

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

BOURAHLA BOUCHRA HALIMA

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et transformation laitières

THÈME

Effet de la substitution de la présure par la pepsine de poulet dans la coagulation des laits destinés à la transformation fromagère

Soutenu publiquement le 24/06/2020

Devant les membres du jury

| | | | |
|------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------|
| Président | Dr TAHLAITI Hafida | Maître de conférences | U. Mostaganem |
| Examineur | Dr RECHIDI SIDHOUM Nadra | Maître de conférences | U. Mostaganem |
| Encadreur | Dr DAHOU Abdelkader Elamine | Maître de conférences | U. Mostaganem |

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales

Année universitaire 2019-2020



Remerciements

Au terme de ce travail, je remercie le bon Dieu tout puissant qui m' a donné la force dans les moments difficiles d'éditer ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous les membres de ce jury, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Je remercie Mr DAHOU.A , mon encadreur, d'avoir accepté de diriger et de suivre constamment la progression de ce travail par ses suggestions, sa disponibilité et son aide.

Je tiens à remercier Mme TAHLAITI Hafida, d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance.

Je tiens aussi à remercier Mme RECHIDI SIDHOUM Nadra , l'examinatrice de ce mémoire.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous les enseignants du parcours à savoir : Mr Homrani , Mr Boucherf , Melle Meghoufel, Mlle Zouaoui, et l'ingénieur du laboratoire Mr Benharrat, qui par leurs compétences m' ont soutenu dans la poursuite de mes études.

C'est un plaisir autant qu'un devoir d'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin, pour la réalisation de ce modeste travail

Merci à tous et à toutes

Dédicaces

Je dédie ce travail à celle qui m'a transmis la vie, l'amour, le courage, à toi chère Maman toutes mes joies, mon amour et ma reconnaissance.

A Mon chère Papa de tout ce qu'il a fait pour moi ; par son soutien moral et économique.

A Mes chers frères : Yacine, Madjid.

A Ma chère sœur : Imen

A Ma grande mère

A mes tantes et oncles paternels et maternels, Mohamed, Ahmed , Zohra.

A mes cousines et cousins.

A mon amie intime, Kessas Rania qui m'a supporté durant ces cinq ans. et qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.

Je remercie vivement et profondément toutes les personnes ayant contribuées de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Je ne saurai oublier de remercier mes ami(e)s de promo 2020

Houria, Nawel, chafika, Mounia, Nesserine, feriel , Bachir , Smail pour les moments inoubliables avec eux.

& à la fin : À vous cher lecteur d'avoir consacré votre temps à lire ce travail

BOUCHRA

*Abr éviations, sigles, acronymes et
symboles*

Abbréviations, sigles, acronymes et symboles

D : degré Dornic.

Ac : Activité

AFNOR : Association française de normalisation.

ANOVA : Analyse de la variance.

CMP : caséinmacropeptide.

F : Force de l'enzyme.

FAO : Food and agriculture organisation.

FIL-IDF : Fédération internationale du lait.

LPC : lait pasteurisé conditionné

MG : matière grasse.

NPN : Azote non protéique (non proteique nitrogen).

NT : Azote total (total nitrogen).

O.N.S : Office National des Statistiques.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

p/v : poils / volume.

pH : potentiel hydrogène.

T : temps de floculation.

TCA : Acide trichloroacétique.

U.A.C : Unité d'activité coagulante.

UHT : ultra haute température.

UP : unité pepsine.

V' : Volume de l'extrait enzymatique.

κ : kappa, **κ-CN** : kappa caséine.

Liste des tableaux

Liste des tableaux

| Nº | Titre | Page |
|-------------------|--|-------------|
| Tableau 01 | Origine de différentes enzymes utilisés pour coaguler le lait..... | 18 |
| Tableau 02 | Qualité physico-chimique du lait expérimental utilisé..... | 49 |
| Tableau 03 | Qualité de l'extrait enzymatique « pepsine de poulet »..... | 50 |
| Tableau 04 | Teneur en azote non protéique libéré..... | 53 |

Liste des figures

Liste des figures

| Nº | Titre | Page |
|------------------|--|-------------|
| Figure 01 | Structure de pepsine..... | 21 |
| Figure 02 | Complexe stomacal du poulet..... | 23 |
| Figure 03 | Anatomie du tractus du poulet..... | 24 |
| Figure 04 | Phases de coagulation de lait et formation de réseau..... | 28 |
| Figure 05 | Hydrolyse de la caséine κ par la présure..... | 29 |
| Figure 06 | Formation d'un caillé présure par action de la présure sur les caséines du lait.. | 30 |
| Figure 07 | Facteurs influençant les paramètres de coagulation enzymatique du lait..... | 32 |
| Figure 08 | protocoles d'extraction de la pepsine de poulet..... | 40 |
| Figure 09 | Aspect du gel formé par les deux enzymes..... | 51 |
| Figure 10 | Aspect du coagulum formé après temps prise et activité enzymatique des 02 enzymes..... | 52 |
| Figure 11 | Cinétique de la libération du NPN pour une coagulation à base de pepsine..... | 54 |
| Figure 12 | Cinétique de la libération du NPN pour une coagulation à base de présure..... | 54 |

