. Les fromages fabriqués à partir du lait de chèvre présentent des caractéristiques agréables comparées à celles des fromages à base de lait de vache. Pour les fromages frais, le diagramme de fabrication adopté ne permet pas une appréciation sensorielle correcte à cause de l'absence de l'affinage. Toutefois, les propriétés organoleptiques des fromages sont en faveur du fromage à base de lait de chèvre qui enregistre une qualité appréciable par le jury de dégustation par rapport au fromage à base de lait de vache.

Des recherches futures relatives à la caractérisation moléculaire de l'enzyme coagulante doivent être initiées pour mieux élucider les différents aspects de la pepsine de dinde, à savoir :

- ✓ l'optimisation des conditions d'extraction pour améliorer le rendement
- ✓ la purification des fractions coagulantes par zymographie
- ✓ Séquençage des fractions coagulantes.

Cependant, le pouvoir coagulant du lait par l'enzyme du proventricule de dinde le prédispose à une utilisation favorable dans la fabrication du fromage et constitue une source potentielle pour la production de succédanées de la présure.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Adoui F., (2007). Extraction d'enzyme coagulant le lait à partir de proventricules de poulet. Thèse de magister en Biochimie et technologies alimentaires, INATAA, Univ. Constantine p 67.

AFNOR, (1986). Contrôle de la qualité des produits laitiers : analyses physico – chimiques. Ed. : 3. AFNOR, ITSV, 1030 p.

AFNOR, (2000). Corps gras et produits dérivés (Tome 1). AFNOR, ITSV, 643 p.

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

Agabriel C., Coulon J.B., Marty G., Bonaïti B., (1993). « Facteurs de variation de la composition chimique du lait dans des exploitations à haut niveau de production. » INRA Prod. Anim., 6, 53-60.

Agabriel C., Coulon J.B., Brunshwig G., Sibra C., Nafidi C., (1995). Relations entre la qualité du lait livré et les caractéristiques des exploitations. INRA Prod. Anim., 8 (4), 251- 258.

Ait Amer Meziane L., (2008). Aptitude des laits de chèvre et de brebis à la coagulation par des protéases d'origine avicole poulet(Gallus gallus) et aquatique : Limon (Seriola sp).p58 mémoire de Magister INA Alger.

Alais C., (1984). Science du lait : principes et techniques laitiers. Techniques et Documentation – Lavoisier, Paris, p814.

Alais C., Linden G., Miclo L., (2003). Biochimie alimentaire : Abrégé. Dunod, Paris, p 250.

Alamargot J., (1982). Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaires. Edition du point.15-129.

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

Bauman D.E., Griinari J.M., (2001). “Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome.” Livestock Production Science, V.70, 15-29.

Beigomi M., Mohammadifar M. A., Hashemi M., Rohani M. G., Senthil K., Valizadeh M., (2014). Biochemical and rheological characterization of a protease from fruits of

Withania coagulans with a milk-clotting activity. *Food Science and Biotechnology*, 23, 1805–1813.

Beka R., (2011). « Une alternative végétale en fromagerie : préparation d'un extrait coagulant à partir des fruits de balanites, étude biochimique et application technologique thèse de doctorat université Lille I. France.p8.

Beka R.G., Krier F., Botquin M., Guiama V.D., Donn P., Libouga D. G., Vercaigne-Marko D., (2014). Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. *International Dairy Journal*, 34, 25–31.

Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P., (2009). *Food chemistry*. 4ème Ed Springer Verlag Berlin, P.1070.

Benyahia-Krid F. A., (2013). Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des proventricules de volailles au profit de la filière lait en Algérie.Thèse.doct.INATAA.Univ.constantine1.p20.

Benyahia-Krid F. A., Adoui F., Aissaoui-Zitoun O., Boughellout H., Siar E.-H., Zikiou A., Zidoune M. N., (2017). Effect of sodium chloride and incision on the chicken pepsin coagulant activity extracted from proventriculus, dried under partial vacuum. *Advances in Dairy Research*, 5, 3.

Berridge N. J., (1945). The purification and crystallization of rennin. *The Biochemical Journal*, 39, 179–187.

Bohak Z., (1969). Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 4638–4648.

Boichard D., Govignon-Gion A., Larroque H., Maroteau C., Palhière I., Tosser-Klopp G., Rupp R., Sanchez M.-P., Brochard M., (2014). Déterminisme génétique de la composition en acides gras et protéines du lait des ruminants, et potentialités de sélection *INRA Prod. Anim.*, 27 (4), 283-298.

Bony J., Contamin V., Gousseff M., Metais J., Tillard E., Juanes X., Decruyenaere V., Coulon, J.B., (2005). Facteurs de variation de la composition du lait à la Réunion. *INRA Prod. Anim.*, 18 (4), 255-263.

Boumendjel M., Feknous N., Mekideche F., Dalichaouche N., Feknous I., Touafchia L., Metlaoui N., Zenki R., (2017). Caractérisation du lait de chèvre produit dans la région du Nord-Est Algérien. Essai de fabrication du fromage frais. *Algerian Journal of Natural Products* 5:2 492-506.

Boyaval, P., Corre C., Roussel F., (1995). « Effect of free fatty acid on propionic acid bacteria. Le lait ». Vol:75.p 17-29.

Bradford M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248–254.

Broyard C., Gaucheron F. (2015). Modifications des structures et fonctions des caséines: un défi scientifique et technologique Science et technologie laitières Novembre 2015, Volume 95, numéro 6 , pp 831-862.

Brule G., Lenoir, J., Remeuf F., (1997). La micelle de caséine et la coagulation du lait in: Le Fromage. Ed., A. Eck, 3ème Ed., Technique Et Documentation Lavoisier, Paris, P.741, 891 p.

Bugaud C., Buchin S., Noël Y., Tessier L., Pochet S., Martin B., Chamba J.F., (2001b). Lait, 81, 593-60.7

Bugaud C., Buchin S., Hauwuy A. et Coulon J.B., (2002). Texture et flaveur du fromage selon la nature du pâturage. Production Animales, 15(1): 31-36

Cavalcanti MTH., Martinez CR., Furtado VC., Neto BB., Teixeira MF., Lima Filho JL., Porto ALF.,(2005). Milk-clotting protease production by *Nocardiosis sp.* in an inexpensive medium. World J Microbiol Biotechnol 21:151–154.

Cayot P., Lorient D., (1998). Structure et techno fonction des protéines du lait.

Cheffel J .C., Cup J.L., Lorient D., (1985). « Protéines alimentaires. Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimique. Technique et documentation Lavoisier,» paris, p38.

Chenais F., Richoux R., Houssin B., (2004).Nature des fourrages et qualité nutritionnelle de la matière grasse du lait. Renc. Rech. Rum., 11, 71-74.

Chikhoun M., 1977. Détermination des facteurs de variations de la production laitière en Mitidja à partir de l'étude des courbes de lactation. These. Ing. Agro. INA, El-harrach, Alger. 77p.

Chitpinyol S., Crabbe MJC, (1998). Chymosin and aspartic proteinases. Food Chem 61:395–418.

Colin O., Laurent F., Vignon B., (1992). Variations du rendement fromager en pâte molle. Relations avec la composition du lait et les paramètres de la coagulation. *Le lait*, 1992, **72**, 307-319.

Corredig M., Salvatore E., (2016). Enzymatic coagulation of milk. In P. L. H. McSweeney, & J. A. O'Mahony (Eds.). *Advanced dairy chemistry, volume 1B, proteins:Applied aspects* fourth edition (pp. 287–307).

Cooper J.B., Hargove G.L., (1982). Age and month of calving adjustments of Holstein protein, milk and fat lactation yield. *J. Dairy Sci.* 65, p.p. 1673-1678.

Coulon J.B., Garel J.P., Hoden A., (1986). Production laitière en zone de montagne : évolution à la rentrée à l'étable. *Bull. Tech. CRVZ Theix, INRA.* 63, 21-24.

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(3), 219-228.

Coulon J.B., Machboeuf D. (1994). Effet du numéro de lactation sur l'aptitude à la coagulation du lait de vache *Ann. Zootech,* 43 :135-140.

Coulon J.B., Pradel P., Verdier I., (1997). Effect of forage conservation (hay or silage) on chemical composition of milk. *Ann. Zootechni.,* (46) : 21-26. *Technique et documentation. Lavoisier », Paris,* 363 p.

Coulon J.B., Hurtaud C., Rémond B., Vérité R., (1998). Facteur de variation de la proportion de caséines dans les protéines du lait de vache. *INRA. Pro. Anim.,* 11, p.p. 299-310.

Coulon J.B., Verdier I., Pradel P., Almena M., (1998). Effect of lactation stage on the cheesemaking properties of milk and the quality of Saint-Nectaire type cheese. *J. DairyRes.,* n° 65, p.p. 295-305.

Coulon J.B., Delacroix-Buchet A., Martin¹ B., Pirisi A., (2005). Facteurs de production et qualité sensorielle des fromages. *INRA, Prod. Anim.,* 18 (1), 49-62.

Dalgleish D. G., Corredi M., (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology,* 3, 449-467.

Danley D.E., et Geoghegan K.F., (1988) Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C. *J. Biol. Chem.* 263(20):9785-9.

Debry G., (2001). "Lait, nutrition et santé", Edition Tec & Doc Lavoisier, paris.p544.

Delaby L., Peyraud J.L., Delagarde R., (2003). Faut-il compléter les vaches laitières au pâturage ? *INRA Prod.Anim.,* 16 (3), 183-195.

Delaby L., Peyraud J.L., (1994). Influence de la nature du concentré énergétique sur les performances des vaches laitières au pâturage. *Renc. Rech. Ruminants,* 1, 113 - 116.

Doreau M., Chilliard Y., (1992). Influence d'une supplémentation de la ration en lipides sur la qualité du lait chez la vache. *INRA Prod. Anim.*, 5:103-111.

ECK A. (1990). Le fromage. Ed. Tec. & Doc. , Lavoisier, Paris, 2ème éd. 539 p.

Eck A et Gillis J-C., (1997) : le fromage de la science à l'assurance –qualité. 3ème Edition, Tec et Doc Lavoisier. Paris. 891p.

Egito A. S., Girardet J. M., Laguna L. E., Poirson C., Mollé D., Miclo L., Gaillard J. L., (2007). Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. *International Dairy Journal*, 17, 816–825.

Eigel W. N., Butler J.E., Erustom., (1984). « Nomenclature of proteins of cow's milk.fifth revision *J.Dairy.sci.*, 67 :1599-1631 ».

El-Beltagy A. E., El-Adawy T. A., Rahma E. H., El-Bedawey A. A., (2004). Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*).*Food Chemistry*, 86, 33–39.

Espinoza-Molina J. A., Acosta-Muniz C. H., Sepulveda D. R., Zamudio-Flores P. B., Rios-Velasco C., (2016). Codon optimization of the “Bos Taurus Chymosin” gene for the production of recombinant Chymosin in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*,58, 657–664.

Esposito M., Di Pierro P., Dejonghe W., Mariniello L., Porta R., (2016). Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food Chemistry*, 204, 115–121.

Esumi H., Yasugi S., Takeo M., Fujiki H., (1980). Purification and characterization of a pepsinogen and its pepsin from proventriculus of the Japanese quail. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Enzymology*, 611, 363–370.

Evette J.L., (1975). La fromagerie.- Paris : Presses universitaires de France, p 140.

Favier J.C., (1985). Composition du lait de vache *Cah.Nutr.Diet .xx*, (4), 283-291

Findlay C.J., Stanley D.W., Emmons D.B. (1984). Chicken Pepsin as a Rennet Substitute. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 17, 97–101

Fox P., (1969). Influence of temperature and pH on the proteolytic activity of rennet extract. *Journal of Dairy Science*, 52, 1214–1218.

Fox P., McSweeney P., Cogan T., Guinee T., (2004). Cheese: chemistry, physics and microbiology: general aspects Volume 1. 3ème Ed Elsevier Academic Press, London, P. 640.

Frazao C., Bento I., Costa J., Soares CM., Veríssimo P., Faro C., Pires E., Cooper J., Larrondo MA., (1999). Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg–Gly–Asp-

containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *J Biol Chem* 274:27694–27701.

Froc J., Gilibert J., Daliphar T., Durand P., (1988). Composition et qualité technologique des laits de vaches Normandes et Pie-Noires. *INRA.Prod.Anim.*1(3) : 171-177.

Garel J.P., Coulon J.B., (1990). Effet de l'alimentation et de la race des vaches sur la fabrication de fromage d'Auvergne de Saint-Nectaire. *INRA Productions animales*, 3 (2), pp.127-136.

Garg S.K., Johri B.N., (1993). Immobilization of milk-clotting proteases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9, 139-144.

Garnot P., Martin P., (1980). La présure, composition, activité, son rôle en fromagerie. *La tech. Laitiere*, 930(3), 27-30.

Garnot P., (1985) Heat stability of milk clotting enzymes, technological consequences. *International Dairy Federation Bulletin* 194:2–6

GIPLAIT., (1989) Diagramme de fabrication du fromage petit suisse.

Gordin S., Rosenthal I., (1978). Efficacy of chicken pepsin as milk clotting enzyme. *Journal of Food Protection*, 41, 684–688

Goursaud J., (1993). Coagulation enzymatique du lait In : Scriban R. (coord). *Biotechnologie*. Ed.Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 4ème éd, pp 393-405.

Graiday P., (1978). Détermination de l'activité enzymatique d'extraits coagulants d'origine animale. *Revue du Technicien du lait*, 83 : pp. 5-47.

Green M. L., Stackpoole A., (1987). The Preparation And Assesment of A Suitable *Mucor Pusillus* Lindt Proteinase- Swine Pepsine Mixture For Cheddar Cheese-making. *J. of Dairy Res.* 42:297-312.

Croguennec T., Jeantet R., Brulé G., (2008). Fondements physicochimiques de la technologie laitière. Lavoisier, Techn. et Doc., Paris.2008: p160.

Harris E.L., V., Angal S., (1989). Protein purification methods. A practical approach IRL Press at Oxford University Press. U. K. p156.

Heil F., Dumont JP., (1993).Caractéristiques organoleptiques de fromages de chèvre fabriqués à partir de laits contenant des variantes génétiques différents de la caséine $\alpha 1$. *Lait* 73, 559-565.