Liste des Annexes

Liste des Annexes

| | page |
|--|------|
| <u>Annexe A</u> : Caractéristiques techniques de la pr ésure..... | 59 |
| <u>Annexe B</u> : Caract éristiques techniques du lait écr éné en poudre..... | 60 |

Sommaire

Sommaire

| | page |
|---|-----------|
| Abréviation sigles, acronymes et symbole..... | III |
| Liste des tableaux..... | V |
| Liste des figures..... | VII |
| Liste des Annexes..... | IX |
| Introduction | 13 |
| | |
| Première partie : Revue de littérature | |
| Chapitre I Enzymes utilisés en fromagerie | 16 |
| Chapitre II Coagulation du lait et formation du gel fromager | 26 |
| | |
| Deuxième Partie : Partie expérimentale | |
| Chapitre I Matériel et méthodes..... | 37 |
| Chapitre II Résultats et discussion..... | 48 |
| Conclusion | 56 |
| Annexes..... | 58 |
| Références bibliographiques..... | 63 |
| Table de matières..... | 68 |

Introduction

Introduction

Consommé depuis 12 000 ans, le lait est un aliment universel, présent dans toutes les Civilisations. C'est l'aliment vital par excellence, à la fois ressource alimentaire et symbole de pureté, synonyme de richesse et d'abondance. Il a traversé les siècles et reste aujourd'hui un des aliments les plus ancrés dans notre consommation, les plus présents dans notre quotidien (Ghaoues, 2011).

L'intérêt majeur de la transformation du lait en fromage était de conserver les principaux constituants du lait (Eck & Gillis, 2006). La première étape de fabrication du fromage est la coagulation, considérée comme la clé de la réussite de n'importe quelle préparation. Elle consiste à la formation d'un gel suite à des modifications physico-chimiques intervenant sur les micelles de caséines. La présure de veau est l'agent coagulant le plus utilisé pour la coagulation du lait (Eck & Gillis, 2006).

Depuis quelques années, la présure, a connu une demande accrue en raison d'une augmentation régulière de la production mondiale du fromage. A l'inverse, son offre n'a pas toujours suivi cette demande en raison du prix élevé et aux difficultés d'approvisionnement, car la production du veau de lait est fluctuante alors que l'industrie fromagère nécessite un approvisionnement suffisant et régulier (Banga-Mboko et al, 2002).

Ces raisons ont fait que de nombreuses recherches ont été entreprises afin de trouver des succédanés efficaces et compétitifs utilisables industriellement. Parmi ces succédanés, les protéases d'origine végétale sont très anciennement utilisées dans des préparations traditionnelles telles que celles provenant de l'artichaut, du chardon et de latex du figuier.

D'autres enzymes ont été testées telles que les protéases d'origine fongique synthétisées par diverses espèces. Il existe aussi des succédanés d'origine animale tels que les pepsines porcines, bovines et les pepsines extraites des proventricules des volailles (Siar, 2014).

Bien que notre pays dispose d'un potentiel de production en succédanés capables de subvenir aux besoins en agents coagulants, l'Algérie reste dépendante des fournisseurs étrangers en matière d'approvisionnement et importe la quasi-totalité des quantités d'enzymes nécessaires à l'industrie fromagère. En 2011, environ 25 mille tonnes de fromages ont été vendus dans le marché algérien. Selon l'Office National des Statistique (O.N.S), l'industrie fromagère algérienne a utilisé près de 1,5 tonne de présure et ses substituts (Siar, 2014).

Introduction

Le coût élevé d'importation (plus de 102 millions de Dollars) ainsi que la dépendance de l'Algérie vis-à-vis des fournisseurs étrangers en matière d'approvisionnement en présure et/ou ses succédanés, nous ont encouragé à mettre en valeur des sources locales pour la production d'agents coagulants utilisables en industrie fromagère. Ces succédanés que nous envisageons d'étudier peuvent être obtenus à partir de matières premières locales et avec des prix convenables du fait que les abats de volailles sont disponibles et ne sont pas valorisés dans notre pays (Siar, 2014).