Hoden A., (1987). Influence de l'alimentation sur la composition du lait. *Bull. Tech. CRZV*. Theix, Ed. INRA, Pp (67) 35-62.

Hoden A., Coulon JB., (1991). Maîtrise de la composition du lait. – Influence des facteurs

nutritionnels sur la quantité et les taux de matières grasses et protéiques. INRA Prod. Anim. 4 (5): 361-67.

Hurtaud C., Buchin S., Martin B., Verdier-Metz I., Peyraud J.L., Noel Y., (2001)

La qualité des laits et ses conséquences sur la qualité des produits de transformation : quelques techniques de mesure dans les essais zootechniques Renc. Rech. Ruminants, 35-42

JORA. , (1998). Journal officiel de la république Algérienne n° 35 du 27 mai 1998.

Joyeaux A., (1982). Les préparations industrielles d'enzymes In : les enzymes ; production et utilisation industrielles, 3ème trimestre, 352p.

Julliard V., Richard T., (1996). « Le lait » p 24-26.

Kageyama T., (2002). Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: Structure, function, evolution, and development. Cellular and Molecular Life Sciences, 59, 288–306.

Kamoun P., (1977). Appareil et méthodes en biochimie. Ed. Flammarion 2ème édition. Paris. P. 236.

Khoualdi G., (2017). Caractérisation du fromage traditionnel Algérien « Medeghissa ». Thèse Magister.Univ.Constantine1. p17.

Kouniba A., Berrada M., El Marakchi A., (2007). Étude comparative de la composition chimique du lait de chèvre de la race *locale* Marocaine et la race *alpine* et évaluation de leur aptitude fromagère. *Revue Méd. Vét.*, 2007, **158**, 03, 152-160.

Kumar A., Sharma J., Kumar Mohanty A., Grover S., Kumar Batish V., (2006).

Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*).

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 145, 108–113.

Kurutahalli S., Vishwanatha K. S., Appu Rao A. G., Singh S. A. (2010). Production and characterization of a milk-clotting enzyme from (*Aspergillus oryzae*) MTCC 5341. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1849–1859.

Laemmli U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

Lagaude A., Fernandez L., Cuq J.L., Marchesseau S., (2004). Characterization of curd formation during the rennet coagulation of milk by an optical microscopic method. *International Dairy Journal*, 14, 1033–1039.

Larbaoui D., Meribai A., Kouidri A., Khodja Mohamed A., Nouani A., Bellal M-M., (2013). Influence of Dairy Cows Race and Diet on Milk Composition in Algeria. *Life Science Journal*. 10 (4): 3017-3025.

- Larsson K.I., Andrén A., (1997).** Affinity between chymosine and individual caseins at varying pH-values, *Int. Dairy J.*, 7: 61-68.
- Lavanchy P., Bérodiér F., Zannoni M., Noël Y., Adamo C., Squella J., Herrero L., (1993).**L'évaluation sensorielle de la texture des fromages à pâte dure ou semi-dure. Etude inter laboratoires, *Lebensm-Wiss .U. Technol.* 26. 59-68.
- Legarto J., Gelé M., Ferlay A., Hurtaud C., Lagriffoul G., Palière 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.*Prod.INRA* 27(4) :269-282
- Lenoir J., Lambert G., Schmidt J.L., (1983).** L'élaboration d'un fromage exemple camembert pour la science. Paris. p 93.
- Lenoir J., (1985).** Les caséines du lait. *Rev lait franç*, 440: 17-23.
- Libouga D. G., JiwouaNgounou C. N., Kouebou C. P., (2013).** Etude du lait de zébu (*Bos indicus*) obtenu à Ngaoundéré (Adamaoua, Nord Cameroun). *Cameroon Journal of Academic Science*, 1, 14-19.
- Linden G., Lorient D., (1994).** Biochimie agro-alimentaire : Valorisation alimentaire de la production agricole. Ed. Masson. Paris. Milan. Barcelone. P 141-163.
- Lucey J.A., (2002a).** Rennet coagulation In : *Encyclopedia of dairy sciences*, Roginski H., Fox P.F. and Fuquay J.W., eds.Academic Press San Diego, CA pp : 286-293.
- Lucey J.A., Kindstedt P.S., Fox P.F. (1992).**Seasonality: its impact on the production of good quality Mozzarella cheese, in *Proc. 3rd Cheese Symposium*, T.M. Cogan, Ed., 41–47. Morepark, Ireland: National Dairy Products Research Centre
- Luquet F.M., (1987).** Laits et produits laitiers vache, Brebis, Chèvre. Volume I. Edition : Tec et Doc, Lavoisier. P: 397.
- Macheboeuf D., Coulon J-B., D'hour P., (1993).** Aptitude à la coagulation du lait de vache. Influence de la race, des variants génétiques des lactoprotéines du lait, de l'alimentation et du numéro de lactation.*INRA.Prod.Anim.*6(5) :333-334.
- Mahaut M, Jeantet R, Brule G. (2000).** Initiation à la technologie fromagère. Techniques et Documentation–Lavoisier, Paris, p 194.
- Mahaut M., Jeantet R., Brulé G., (2003).** Initiation à la technologie fromagère. Paris, Lavoisier, Technique Et Documentation, Lavoisier, France ; Pp 24-102.

- Marchin S., Putaux J-L., 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/ultrasmall angle x-ray scattering. *The Journal of Chemical Physics*, 126, 045-101
- Martin B., Coulon J.B., (1995).** Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. 1. Influence des facteurs de production sur l'aptitude à la coagulation des laits de troupeaux *Lait* (1995) 75, 61-80.
- Matallah S., Bouchelaghem S., Matallah F., (2015).** Variations de la composition chimique du lait de vache Holstein dans le nord-est de l'Algérie. *Livestock Research for Rural Development* 27 (1).
- Mathieu J., (1998).** Initiation à la physicochimie du lait, technique et documentation Lavoisier Paris pp 12-199.
- Mateos A., Guyard-Nicodeme M., Bagliniere F., Jardin J., Gaucheron F., Dary A., Humbert G., Gaillard J-L. (2015).** Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *International Dairy Journal*, 49, 78–88.
- Meklati F.R., Meribai A., Ben-Mahdi M.H. (2017).** Lactation Stage Effect on Nutritional Quality of Algiers Area Cows' Milk .*Int.J.dDairy.:Sci* 12:236-242.
- Mohamed Ahmed I. A., Babiker E. E., 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.
- Mohanty A.K., Mukhopadhyay U.K., Kaushik J.K., Grover S., Batish V.K., (2003).** Isolation, Purification and Characterization of Chymosin from Rinerine Buffalo (Bubalububalis). *J. Dairy Res.* 70: 37–43.
- 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.
- Najera AI., De Renobales M., Barron L.J.R., (2002).** Effect of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk : A multifactorial study. *Food Chem.* 80: 345-352.
- Nouani A., (2009).** Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait. Thèse de doctorat ENSA.Alger.p.106.

- Nouani A., Belhamiche N., Slamani R, Belbraouet .S, Fazouane,F, Bellal,M M., (2009).** Purification et Caractérisation Electrophoretique D'une Protéase Coagulant le Lait de *Mucor Pusillus*: Comparaison de Méthodes. *European Journal of Scientific Research* 35 :512-521
- Oliveira A., Perira C., Soares da Costa D., Teixeira J., Fidalgo F., Pereira S., Pissarra J., (2010).** Characterization of aspartic proteinases in *C. cardunculus* L. callus tissue for its prospective transformation. *Plant Sci* 178:140 –146.
- O.N.I.L. (2018).** Office national interprofessionnel du lait. Service information.
- ONS, (2016).** Office national des statistiques.
- Ould elya M.E.M., (1996).** Analyse de la formation des gels acides de laits de Vache, de chèvre et de brebis au moyen de la géométrie fractale: étude comparative. Thèse.doc.INPL. Lorraine. P.1.
- O'Sullivan M., Fox P., (1991).** Evaluation of microbial chymosin from genetically engineered *Kluyveromyces lactis*. *Food Biotechnol* 5(1):19–32.
- Phadungath C., (2005).** Casein micelle structure: a concise review *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 2005, 27(1): 201.
- Pichová I., Kostka V., (1990).** Molecular characteristics of pepsinogen and pepsin from duck glandular stomach. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97(B), 89–94.
- Pointurier H., (1985).** Les fromages in: les fromages à partir de lait de vache in laits et produits laitiers, vache. brebis. chèvres 2volume. Luquet F.M.TEC et DOC. Lavoisier apria-paris.pp103-104.
- Polaina J., Maccabe A.P., (2007).** *Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications.* Springer. Netherlands.
- Poza M., Sieiro C., Carreira L., Barros-Velazquez J., Villa TG., (2003).** Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:691–698
- Pougheon S., (2001).** Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, Ecole nationale Vétérinaire Toulouse, France: 59, p 102.
- Pougheon S., Goursaud J., (2001).** Le lait caractéristiques physicochimiques in **Debry G.,** Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 6, p.566 .
- Ramet J.P., Weber F., (1980).** Purification à l'étude de l'influence des facteurs du milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le lait*, 60,1-13.

Ramet J.P., (1985). La fromagerie, les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Collection. Production et santé Animales. FAO, Rome, Italie.187p.

Ramet J.P., (1987). La présure et les enzymes coagulantes. In: le fromage Eck A., Ed. tech. doc. Lavoisier. Paris.p101-106.

Ramet J.P., (1997). Les agents de transformation du lait; la présure et les enzymes coagulantes In: Le Fromage. Ed., A. Eck, 3ème Ed., Tec Et Doc, Lavoisier, P.101-107, 539 .

Ramet J-P., (2006).L'égouttage du coagulum in: Le fromage (3édition).Eck et Gillis.lavoisier TEC&DOC. Paris. pp, 42-61.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597–635.

Ray D.E., Halbach T.J., Armstrong D.V., (1992). Season and lactation number effects on milk production and reproduction of dairy cattle in Arizona. *J. DairySci.* 75, p.p. 2976-2983.

Remeuf F., Cossin V., Dervin C., Lenoir J., Tomassone R., (1991). Relations entre les caractères physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Le lait*, 1991, 71, 397-421.

Sakamoto N., Saiga H., Yasugi S., (1998). Analysis of temporal expression pattern and cis-regulatory sequences of chicken pepsinogen A and C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250, 420–424.

Sarmiento A.C., Oliveira C.S., Duarte A.S., Pires E., Barros M.T., (2006).

Evaluation of cardosin A as a probe for limited proteolysis in non-aqueous environments—complex substrates hydrolysis.*Enzyme and Microbial Technology.* 38: 415-421

Scott,R., Robinson, R.K.et Wilbey, R.A. (1998). Cheese making Practice. Springer Science & Business Media. New York, USA, 449p.

Scriban R., (1999). Biotechnologie. 5e Edition. *Tech Et Doc.* Lavoisier. Paris. P. 149-159

Shah M.A., Mir S.A., Paray M.A., (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheese making: A review. *Dairy Science & Technology*, 94, 5–16.

Shieh C.J., Phan Thi LA., Shih IL., (2009).Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochem. Eng.Journal* 43:85-91.

Siboukeur O., Mati A., Hesses B., (2005). Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camélien (*camelus dromedarius*). utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastrique de dromadaire. *Cahier d'études et de recherches francophones / Agriculture.*14 : 473-483.

Simões I., Faro C., (2004). Structure and Function of Plant Aspartic Proteinases. *Eur. J. Biochem.* 271: 206–207.

Sitthipong N., Soottawat B., Hideki K., (2010) Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry* 121: 49–55.

Soukehal A (2013). Dossier filière lait : Comment atteindre l'autosuffisance en 10 ans ! *Revue Perspectives N9- 3eme trimestre 2013*. Pp : 23- 29. [http:// www. Pixal communication.com/perspectives/revue/n9](http://www.Pixalcommunication.com/perspectives/revue/n9).

Sousa M.J., Malcata F.x., (2002). Advances in the role of a plant coagulant in vitro and during ripening of cheeses from several Milk species. *Lait* 82 .151–170.

St-Gelais D., Tirard-Collet P., (2002). Fromage. Dans : *Science et technologie du lait : transformation du lait*. Presses internationales Polytechnique, Montréal, 349-415.

Stoop W. M., Bovenhuis H., Heck J. M., van Arendonk. J.A., (2009). Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *J. DairySci.* 92 p.p. 1469–1478.

Sutton J., Bines J., Moran S., Napper D., Givens D., (1987). “A Comparison of starchy and fibrous concentrates for milk production energy utilization and hay intake by friesian cows.” *AGRIC. Sci.* V.109, pp375-386.

Sutton J. D., (1989). Altering milk composition by feeding. *J. Dairy Sci.*, 72, 2801-2814.

Swaisgood H.E., (1992). Chemistry of the caseins. *Advanced dairy chemistry* 1, pp 63-110.

Swaisgood H.E., (1982). Chemistry of milk protein. *Developments in dairy chemistry*.1, pp 1-59

Tamime A., (2006). *Fermented Milks*. Ed Blackwell Science Ltd, England, P. 262.

Thapon JL. (2005). *Technologie de la fabrication du lait* Agro campus–Rennes, France.Pp.51.

Temiz H., Aykut U., Okumus E., Turhan S., (2007). The partial purification and properties of pepsin obtained from Turkey proventriculus. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12, 450–456.

Temiz H., Okumus E., Aykut U., Dervisoglu M., Yazici, F., (2008). Partial purification of pepsin from Turkey proventriculus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1851–1855.

Tiezhu Li., Jinghui W., Yuqiu Li., Li Zhang., Li Zheng., Zhuolin Li., Zhennai Yang., Quan Luo., (2011). Structure of the complex between *Mucor pusillus* pepsin and the key domain of κ -casein for site-directed mutagenesis:a combined molecular modeling and docking approach. *J Mol Model* (2011) 17:1661–1668.

Tomar R., Kumar R., Jagannadham M.V., (2008). A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: Purification and biochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1479–1487.

Tripathi P., Tomar R., Medicherla V., Jagannadham., (2011). Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin *Food Chemistry* 125 (2011) 1005–1012.

Tsouli J., (1974). Etude comparée de l'activité enzymatique de 3 variétés d'artichauts du genre *Cinara Cardunculus* L sur la coagulation du lait. *Le Lait*, INRA Editions. 54, 415–421.

Veisseyre R., (1975). Technologie du lait .constituants, récolte traitement et transformation du lait. Edition. Maison rustique. Paris. pp: 112-133

Veisseyre R., (1979). Technologie du lait. 3ème édition Maison Rustique, 714p

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 cardunculus* L., *Eur: J.Biochem.*235,762-768.

Vetier 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*, 80,237-246.

Vierling E. (2003). Aliment et boisson-Filière et produit, 2ème édition, doin éditeurs, centre régional de la documentation pédagogique d'Aquitaine:11(270 pages).

Vierling E. (2008). Aliments et boissons filières et produits. 3ème édition Biosciences et techniques. Paris. pp :15-16.

Vignola C. (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait, fondation de technologie laitière du Québec 1, 12, 14, 15p.

Voisin A., (2010). Influence du type d'alimentation sur la texture et la saveur du fromage. Thèse. doct. univ. Toulouse. France. p.75.

Voutsinas L.P., Delegiannis C., Katsiari M.C., Pappas C.P., (1988). Chemical composition of Boutsico ewe milk during lactation.*Milchwissenschaft*, 73, 766-771.

Walsh M.K., Li X., (2000). Thermal stability of acid proteinases. *The Journal of Dairy Research*, 67, 637–640.

Walstra P., (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal* 9(3), 189-192.

Walstra P., Wouters J.T., Geurts T.J., (2005). *Dairy science and technology*. CRC press.

Wigley R.C.,(1996). chesse and whey in industrial enzmology.second ED.Godfrey and Wiest.p135-142.

Wu T., Sun L.-C., Du C.-H., Cai Q.-F., Zhang Q.-B., Su W.-J., Cao M.-J., (2009). Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food Chemistry*, 115, 137–142.

Yegin S., Dekker P., (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering *Dairy Sci. & Technol.* (2013) 93:565–594.

Zeller B., (2005). Le fromage de chèvre : spécificités technologiques et économiques. Thèse Docteur Vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse.p.10.

Zhou Q., Fu X.P., Zhang L.J., Su W.J., Cao M.J., (2007). Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus* Houttuyn) pepsinogens and pepsins. *Food Chemistry*, 103, 795–801.

ANNEXES

Annexe 1

Préparation du substrat de Berridge

1. Les constituants du substrat de Berridge

1.1. Lait en poudre

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

1.2. Solution de CaCl₂

La solution de CaCl₂ de qualité anhydre utilisée à une concentration de 0.01M, elle est préparée à partir d'une solution mère de CaCl₂ à 1 M. La solution est conservée à +4°C à l'obscurité.

1. 2.1. Mode opératoire

Pour préparer 100 mL de substrat de Berridge, on dissout 12g de lait en poudre dans 10mL de CaCl₂ à 0.01 M, puis on complète la quantité par l'eau distillée jusqu'à à 100 ml. On verse une petite quantité de solution sur la totalité de la poudre de façon à obtenir par agitation manuelle une bouillé homogène, le reste de la solution de chlorure de calcium est alors ajouté sur cette bouillé, puis on agite avec un agitateur magnétique pendant 30 mn, en évitant une agitation trop violente, susceptible de produire une mousse géante. Le pH du lait ainsi préparé est ajusté à pH 6.4 avec une solution de HCl à 0.1N ou NaOH à 0.1N.

Après un repos de 30mn, à température de laboratoire, le substrat est prêt à l'emploi.

Substrat (lait écrémé en poudre low-heat 12g dissout dans 100ml d'une solution

Aqueuse de CaCl_2 qui doit être ajouté progressivement)



Agitation pendant 15min (éviter l'agitation trop violente susceptible de produire une mousse géante)



Ajuster le pH à 6.4 avec une solution de HCl à 0.1N ou NaOH à 0.1N



Repos (30mn à température du laboratoire à l'obscurité)



Répartition du substrat (10 ml / tube à essai)



Incubation des tubes à essai à 30°C au bain marie, ensuite la température est remontée à 35°C



Addition de l'enzyme au substrat (à raison de 1ml)

Diagramme de préparation du substrat de Berridge et mesure du temps de coagulation

- Le temps de coagulation est relevé visuellement dès l'apparition des premiers flocons de micelles sur la paroi du tube à essai légèrement incliné, tourner lentement à raison de 2 à 4 tr / min dans un bain marie.

Annexe 2

Protocole de méthylation des AG : méthode AFNOR , (2000) NFT 60-233.

Réactifs :

NaOH 2N methanolique.

HCl methanolique.

Méthode :

-1 ml d'hexane contient 50 à 500 mg de MG pure, les mettre dans un tube à vis.

-ajouter 200 µl de NaOH 2N methanolique bien bouché, agiter 10 secondes.

-porter au bain marie à 50 °C/ 20S, agiter et laisser refroidir.

- ajouter 200 µl de HCl methanolique.

- agiter, laisser décanter, recueillir la couche supérieure (phase hénanoïque) qui contient les esters méthyliques. (Récupérer cette phase a l'aide d'une pipette pasteur).

La récupérer dans un autre tube à vis, porter au congélateur en attendant l'analyse chromatographique.

Conditions Chromatographiques pour esters méthyliques

Chromatographe	Chrompack CP 9002
Détecteur	FID (250°C)
Injecteur	SPLIT 1/100 (250°C)
Gaz vecteur	Azote
Colonne Capillaire	Cp Sil 88 CB (5%Phenyl+ 95% dimethylpolysiloxane)
Longueur	30m
Diamètre intérieur	0.32mm *0.25 UM
Epaisseur	0,25 µm
Injecteur	250°C
Détecteur	280°C
Four	190 °C
Quantité injectée	0.8ul
Vitesse du papier	0.5 cm/ mn

Annexe 3

Dosage du lactose (méthode de Bertrand)

On prépare la liqueur cupro-alcaline de Fehling en passant par les étapes suivantes :

Solution A (liqueur cuprique)

Sulfates de cuivre à 5M d'eau.....40g

Eau distillée1000 ml

Solution B (liqueur tartrique alcaline)

Tartrate de sodium et de potassium, sel de seignette...200g

Soude caustique.....150g

Eau distillée.....1000ml

Préparation de liqueur ferrique

Sulfates ferrique.....50g

Acide sulfurique200g

Eau distillée.....1000ml

Défécation

Dans une fiole jaugée de 200ml, on introduit successivement :

Lait.....20ml

Solution de ferrocyanure de potassium.....2ml

On agite puis on ajoute solution d'acétate de zinc.....2ml

On agite et on complète au trait de jauge avec l'eau distillée tout en mélangeant .on ajoute 2ml d'eau distillée (pour tenir compte du volume précipité). On agite, puis laisser reposer 10 à 15 min et on filtre à nouveau si le filtrat n'est pas limpide.

Réductimétrie

Dans un erlenmeyer de 150 ml, on introduit :

Liqueur cuprique20ml

Liqueur tartrique alcaline.....20ml

Filtrat du lait.....10ml

Eau distillée.....10ml

Après agitation et ébullition douce on maintient celle-ci pendant 3min,après repos du précipité , on fait la décantation du liquide sur un filtre en amiante ou en verre fritté .

On lave sommairement avec 5 à10ml d'eau distillée bouillie ,le précipité contenu dans la fiole conique ,puis on laisse reposer,décanter ensuite on dissous le précipité de la fiole dans 10ml de liqueur ferrique.

On titre dans la fiole à vide par la solution de permanganate de potassium 0.1N jusqu'à coloration rose persistante

Expression des résultats

1ml de permanganate de potassium correspond à 6.35mg de cuivre dans la prise d'essai, pour le calcul on peut se reporter au tableau de conversion, en fonction du volume de permanganate de potassium 0.1N versé, donne directement le taux de lactose hydraté.

Annexe 4

Dosage de la matière azotée totale par la méthode Kjeldahl (AFNOR 1986, norme NF V04-211) :

-Minéralisation

-Elle consiste à transformer toutes les structures organiques contenant de l'azote en azote minéral par voie humide. Introduire 5 ml de lait dans le matras de Kjeldahl. Ajouter 15 à 20 ml d'acide sulfurique et 5 à 6 g de catalyseur. Agiter. Chauffer légèrement le matras. Lorsque l'eau s'est évaporée, augmenter le chauffage jusqu'à douce ébullition du mélange acide. Agiter de temps en temps, en ramenant dans le fond du matras les parcelles de substances qui adhèrent aux parois. Lorsque le liquide est devenu limpide, poursuivre le chauffage durant 30 minutes et laisser refroidir.

-Distillation et dosage de l'ammoniac :

-Après refroidissement, le minéralisât est récupéré avec précaution dans une fiole de 100 ml avec l'eau distillée. Transvaser 20 ml du minéralisât dilué dans un ballon additionné de 20 ml de lessive de soude à 33 %, plus 80 ml d'eau distillée.

-Placer le ballon dans le dispositif de distillation ;

-Placer l'allonge qui termine le dispositif dans un bêcher de 200 ml contenant 20ml d'acide borique à 4% et 2 gouttes d'indicateur (Tashiro);

-Après distillation ; titrer le distillat avec l'acide sulfurique 0,1 N.

-Expression des résultats :

-Les résultats sont exprimés gramme d'azote par litre :

$$- \quad NT = V_1 * 0,0014 * 1000/V_0$$

Avec : V_0 : volume de la prise d'essai (5ml) ;

V_1 : volume de la solution d'acide sulfurique 0,1 N.

Dosage de l'azote non-caséique (NST) :

Dans un flacon de 100 ml, 10 ml du lait sont introduits et dilués avec 70 à 80 ml de l'eau distillée. Le contenu est apporté à 40 °C et puis acidifié avec 1ml d'acide acétique à 10 %. Après être tenu 5 à 10 min à 40° C, 1 ml de l'acétate de sodium normal est ajoutée. Le contenu est alors refroidi et le volume est complété avec de l'eau distillée. Le pH de la solution est déterminé ; à chaque fois qu'il est nécessaire, le pH est ajusté à 4.6 à 4.7 en ajoutant quelques gouttes d'acide acétique à 10 %. Le sérum Caséine-libre est obtenu en filtrant (papier filtre Whatman). 10 ml du sérum sont employés pour la détermination de l'azote non-caséique, en utilisant la même technique de Kjeldahl comme ci-dessus.

Dosage de l'azote non protéique (NNP) :

Dans un flacon de 50 ml, 10 ml de lait sont dilués jusqu'à la marque par l'acide trichloracetic 12 %. Le contenu est bien mélangé et filtré après 10 min. Une partie aliquote de 20 ml est employée pour la détermination d'azote en utilisant la même technique de Kjeldahl comme ci-dessus.

Annexe 5

Dosage des protéines de l'extrait enzymatique selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

1. Réactifs

1.1. Réactif de Bradford :

- 10mg de Bleu de Coomassie G-250.
- 5ml d'éthanol à 95 %.
- 10ml d'acide phosphorique (H_3PO_4)

Ce réactif de peut être conservé à 4°C et à l'abri de lumière.

1.2. Solution de BSA :

- BSA à 100mg.
- Qsp à 100ml l'eau distillée.

2. Mode opératoire

2.1. Préparation du réactif de Bradford

Dissoudre 10mg de Bleu de Coomassie G-250 dans 5mL d'éthanol à 95%. Après dissolution complète. Ajouter 10ml d'acide phosphorique (H_3PO_4). Compléter à 100ml. Filtrer. Le conserver maximum 15jour l'abri la lumière.

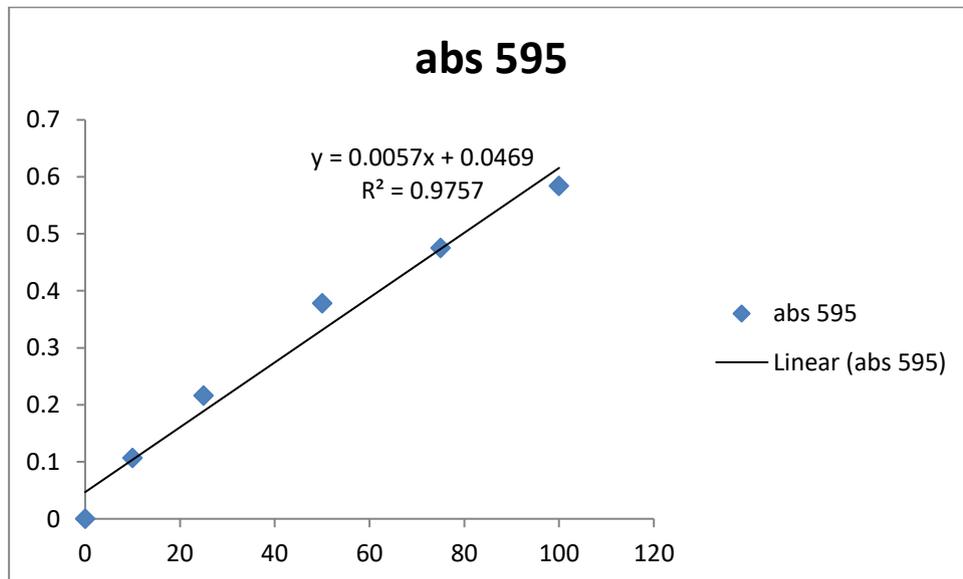
2.2. Préparation de solution de BSA

Préparer une solution à 100mg /L de BSA dans l'eau ultra-pure. Pour cela, préparer une solution à 1g/L et la diluer 10 fois avec l'eau ultra-pure. Aliquoter en fractions de 10mL dans des tubes et les conserver au congélateur.

Tableau 1 : Préparation de la solution étalon de la BSA

N° de tube	1	2	3	4	5	6
Concentration en BSA ($\mu\text{L} / \text{mL.}\dot{\text{e}}\text{q BSA}$)	0	10	25	50	75	100
Volume de solution mère de BSA (μL)	0	100	250	500	750	1000
Volume d'eau (μL)	1000	900	750	500	250	0
Réactif de Bradford (mL)	1	1	1	1	1	1

- Les tubes sont incubés à température ambiante pendant 5min à l'abri de la lumière.
- Lire les D.O à 595nm des 5 tube (2 de à 6) contre le blanc (tube N°1).
- Tracer la courbe d'étalonnage de la D.O en fonction de la concentration en BSA.
- Les concentrations en protéines sont exprimées $\mu\text{L} / \text{mL.}\dot{\text{e}}\text{q BSA}$



Courbe d'étalonnage : de la BSA

Annexe 6



Photographie de l'appareillage de chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) semi-automatisé ÄKTA-Purifier.

Annexe 7

1. Définition des microorganismes recherchés

1.1. Germes aérobies mésophile Totaux (G A M T)

La flore mésophile totale regroupe tous les germes aérobies et anaérobies facultatifs qui sont dénommés germes banaux.

1.2 Spores anaérobies S/R

Les anaérobies sulfito- réducteurs sont des bactéries anaérobies strictes, de forme bacille à gram positif, catalase négative, mobiles, sporulés, appartenant à la famille des Bacillacea, hôte habituel du tube digestif de l'homme, leurs spores ont une résistance considérable dans les milieux naturels, ils ont un pouvoir de détruire le sulfite de sodium et donner en présence de fer, du sulfure de fer d'où une coloration noire

1.3 Coliformes totaux et fécaux

Les coliformes totaux sont des bacilles Gram négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs, non sporulés, ne possèdent pas d'oxydase, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production l'acide et de gaz en 24 à 48 h à une température comprise entre 36 et 37°C

Les coliformes fécaux ont les mêmes caractères que les coliformes totaux, mais ils sont capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 24h à une température de l'ordre de 44°C

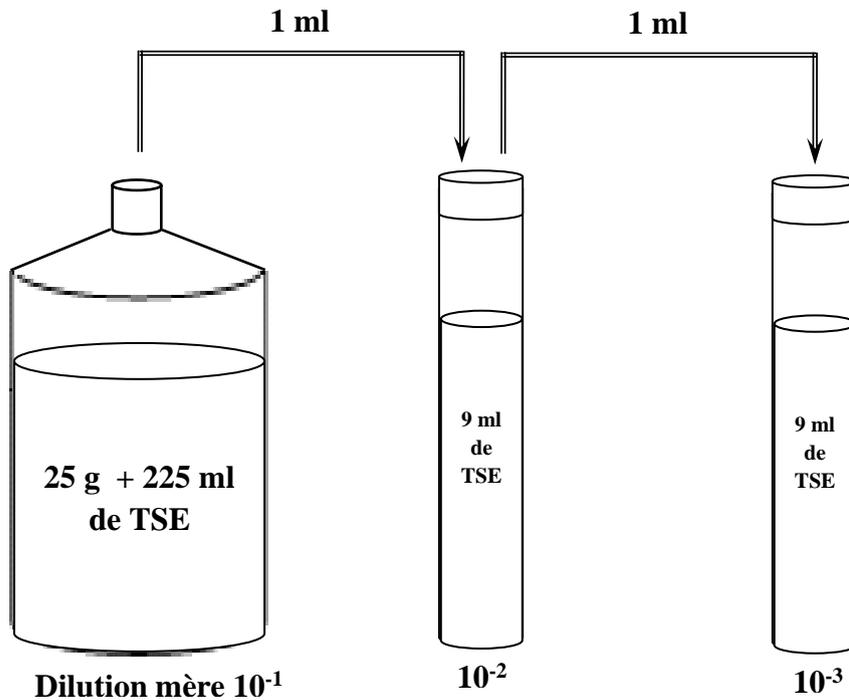
Rappelons également qu'Escherichia coli est une coliforme thermo tolérant qui produit en plus, de l'indole à 44 °C

1.4. Staphylococcus aureus

Les staphylococcus aureus appartiennent à la famille de Micrococcaceae. Ce sont des cocci Gram positif. Ils sont aérobies et anaérobies facultatifs, immobiles

2. Analyses microbiologiques du fromage

Préparation des solutions mères



2.1. Dénombrement de GAMT

Mode opératoire

A partir des dilutions décimales allant de 10⁻³ à 10⁻¹, porter aseptiquement 1 ml dans une boîte de pétri vide préparée à cet usage et numérotée.

Compléter ensuite avec 12 à 15 ml de gélose PCA fondue puis refroidie à 45 °C ± 1. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de (8) pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée. Laisser solidifier sur la paillasse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 ml de la même gélose, cette double couche à un rôle protecteur contre les contaminations diverses.

Incubation

Les boîtes seront incubées couvercle en bas à 30°C pendant 72 h avec :

- Première lecture à 24 h.
- Deuxième lecture à 48 h.
- Troisième lecture à 72 h.

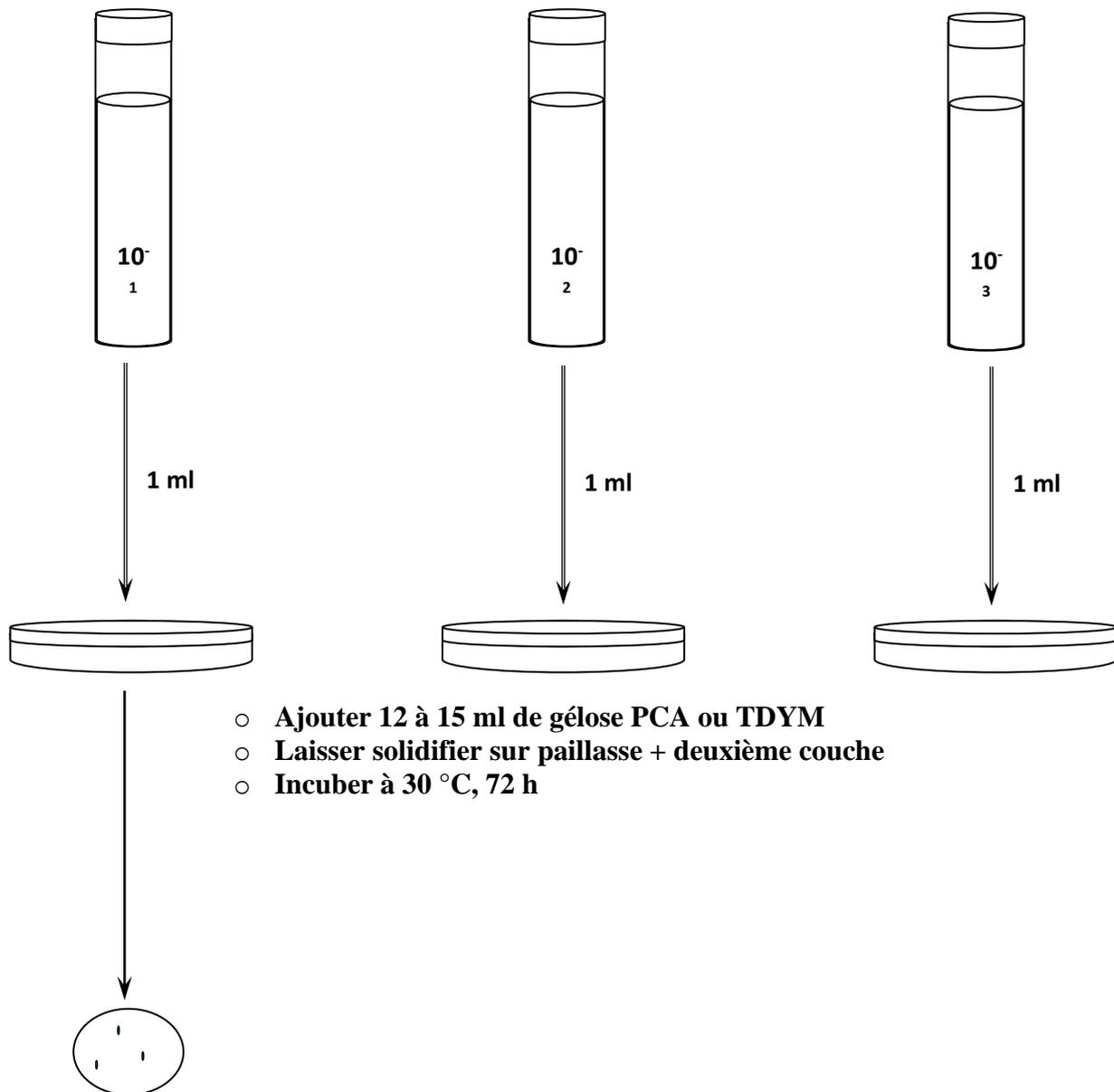
Lecture

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaire en masse.

Expression des résultats

Le dénombrement s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte les facteurs suivants :

- ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies,
- multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution,
- faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.



Recherche et dénombrement des GAMT

2.2. Dénombrement de Coliformes totaux et fécaux

Mode opératoire

A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , dans une boîte de pétri vide préparée à cet usage et numérotée. Cette opération doit être effectuée en double pour chaque dilution car :

La première série de boîtes sera incubée à 37 °C et sera réservée à la recherche des coliformes totaux.

La deuxième série de boîtes sera incubée à 44 °C et sera réservée à la recherche des coliformes fécaux.

Compléter ensuite avec environ 15 ml de gélose au Désoxycholate à 1‰ (ou avec gélose VRBL) fondue puis refroidie à 45 °C ± 1.

A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution dans des tubes contenant eau peptone exempte d'indole numérotés et préparés à cet usage. Mélanger bien.

Incubation

Les boîtes pétris seront donc incubées couvercle en bas pendant 24 à 48 h à :

- 37 °C pour la première série (recherche des coliformes totaux)
- 44 °C pour la deuxième série (recherche des coliformes fécaux)

Les tubes seront donc incubés à 44 °C pendant 24 à 48 h (identification biochimique des coliformes fécaux).

Lecture

Les colonies des coliformes totaux et fécaux apparaissent en masse sous forme de petites colonies de couleur rouge foncé et de 0,5 mm de diamètre.

Expression des résultats

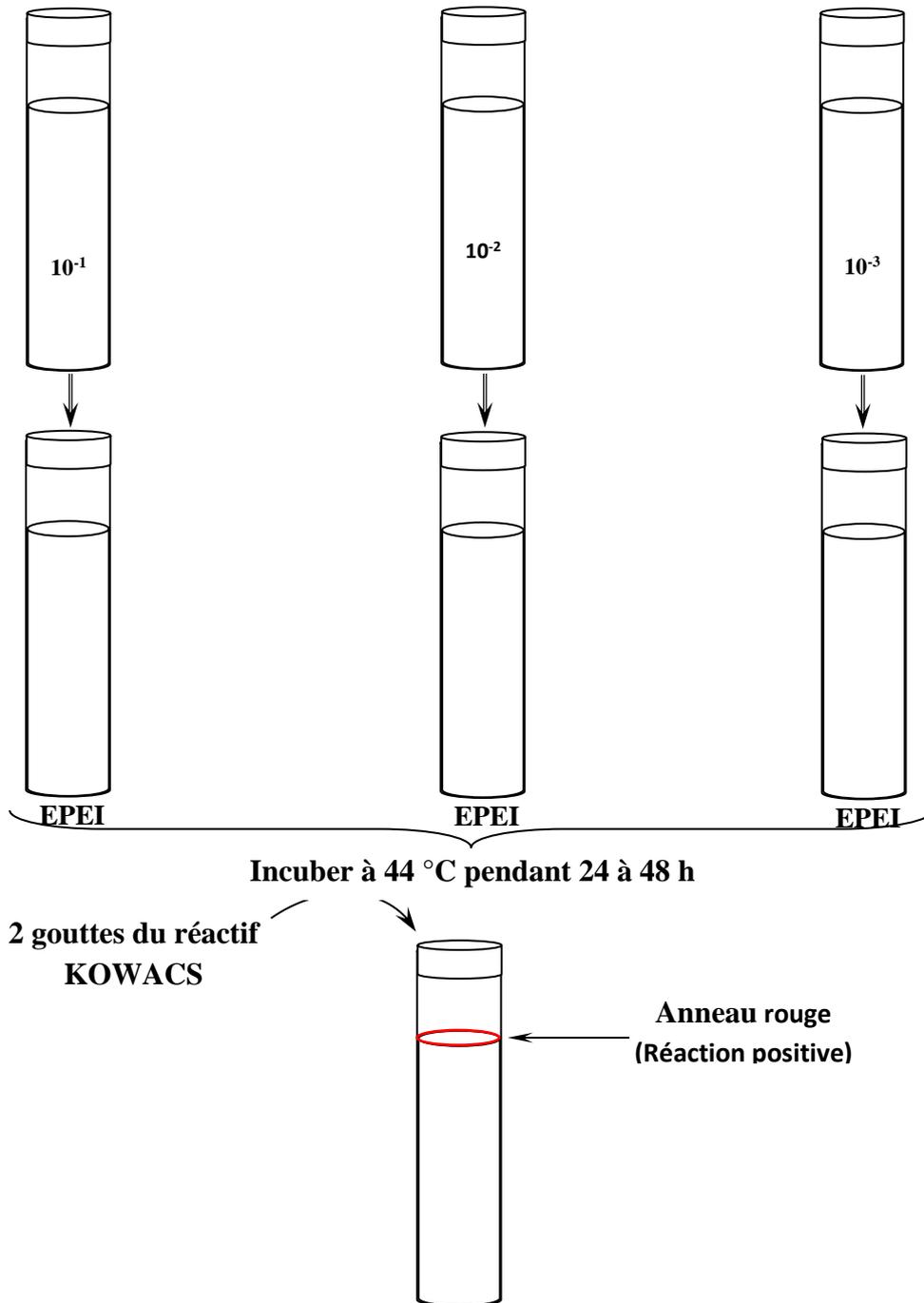
Le dénombrement s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte les facteurs suivants :

- ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies,
- ne dénombrer les colonies des coliformes fécaux qu'après une réaction indole +.
- multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution,
- faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

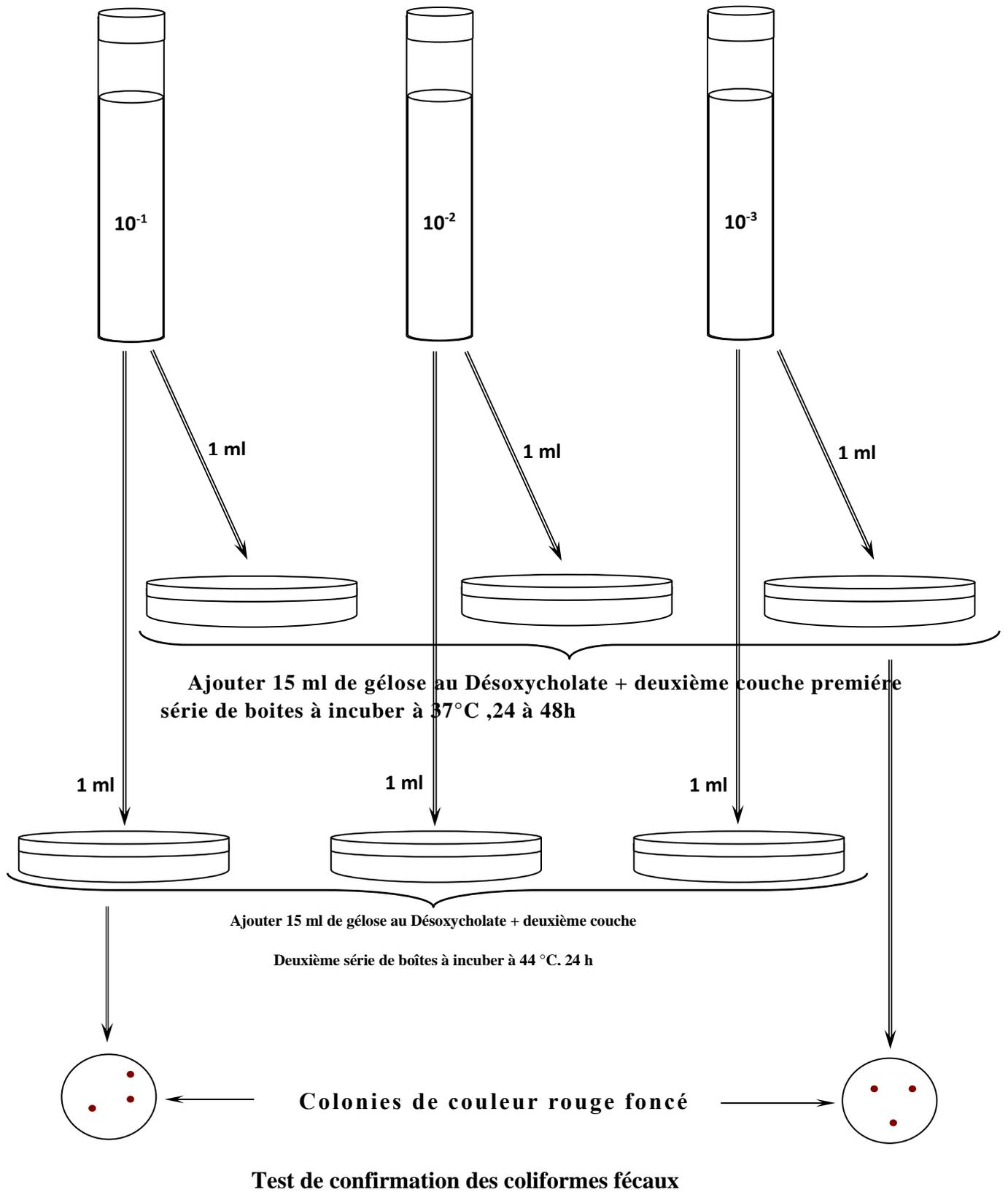
Confirmation

Passer au test de confirmation en cas d'existence de coliformes fécaux en ajoutant des quelques gouttes de réactif KOWACS dans les tubes réservés à l'identification biochimique.

L'apparition d'un anneau rouge en surface indique que la réaction est positive.



Recherche et dénombrement des coliformes



3. Recherche de *Staphylococcus aureus*

Mode opératoire

• Préparation du milieu d'enrichissement

Au moment de l'emploi, ouvrir aseptiquement le flacon contenant le milieu Giolitti Cantoni pour y ajouter 15 ml de la solution de Tellurite de potassium. Mélanger soigneusement. Le milieu est alors prêt à l'emploi.

• Enrichissement

A partir des dilutions décimales retenues, porter aseptiquement 1 ml par dilution dans un tube à vis stérile. Ajouter par la suite environ 15 ml du milieu d'enrichissement. Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation

L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 h

Lecture

Seront considérés comme positifs, les tubes ayant virés au noir.

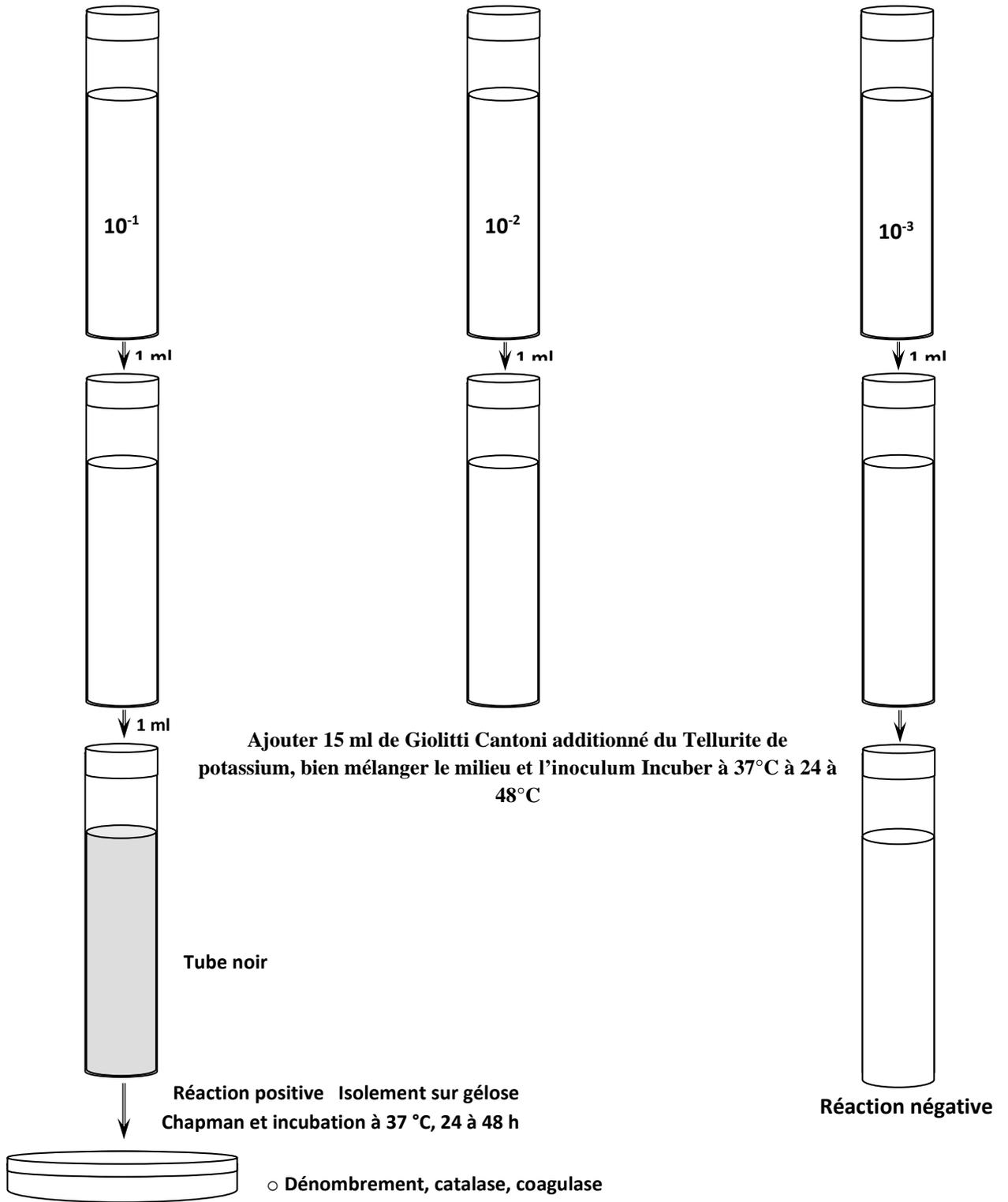
Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un développement de *Staphylococcus aureus*, ces tubes feront l'objet d'un isolement sur gélose Chapman préalablement fondu, coulée en boîtes de pétri et bien séchée.

Les boîtes de Chapman ainsiensemencées seront incubées à leur tour à 37 °C pendant 24 à 48 h. après ce délai, repérer les colonies suspectes à savoir les colonies de taille moyenne, lisse, brillantes, pigmentés en jaune et pourvues d'une coagulase et d'une catalase.

Expression des résultats

- Si à la dilution 10^{-3} , le tube a noirci au bout de 24 h d'incubation, mais à l'isolement sur Chapman il n'y a pas des colonies caractéristiques ; ce tube est considéré comme négatif.
- Si par contre à la dilution 10^{-1} , le tube a noirci au bout de 24 h d'incubation, et à l'isolement, il y a des colonies caractéristiques, il faut tenir compte de la dilution en question, car le nombre réel de *Staphylococcus aureus* correspond à l'inverse de la

dilution. Dans ce cas, il y a donc 10 *Staphylococcus aureus* par g ou ml du produit à analyser.



Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*.

4. Recherche clostridium sulfito – réducteurs

• Préparation du milieu

Au moment de l'emploi, faire fondre un flacon de gélose viande foie (VF), le refroidir dans un bain d'eau à 45 °C puis ajouter une ampoule d'Alun de fer et une ampoule de sulfate de sodium. Mélanger soigneusement et aseptiquement.

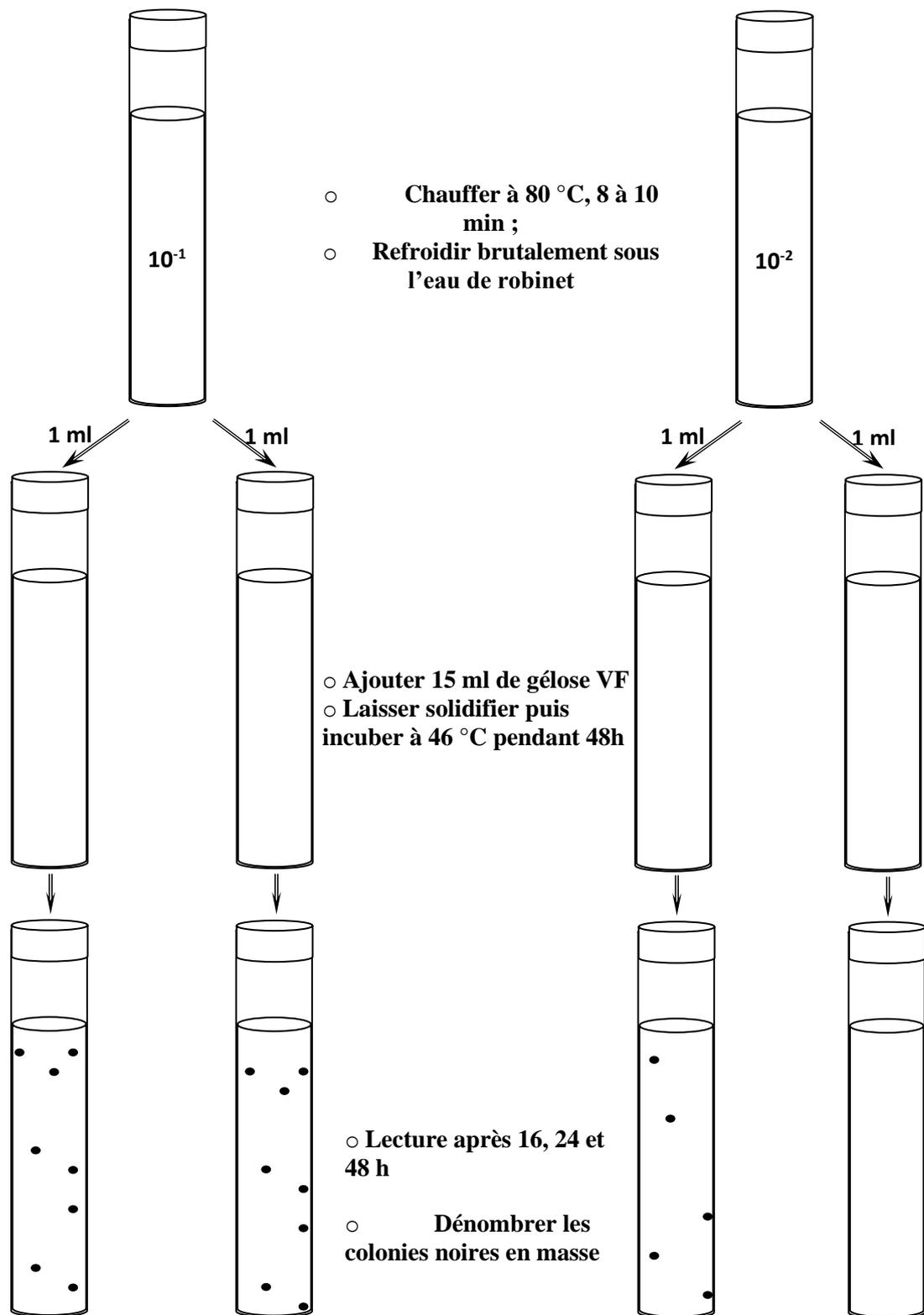
Le milieu est ainsi prêt à l'emploi, mais il faut le maintenir dans une étuve à 45 °C jusqu'au moment de l'utilisation.

• Enrichissement

Les tubes contenant les dilutions 10^{-2} et 10^{-1} seront soumis :

D'abord à un chauffage à 80 °C pendant 8 à 10 min, Puis à un refroidissement immédiat sous courant d'eau, dans le but d'éliminer les formes végétatives et garder uniquement les formes sporulées.

A partir de ces conditions, porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution en double dans deux tubes à vis stériles de 16 mm de diamètre, puis ajouter environ 15 ml de gélose VF prêt à l'emploi. Laisser sur la paillasse pendant 30 min.



Recherche et dénombrement des spores de *Clostridium sulfito-réducteurs*

Annexe 8



Séparation de lactosérum



La pâte fraîche



La crème fraîche.



Fromage frais de lait de vache.



Fromage frais de lait de chèvre

Annexe 9

Panel de dégustation

FICHE DE DEGUSTATION DE FROMAGE						
Dénomination :	Type de pâte :			Région :		
A S P E C T	C O L U R	<input type="checkbox"/> Blanc <input type="checkbox"/> Blanc cassé <input type="checkbox"/> Cendré <input type="checkbox"/> Crème <input type="checkbox"/> Gris <input type="checkbox"/> Ocre <input type="checkbox"/> Orange <input type="checkbox"/> Bleu <input type="checkbox"/> Noir <input type="checkbox"/> Autre :			C R Û T E	<input type="checkbox"/> Bosselé <input type="checkbox"/> Crevasse <input type="checkbox"/> Irrégulière <input type="checkbox"/> Régulière <input type="checkbox"/> Marque de
		Text ure	<input type="checkbox"/> Serré <input type="checkbox"/> Compacte <input type="checkbox"/> Granuleux <input type="checkbox"/> Lisse <input type="checkbox"/> Luisant <input type="checkbox"/> Net <input type="checkbox"/> Dissocié <input type="checkbox"/> Coulant <input type="checkbox"/> Crevasse <input type="checkbox"/> Autre :			<input type="checkbox"/> Terne <input type="checkbox"/> Brillante <input type="checkbox"/> Boutonnée <input type="checkbox"/> Fleurie <input type="checkbox"/> Autre :
O D E U R S	<input type="checkbox"/> Acide <input type="checkbox"/> Amande grillée <input type="checkbox"/> Ammoniaque <input type="checkbox"/> Boishumide <input type="checkbox"/> Champignon <input type="checkbox"/> Florale lactique <input type="checkbox"/> Levure <input type="checkbox"/> Noisette <input type="checkbox"/> Piquant <input type="checkbox"/> Terre mouillée <input type="checkbox"/> Autre :					
	Acide	A R Ô M E S	<input type="checkbox"/> Anonyme <input type="checkbox"/> Beurre fondu <input type="checkbox"/> Rance <input type="checkbox"/> Champignon <input type="checkbox"/> Foin <input type="checkbox"/> Balsamique <input type="checkbox"/> Levure <input type="checkbox"/> Toile humide <input type="checkbox"/> Noix <input type="checkbox"/> Bouqueté <input type="checkbox"/> Fruité <input type="checkbox"/> Autre :			
Amer						
Salé						
Sucré						
G O Û T						



Physico-chemical characterization of a milk-clotting fraction extracted from turkey (*Meleagris gallopavo*) proventriculus

B. Mekhaneg^{a,*}, J.-M. Girardet^{b,c}, G. Humbert^{b,c}, F. Saulnier^d, C. Poirson^{b,c}, M.-M. Bellal^a

^a Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA), Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine, El Harrach, 16000 Alger, Algeria

^b Université de Lorraine, Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA), Equipe Protéolyse et Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

^c INRA, UR AFPA, Unité Sous Contrat 340, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

^d Université de Lorraine, Service Commun de Séquence des Protéines (SCSP), Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Clotting activity
Meleagris gallopavo
Pepsin-like
Proventriculus
Turkey

ABSTRACT

Valorization of avian by-products such as turkey (*Meleagris gallopavo*) proventriculus in the preparation of milk clotting enzymes constitutes an alternative to commercial rennet. The clotting enzyme of *Meleagris gallopavo* has been prepared by ammonium sulfate at 50% saturation followed by purification by cation-exchange fast protein liquid chromatography (FPLC), and determination of the clotting protease activity performed on milk incubated at 35 °C. The clotting fractions are concentrated and dialyzed against Tris/HCl pH 7.0 through a membrane with cutoff 8000 Da, and separated by anion-exchange FPLC. The coagulating fractions obtained by cation-exchange chromatography are also separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography, which revealed only one fraction able to coagulate milk. Electrophoresis analysis revealed a band with apparent molecular mass of 36.5 kDa and seemed to correspond to pepsin-like enzyme according to primary sequence alignment analyses. Maximal clotting activity was obtained for optimal conditions of temperature of 55 °C and pH 5.4.

1. Introduction

The world milk production has increased approximately to 494 Million Metric Tons (MMT) in 2016 (USDA report, 2016) due to the high demand on cheese this last year (around 18.5 MMT). Calf rennet is composed of 80% chymosin and 20% pepsin and is the most ancient milk clotting enzyme. It is still the most widely used in cheese making procedures. The coagulating properties of calf rennet are mainly due to the chymosin, an aspartic protease considered to be the best coagulating agent because of its high specificity for the cleavage of κ-casein Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ peptide bond (Esposito, Di Pierro, Dejonghe, Mariniello, & Porta, 2016).

Pepsinogens are synthesized in gastric mucosa and autocatalytically converted into their corresponding active form pepsins in the acidic environment of gastric juice, by releasing the NH₂-terminal activation segments. So far, five groups of pepsinogens have been classified, namely pepsinogens A, B and F, progastricsin (or propepsin C), and prochymosin, which mainly exists in the gastric juice of foetal and newborn mammals (Kageyama, 2002). Pepsins have in common the property to cleave protein substrates, such as denatured haemoglobin, serum albumin and suitable oligopeptides, under acidic pH conditions (Wu et al., 2009).

The increase of calf rennet price led to investigate new milk clotting enzymes able to adequately replace calf rennet in the manufacture of dairy products (Cavalcanti, Teixeira, Lima Filho, & Porto, 2004; Grozdanovic, Burazer, & Gavrovic-Jankulovic, 2013) when possible. Different microbial alternatives are used for the production of chymosin, but these techniques are not too suitable for quality cheese production because they produce a bitter taste (Kumar, Sharma, Kumar Mohanty, Grover, & Kumar Batish, 2006; Walsh & Li, 2000). Another striking feature that hinders the use of microbial rennet is their high thermal stability.

Genetic engineering is employed to produce genetically modified microorganisms capable of synthesizing recombinant chymosin, chemically and functionally identical to the native enzyme produced by ruminants (Espinoza-Molina, Acosta-Muniz, Sepulveda, Zamudio-Flores, & Rios-Velasco, 2016). Calf chymosin (genetic variant B) is widely produced through recombinant DNA technology by microorganisms such as *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces lactis*, other recombinant chymosins are obtained from goat and buffalo (Corredig & Salvatore, 2016).

Proteolytic activity surviving at high temperatures (higher than normal pasteurization temperature) causes undesired proteolysis, resulting in flavour loss and bitter taste (Kurutahalli, Vishwanatha, Appu

* Corresponding author at: Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA), El Harrach, 16000 Alger, Algeria
E-mail address: b.mekhaneg@yahoo.fr (B. Mekhaneg).

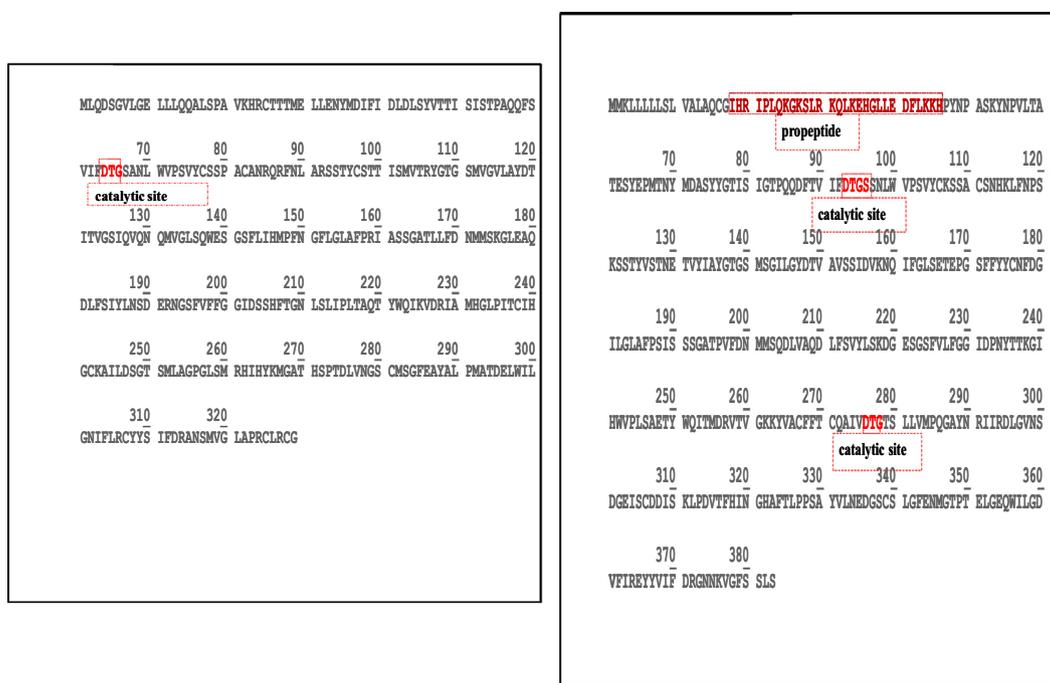


Fig. 1. Predicted amino acid sequences of (a) pepsin A of turkey (*Meleagris gallopavo*), NCBI reference sequence XP_010709067 and (b) pepsin A-like enzyme of turkey, NCBI reference sequence: XP_010709199.

Rao, & Singh, 2010). *Pseudomonas* genus produces extracellular proteases, which are resistant toward ultra-high temperature (UHT) treatment, and are responsible for milk spoilage, resulting in bitter flavour and gelation of UHT milk during storage (Mateos et al., 2015).

Several coagulating enzymes have been identified in different plant species; however many of enzyme preparations are deemed unsuitable because they produce extremely bitter cheeses (Egito et al., 2007; Beigomi et al., 2014). The excessive proteolytic activities of most plant coagulants have limited their use in cheese manufacturing due to lower yields of cheese, bitter flavour and texture defects. The search for new potential milk-clotting enzymes from plants still continues in order to meet the increasing global demand for diversified and good quality cheese production (Shah, Mir, & Paray, 2014).

The avian proteases from chicken (Bohak, 1969), quail (Esumi, Yasugi, Takeo, & Fujiki, 1980), duck (Pichová & Kostka, 1990), and turkey (Temiz, Aykut, Okumus, & Turhan, 2007; Temiz, Okumus, Aykut, Dervisoglu, & Yazici, 2008) are considered as adequate sources of pepsin enzymes. The pepsin protease extracted from chicken proventriculus lead making cheddar if maturation does not exceed three months (Findlay, Stanley, & Emmons, 1984). However, the use of pepsin enzyme of chicken in the manufacture of certain cooked cheeses such as Emmental and Kashkaval has yielded satisfactory results (Gordin & Rosenthal, 1978). Indeed, these cheeses showed a quality comparable to that of cheese of the same type prepared with rennet.

However, there is little information on the purification and characterization of turkey's pepsin enzyme (*Meleagris gallopavo*). It is thus interesting to investigate such a pepsin enzyme from turkey as rennet for cheese preparation from cow's milk. The aim of the present study was to purify and characterize clotting enzyme from turkey's proventriculus, a by-product to valorise.

2. Materials & methods

2.1. Biological materials

Raw proventriculi were extracted from the digestive system of the turkey (*Meleagris gallopavo*). The study focused on 500 g of fresh sample

rid of its fat, washed several times in distilled water, cut and conditioned in sealed plastic bags and, finally, stored at -20°C until used.

2.2. Enzyme extraction

The extraction was performed according to the method of Tsouli (1974) with some modifications. The proventriculus tissue was milled in 5% NaCl and 0.2% boric acid in a ratio 1/2 w/v (weight/volume) of extraction mixture, frozen at -18°C for 24 h, then thawing and macerating at 4°C under gentle agitation for 24 h, and the mixture obtained was filtered on a gauze strip and the filtrate was centrifuged at 3200g at 4°C for 20 min and finally, the recovered supernatant was filtered on filter paper. The pH of the crude enzymatic extract was adjusted to 2.0 with 0.1 M HCl and left to stand for 15 min at room temperature and then readjusted to pH 5.0 with 0.1 M NaOH.

2.3. Fast protein liquid chromatography (FPLC) and electrophoretic control

The pre-purification was carried out with successive steps of ammonium sulfate precipitation at 25, 50, and 75% saturation (100% saturation corresponds to 760 g/L of ammonium sulfate at 25°C) on crude enzyme extract. The pellet obtained with 50% of ammonium sulfate saturation was suspended in the sodium formiate at pH 3.5, then purified by FPLC onto a cation-exchange Hi-Trap SP-FF column connected to an ÄKTA-Purifier apparatus and a 0–0.5 M NaCl gradient was applied for 20 min at a flow rate of 1 mL min^{-1} . Coagulating fractions were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 12% acrylamide resolving gel according to the method of Laemmli (1970) carried out with a Mini-Protean Tetra-cell (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Fractions displaying clotting activity were pooled and dialyzed against Tris/HCl buffer at pH 7.0 on a membrane with cutoff 8000 Da for 24 h in a cold room maintained at 4°C . The dialyzed solution was then loaded onto an anion-exchange Mono Q HR 5/5 column connected to the ÄKTA-Purifier apparatus. A 0–0.5 M NaCl gradient was applied for 20 min at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The clotting fractions were then analyzed by SDS-PAGE.

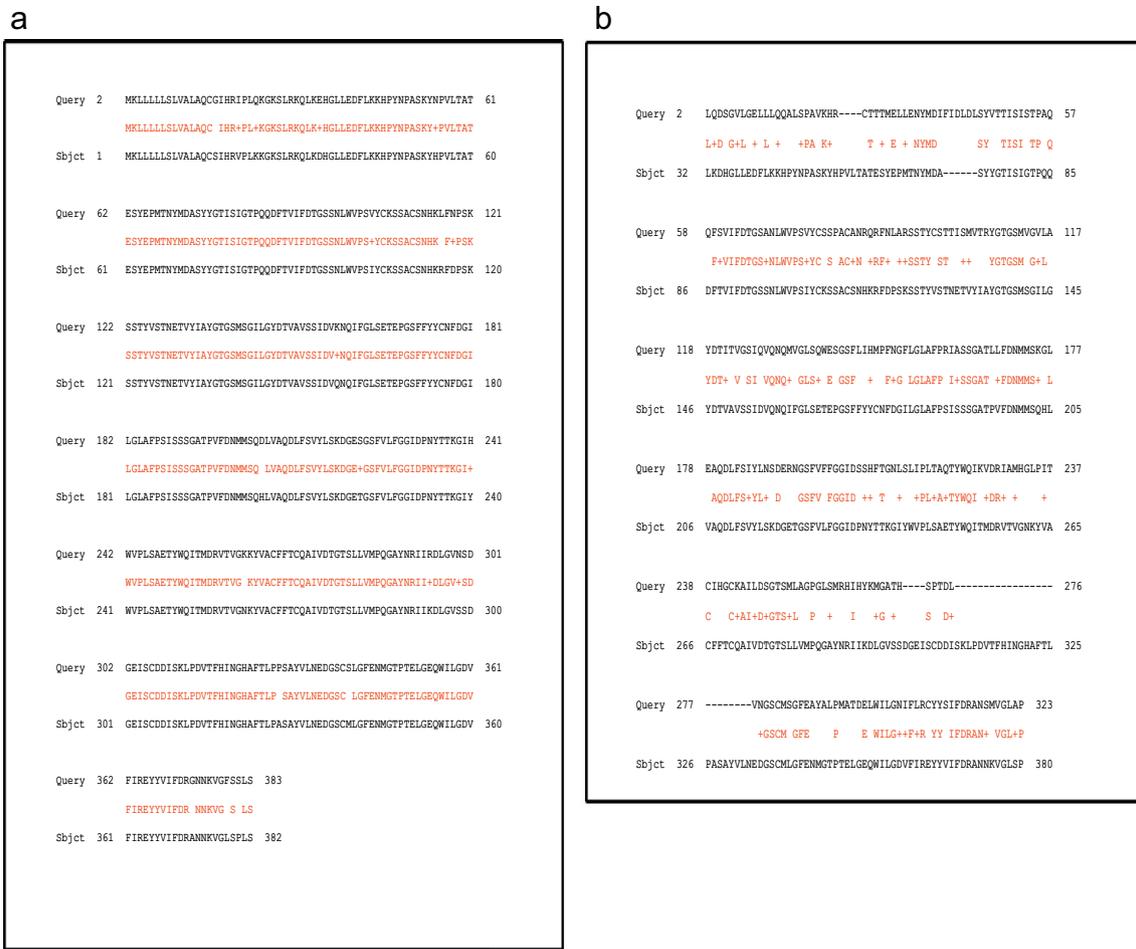


Fig. 2. Alignments of the amino acid sequences performed with the BLAST program available at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> of (a) pepsin A of turkey (*Meleagris gallopavo*) XP_010709067 and the precursor of pepsin A of chicken (*Gallus gallus*) NP_990209, (b) the pepsin A-like protein of turkey XP_010709199 and the precursor of pepsin A of chicken NP_990209, (c) pepsin A of turkey XP_010709067 and partial sequence of pepsin A of wild duck (*Anas platyrhynchos*) (GenBank ID: EOA94711), and (d) the pepsin A-like enzyme of turkey XP_010709199 and the partial sequence of pepsin A of wild duck (GenBank ID: EOA94711).

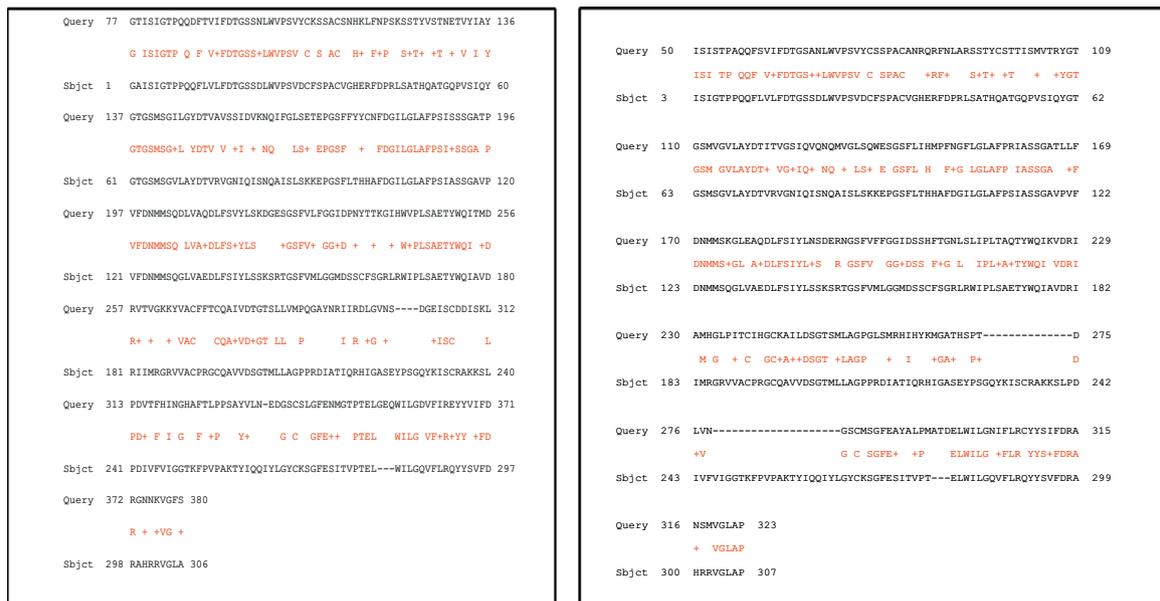


Fig. 2. (continued)

Table 1
Summary of purification steps of milk clotting enzyme of turkey (*Meleagris gallopavo*).

Purification step	Clotting activity (RU)	Amount of total protein (mg mL ⁻¹)	Specific activity (RU mg ⁻¹)	Purification factor	Purification yield (%)
Crude extract	11.1 ± 0.2	9.20	1.2 ± 0.1	1	100
Ammonium sulfate (50%)	3.2 ± 0.4	2.11	1.5 ± 0.2	1.26	29
Cation-exchange FPLC					
Fraction 12	2.2 ± 0.3	1.14	1.9 ± 0.2	1.27	69
Fraction 13	2.4 ± 0.6	0.95	2.5 ± 0.6	1.28	107
Fraction 14	2.8 ± 0.6	1.08	2.6 ± 0.6	1.02	116
Fraction 15	2.9 ± 0.6	1.41	2.1 ± 0.4	0.81	106
Fraction 16	2.6 ± 0.1	0.95	2.8 ± 0.1	1.32	89
Anion-exchange FPLC					
Fraction 22	0.4 ± 0.1	0.105	3.3 ± 0.8	1.20	13
Fraction 23	0.5 ± 0.2	0.115	4.6 ± 2.0	1.38	151

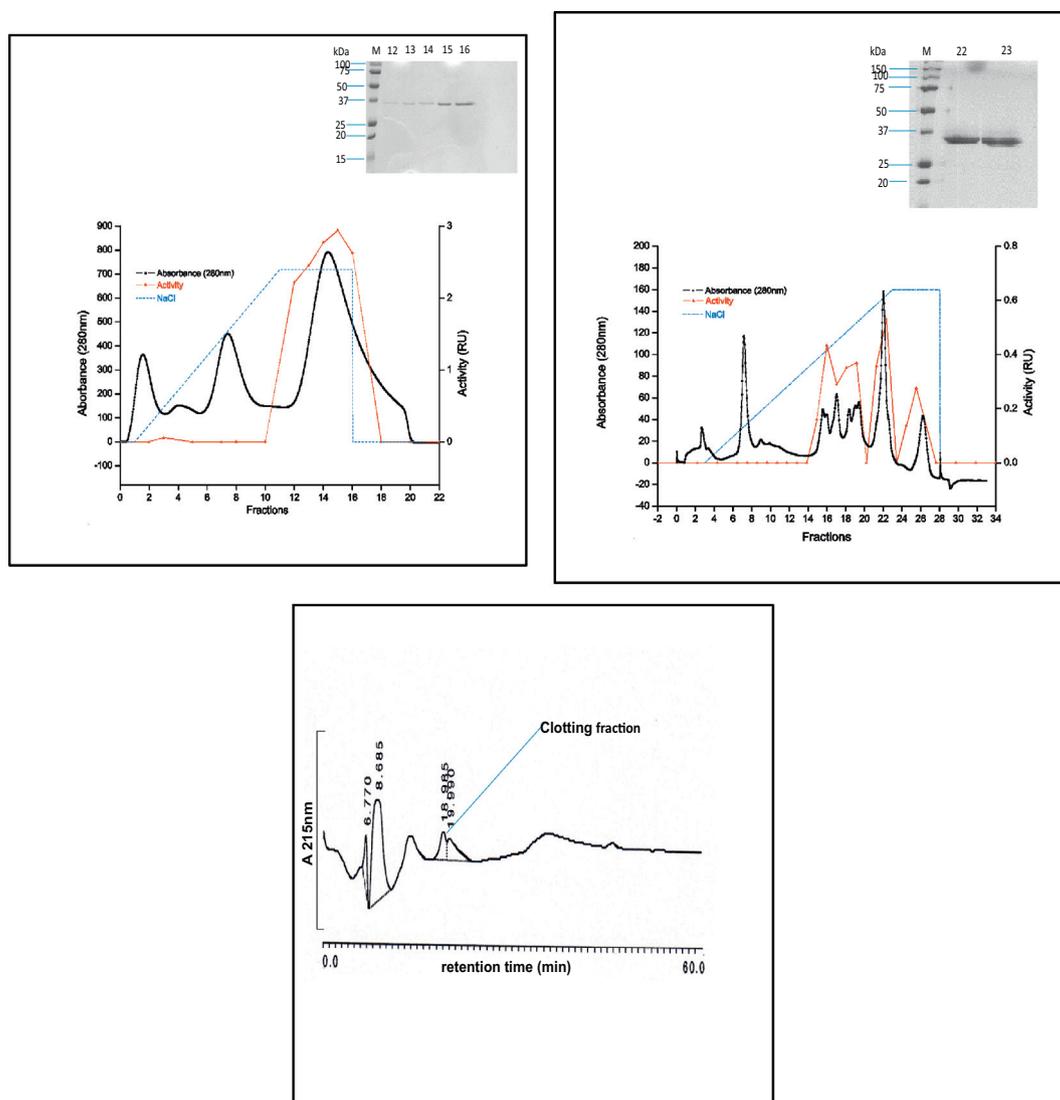


Fig. 3. (a) Elution profile onto cation-exchange column Hi-Trap SP-FF of clotting extract prepared from turkey's proventriculus after precipitation with ammonium sulfate at 50% saturation and SDS-PAGE control of the active fractions 12–16. (b) Elution profile onto anion-exchange column Mono Q HR 5/5 of clotting fractions 12–16 previously collected from the fractionation by cation-exchange FPLC and pooled and SDS-PAGE control of the active fractions 22 and 23. M: molecular mass standards. (c) Chromatographic profile obtained by RP-HPLC separation of the clotting fractions 12–16 previously collected from the fractionation by cation-exchange FPLC and pooled.

2.4. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

To identify different possible active forms in the enzyme extract, the clotting fractions from the cation-exchange chromatography were

separated by RP-HPLC on a narrowbore PTH-C18 column (220 × 2.1 mm, 5- μ m particle size; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) connected to the Biopolymer Micro purification and Analysis System Model 172 (Applied Biosystems). A volume of sample of 200 μ L

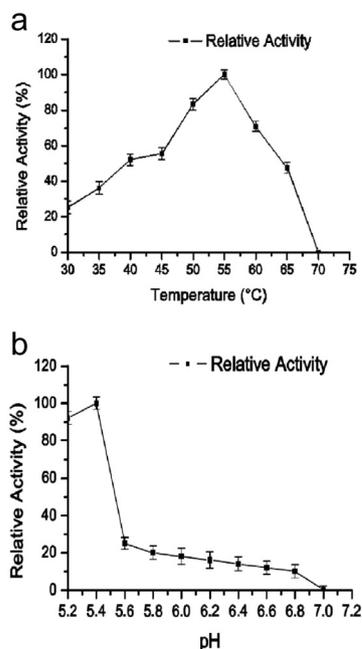


Fig. 4. Effect of temperature (a) and pH (b) on the activity of clotting fraction of Turkey proventriculus.

was loaded onto the column. A 2–70% acetonitrile gradient containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid was applied for 60 min. The flow rate was $250 \mu\text{L min}^{-1}$ and detection was carried out at 215 nm. Fractions were collected and submitted to coagulation test as described below.

2.5. Determination of protein concentration

The protein concentration was determined according to the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin as the standard.

2.6. Determination of the enzymatic activity

The milk clotting activity expressed as rennet unit (RU) was determined according to Berridge (1945) as described by Benchiheub, Benkahoul, Bellil, and Mechakra Maza (2014). Briefly, 1 mL of crude extract or fractions was added to 10 mL of Berridge substrate (12 g low heat spray dried skim milk powder in 100 mL of 0.01 M CaCl_2), mixed thoroughly and incubated at 30 °C. The time required for the first appearance of the particles was discernible recorded. One unit of milk clotting activity was defined as the amount of enzyme required to clot 10 mL of milk in 100 s at 30 °C.

$$\text{RU} = \frac{10 V}{\text{Tc} Q} \quad (1)$$

where:RU: Rennet Unit; V: volume of standard substrate (mL); Q: volume (mL) of crude gastric extract (CGE) or chromatographic fraction; Tc: clotting time (s).

2.7. Optimal temperature and pH determination

The influence of temperature on the activity of the acidic protease was determined at various temperature intervals (30–70 °C).

The pH of the Berridge substrate was adjusted in range of 5.2 to 7.0 with solutions of 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH. After 20 min of incubation at room temperature, the pH was measured and the milk clotting time was determined.

2.8. Statistical analysis

The enzyme activity, as well as the determination of optimal temperature and pH, were performed in triplicate and the results are presented as mean \pm standard deviation.

3. Results & discussion

Poultry viscera, especially turkey proventriculus, are a source of milk coagulant proteases, currently under-exploited and easy to obtain throughout the year and require a better valuation in the cheese industry, unlike ruminant rennet, the availability of which is lower and the cost is greater.

Pepsin is one of the animal origin that has been tested for potential use as substitutes of rennet (Benyahia-Krid et al., 2017).

In this study, turkey proventriculus was used to purify milk clotting enzyme, the purification procedure developed in this study resulted in an active band with apparent molecular mass of 36.5 kDa, that is consistent with the molecular mass reported by Rao, Tanksale, Ghatge, and Deshpande (1998). Both animal and microbial milk clotting proteases belong to a class of acid aspartate proteases and have molecular masses between 30,000 to 40,000 kDa. However, the purification of the enzyme using ammonium sulfate is recommended for the enzyme preparation with excellent milk clotting properties. The presence of one active band of purified enzyme might be indicative of monomer protease. The specific activity in the crude extract increases from 1.2 to 4.6 after FPLC purification; this is explained by the elimination of the inactive proteins in the crude extract. The optimal pH for coagulation of turkey proventriculus milk is 5.4, which is close to that of the optimum rennet pH of 5.8 (Fox, 1969). According to Gordin and Rosenthal (1978), acidity of milk has been recognized as one of the critical parameters in cheese production.

Enzyme activity of milk clotting enzyme for turkey proventriculus was 55 °C, this parameter being of primary importance in cheese manufacturing (Gordin & Rosenthal, 1978).

However, the coagulating power of the milk by the enzyme of turkey proventriculus predisposes it to a favorable use in cheese making.

To this end, it remains to determine the interest of promoting the extraction and purification methods to constitute a better approach for an industrial production of the enzyme coagulating the milk of the proventriculus of the turkey.

3.1. Amino acid sequence analysis of *Meleagris gallopavo* pepsin-like enzyme

The translation of the genome of *Meleagris gallopavo* presents two predicted sequences that might correspond to pepsin-like enzymes.

The NCBI (National Center for Biotechnology Information) reference number for these predicted sequences are XP_010709067 and XP_010709199. The first one is characterized by the presence of a signal peptide Met¹–Gly¹⁷ and the presence of a propeptide that begins at residue Ile¹⁸ and ends at His⁴⁶, two predicted active sites 93–96 and 276–278 (Fig. 1a). The second sequence is characterized by the presence of a single active site (region 64–66) (Fig. 1b).

The predicted sequence of the pepsin-like enzyme of *Meleagris gallopavo* XP_010709067 was compared with the BLAST program available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> to that of the precursor of the pepsin-like enzyme of chicken (*Gallus gallus*) NP_990209 (Sakamoto, Saiga, & Yasugi, 1998) (Fig. 2a). The alignment shows amino acid identity of 95%, suggesting that the pepsin-like enzymes of turkey and chicken are very closely related, anticipating a high sequence/structure relationship between these enzymes. On another hand, the alignment of the turkey's pepsin-like enzyme XP_010709199 with that of chicken shows, however, a lower amino acid identity of 47% (Fig. 2b). The alignment of the sequences XP_010709067 and XP_010709199 with the

partial sequence of the pepsin A of wild duck (*Anas platyrhynchos*; GenBank accession number EOA94711) shows a same percentage of amino acid identity of 53% for both enzymes (Fig. 2c and Fig. 2d). According to the primary sequence alignment analyses of the two pepsin-like sequences of turkey XP_010709067 and XP_010709199, it was thought that the predicted sequence XP_010709067 seemed to be the correct one, the second XP_010709199 might not correspond to any expressed protein.

3.2. Purification of turkey's milk clotting enzyme

Purification of the clotting protease from proventriculus of turkey is summarized on Table 1. The extraction of crude extract was performed by maceration of the proventriculus in 5% (w/v) NaCl and displayed a clotting activity of 11.1 RU.

The process of extraction of milk clotting proteases from *Cynara cardunculus* L. in saline medium was already reported by Tsouli (1974) and confirmed by Beka et al. (2014). NaCl can play a role in the recovery of the enzyme. In fact, Beka et al. (2014) obtained a clotting activity for the crude extract of 2.43 U mL⁻¹ for a concentration of 5% NaCl, whereas Temiz et al. (2008) obtained a clotting activity of 7.83 U mL⁻¹ for a concentration of 10% NaCl. These results suggest that the appropriate method for the extraction of coagulating enzymes greatly depends on the NaCl concentration.

The purification was achieved by flocculation of clotting materials from the crude extract with ammonium sulfate at 50% saturation, as the fraction precipitated at 25% saturation of ammonium sulfate presented no clotting activity, and as the fraction precipitated at 75% showed only a low activity of 0.1 RU. In the present work, the extract precipitated in 50% ammonium sulfate displayed a clotting activity of ca. 3.2 RU and specific activity of 1.5 RU mg⁻¹ higher than the initial specific activity of the crude extract of 1.2 RU mg⁻¹ (purification factor of 1.26 and purification yield of 29%). El-Beltagy, El-Adawy, Rahma, and El-Bedawey (2004) obtained a clotting fraction precipitated by ammonium sulfate between 40 and 60% saturation from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*), with a specific activity of 0.25 U mg⁻¹ protein, a purification factor of 4.16, and a purification yield of 42%. Similarly, Zhou, Fu, Zhang, Su, and Cao (2007) have prepared a clotting enzyme extract by ammonium sulfate precipitation between 20 and 60% saturation from sea bream (*Sparus latus Houttuyn*), with a specific activity of 3.0 U mg⁻¹ protein, a purification factor of 1.4, and a purification yield of 64%.

The chromatographic profile obtained by cation-exchange FPLC (Fig. 3a) showed 4 peaks, and clotting activity was found in the collected fractions 12–16 eluted at 0.4–0.5 M NaCl and corresponding to materials the most strongly adsorbed on the column (fourth peak).

The active fractions were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 3a) and a single band with an apparent molecular mass of 36.5 kDa was unveiled, and agreed well with the results of Temiz et al. (2007), who found a same apparent molecular mass of 36 kDa for a clotting enzyme partially purified. Moreover, this apparent molecular mass was in accordance with the length of the polypeptide chain of the predicted mature protein XP_010709067 (337 amino acids). The mature enzyme displays a molecular mass of 36,831.18 Da and isoelectric point of 4.37 (determined with the ProtParam program available at <https://www.expasy.org/proteomics>). In comparison, the mature chain of bovine pepsin A (NCBI reference sequence: NP_001001600) has a lower molecular mass of 34,646.02 Da (326 amino acid residues) and a more acid isoelectric point of 3.34.

The clotting fractions 12–16 were pooled and dialyzed prior to a second step of separation by anion-exchange FPLC. The anion-exchange chromatographic profile revealed at least seven distinct peaks (Fig. 3b). Fractions 22 and 23 eluted at 0.44–0.47 M NaCl and corresponding to the major peak showed a clotting activity of 0.4 and 0.5 RU, respectively, and displayed by SDS-PAGE a single band with apparent molecular mass of 36.5 kDa (Fig. 3b).

3.3. RP-HPLC of fractions obtained by cation-exchange FPLC

The fractions 12–16 collected from the previous cation-exchange chromatography step were separated onto a narrowbore C18 column in order to improve the purification of the 36.5-kDa clotting enzyme and to determine if other active form of clotting enzyme might exist. However, the chromatographic profile shows four peaks among which only the third peak at retention time of 18.9 min corresponded to a fraction with a clotting activity of 0.1 RU (Fig. 3c).

3.4. Determination of optimal temperature and pH

Fig. 4a shows the influence of different temperatures on the protease activity. The relative activity increased with the temperature from 30 to 55 °C and then decreased; however no activity was detected at 70 °C, the optimum temperature for calf rennet was found at 40 °C (Fox, 1969). The purified protease had the highest activity at pH 5.4 under the experimental conditions used and it then decreased with increasing of pH (Fig. 4b). Over pH 6.0, more than 50% of the relative activity was lost and no activity was detected at pH 7.0. The optimum pH for the milk clotting was found at pH 4.0 for duck pepsin (Pichová & Kostka, 1990) and at pH 5.8 for the calf rennet (Fox, 1969).

4. Conclusions

In the present study, a fraction of enzyme was purified for the first time from proventriculus of turkey. A fraction highly enriched in clotting enzyme was recovered with high purity by chromatography methods and turkey enzyme can advantageously replace calf rennet as it displayed a milk clotting activity. Its apparent molecular mass was 36.5 kDa in good agreement with its predicted sequence (337 amino acid residues) found in the NCBI protein database. Future investigations will focus on the molecular characterization of the coagulating enzyme.

Acknowledgments

Financial support from the Algerian Ministry of Higher Education (340/2013) is gratefully acknowledged. The authors thank Dr. Bentridi Salah Eddine for his help in preparing curves.

References

- Beigomi, M., Mohammadifar, M. A., Hashemi, M., Rohani, M. G., Senthil, K., & Valizadeh, M. (2014). Biochemical and rheological characterization of a protease from fruits of *Withania coagulans* with a milk-clotting activity. *Food Science and Biotechnology*, 23, 1805–1813. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-014-0247-5>.
- Beka, R. G., Krier, F., Botquin, M., Guiama, V. D., Donn, P., Libouga, D. G., ... Vercaigne-Marko, D. (2014). Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. *International Dairy Journal*, 34, 25–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.013>.
- Benchiheb, M., Benkahoul, M., Bellil, I., & Mechakra Maza, A. (2014). Milk-clotting properties and specific hydrolysis of caseins of the acid protease extracted from *Scolymus maculatus* flowers. *International Journal of Advanced Research*, 2, 357–365. http://www.journalijar.com/uploads/446_IJAR-2464.pdf.
- Benyahia-Krid, F. A., Adoui, F., Aissaoui-Zitoun, O., Boughellout, H., Siar, E.-H., Zikiou, A., & Zidoune, M. N. (2017). Effect of sodium chloride and incision on the chicken pepsin coagulant activity extracted from proventriculus, dried under partial vacuum. *Advances in Dairy Research*, 5, 3. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-888X.1000187>.
- Berridge, N. J. (1945). The purification and crystallization of rennin. *The Biochemical Journal*, 39, 179–187.
- Bohak, Z. (1969). Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 4638–4648.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Cavalcanti, M. T. H., Teixeira, M. F. S., Lima Filho, J. L., & Porto, A. L. F. (2004). Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiaopsis* sp. *Bioresource Technology*, 93, 29–35.
- Corredig, M., & Salvatore, E. (2016). Enzymatic coagulation of milk. In P. L. H. McSweeney, & J. A. O'Mahony (Eds.). *Advanced dairy chemistry, volume 1B, proteins: Applied aspects fourth edition* (pp. 287–307). http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_11.
- Egito, A. S., Girardet, J. M., Laguna, L. E., Poiron, C., Mollé, D., Miclo, L., ... Gaillard, J. L.

- (2007). Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. *International Dairy Journal*, 17, 816–825. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.012>.
- El-Beltagy, A. E., El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., & El-Bedawey, A. A. (2004). Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chemistry*, 86, 33–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.009>.
- Espinoza-Molina, J. A., Acosta-Muniz, C. H., Sepulveda, D. R., Zamudio-Flores, P. B., & Rios-Velasco, C. (2016). Codon optimization of the “Bos Taurus Chymosin” gene for the production of recombinant Chymosin in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 58, 657–664.
- Esposito, M., Di Pierro, P., Dejonghe, W., Mariniello, L., & Porta, R. (2016). Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food Chemistry*, 204, 115–121.
- Esumi, H., Yasugi, S., Takeo, M., & Fujiki, H. (1980). Purification and characterization of a pepsinogen and its pepsin from proventriculus of the Japanese quail. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Enzymology*, 611, 363–370. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2744\(80\)90073-X](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2744(80)90073-X).
- Findlay, C. J., Stanley, D. W., & Emmons, D. B. (1984). Chicken pepsin as a rennet substitute. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 17, 97–101. [http://dx.doi.org/10.1016/S0315-5463\(84\)72363-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0315-5463(84)72363-7).
- Fox, P. F. (1969). Influence of temperature and pH on the proteolytic activity of rennet extract. *Journal of Dairy Science*, 52, 1214–1218. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86727-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86727-5).
- Gordin, S., & Rosenthal, I. (1978). Efficacy of chicken pepsin as milk clotting enzyme. *Journal of Food Protection*, 41, 684–688. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-41.9.684>.
- Grozdanovic, M. M., Burazer, L., & Gavrovic-Jankulovic, M. (2013). Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. *International Dairy Journal*, 32, 46–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.03.001>.
- Kageyama, T. (2002). Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: Structure, function, evolution, and development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 288–306.
- Kumar, A., Sharma, J., Kumar Mohanty, A., Grover, S., & Kumar Batish, V. (2006). Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 145, 108–113.
- Kurutahalli, S., Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., & Singh, S. A. (2010). Production and characterization of a milk-clotting enzyme from (*Aspergillus oryzae*) MTCC 5341. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1849–1859.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Mateos, A., Guyard-Nicodeme, M., Bagliniere, F., Jardin, J., Gaucheron, F., Dary, A., ... Gaillard, J.-L. (2015). Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *International Dairy Journal*, 49, 78–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.008>.
- Pichová, I., & Kostka, V. (1990). Molecular characteristics of pepsinogen and pepsin from duck glandular stomach. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97(B), 89–94. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(90\)90183-T](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(90)90183-T).
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597–635 (PMID: 9729602).
- Sakamoto, N., Saiga, H., & Yasugi, S. (1998). Analysis of temporal expression pattern and cis-regulatory sequences of chicken pepsinogen A and C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250, 420–424.
- Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheese making: A review. *Dairy Science & Technology*, 94, 5–16. <http://dx.doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3>.
- Temiz, H., Aykut, U., Okumus, E., & Turhan, S. (2007). The partial purification and properties of pepsin obtained from Turkey proventriculus. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12, 450–456. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02931070>.
- Temiz, H., Okumus, E., Aykut, U., Dervisoglu, M., & Yazici, F. (2008). Partial purification of pepsin from Turkey proventriculus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1851–1855. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-008-9678-6>.
- Tsouli, J. (1974). Etude comparée de l'activité enzymatique de 3 variétés d'artichauts du genre *Cinara Cardunculus* L sur la coagulation du lait. Le Lait, INRA Editions. 54, 415–421. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00928660>.
- USDA, report (2016). *United States department of agriculture foreign agricultural service. Dairy: world market and trade*. 16–18. <https://www.fas.usda.gov/data/dairy-world-markets-and-trade> (report Dec 2016).
- Walsh, M. K., & Li, X. (2000). Thermal stability of acid proteinases. *The Journal of Dairy Research*, 67, 637–640.
- Wu, T., Sun, L.-C., Du, C.-H., Cai, Q.-F., Zhang, Q.-B., Su, W.-J., & Cao, M.-J. (2009). Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food Chemistry*, 115, 137–142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.077>.
- Zhou, Q., Fu, X. P., Zhang, L. J., Su, W. J., & Cao, M. J. (2007). Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus Houuttyn*) pepsinogens and pepsins. *Food Chemistry*, 103, 795–801. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.021>.