Notre travail a pour objectif de substituer la présure par la pepsine de poulet pour assurer la coagulation de notre lait expérimental. Pour répondre à cet objectif nous avons suivi les étapes suivantes :

- Extraction de la pepsine de poulet à partir des proventricules, et la caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu.
- Détermination de la cinétique de protéolyse lors de la phase de coagulation.

Revue de littérature

Chapitre I : Enzymes utilisées en fromagerie

1. Origine

La présure de veau est la préparation coagulante traditionnelle la plus utilisée pour la coagulation du lait. De moindres 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 appelé 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 création stomacale du mammifère adulte . Les deux enzymes sont excrétées à l'état de précurseurs inactifs (prochymosine et pro pepsine) ; après hydrolyse dans le milieu acide stomacal , l'activité protéolytique est accrue considérablement (Eck et Ghillis, 2006).

2. Les enzymes coagulantes

Les enzymes sont des catalyseurs biochimiques de nature protéique qui interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possibles, qu'elles accélèrent par activation spécifique dans des conditions douces de température et de pH (Cuvellier, 1993).

Ce sont des outils clés de la biotechnologie et de la bioindustrie. Un grand nombre d'enzymes protéolytiques, qui ont la propriété de coaguler le lait, sont présentés dans le Tableau 01 (Cuvellier, 1993).

2.1. Enzymes d'origine microbienne

L'industrie de fermentation est intéressée à la production de protéases susceptibles de remplacer la présure, à partir de microorganismes. Dans ce but, de multiples espèces de bactéries et de champignons inférieurs ont été étudiées afin de pallier la pénurie mondiale de présure (Abdellaoui, 2007).

Tableau 01 : Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait
(Boughellout, 2007).

| ORIGINES | | ENZYMES |
|--------------------|----------------------|-----------------------|
| Animaux | Ruminants | Chymosine + pepsine |
| | -Veaux | Chymosine + pepsine |
| | -Agneaux | Chymosine + pepsine |
| | -chevreaux | Chymosine + pepsine |
| | -Bovins adultes | |
| | Monogastrique | |
| | -Porcs | Pepsine |
| | Oiseaux | |
| | -Poulets | Pepsine |
| Végétaux | -Figuier (suc) | Ficine |
| | -Ananas (tige) | Broméline |
| | -Chardon, artichaut | Cardosines |
| | -Gaillet | Cyprosine |
| | -Courge... | |
| Moisissures | Endothiaparastica | Protéase |
| | -Mucopusillus | Protéase |
| | -Mucormeihei | Protéase |
| | -Aspergillus nige | Protéase |
| | | Chymosine (génétique) |
| Levures | Kiuyxeromyces lactis | Chymosine (génétique) |
| Bactéries | -Echerichia coli | Chymosine (génétique) |
| | -Bacillus subtilis | Subtiline (génétique) |

2.2. Enzymes d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale sont par ordre d'importance en technologie laitière : la papaïne extraite d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*), la broméïne extraite de l'ananas (*Ananas comosus*) et la ficine issue de la figue (*Ficus glabrata*) (Cuvellier, 1993).

2.3. Les enzymes d'origine animale

Ce sont des protéases gastriques. Les plus employées sont la présure (constituée principalement de chymosine et pepsine) bovine, porcine et de poulet. Ces protéases sont formées à partir d'un précurseur (zymogène), forme inactive, secrété par la muqueuse gastrique (Gordin *et al*, 1978 ; Payne , 2009).

3. la Présure

La dénomination présure est réservée à l'extrait soit liquide ou pâteux, soit pulvérisé ou comprimé après dessiccation provenant de la macération de caillottes de jeunes ruminants non sevrés. Les enzymes gastriques ainsi extraites appartiennent à la catégorie des endopeptidases actives à pH acide appelées protéases à aspartate ou encore protéases acides. La présure contient essentiellement deux protéases, l'une majeure constituée de chymosine et l'autre mineure constituée de pepsine bovine appelé pepsine A ou pepsine II. La présure contient aussi une autre protéase synthétisée au niveau de la caillotte en faible quantité ayant des propriétés intermédiaire entre la chymosine et la pepsine. Elle est appelé gastricine ou encore pepsine B ou pepsine I. L'extrait des caillottes est donc un mélange des trois enzymes précédentes. L'extraction de la présure nécessite la préparation des caillottes qui doivent être collectées, nettoyées, séchées puis conservées. Au moment de leur utilisation, elles doivent être découpées en fines lanières puis macérées dans une solution de chlorure de sodium (10 %) et de benzoate de sodium (1 %). Après 24 h de macération, la solution est ajustée avec de l'acide benzoïque au pH 4,3 pour activer l'enzyme à une température allant de 20 à 25 °C.

Les macérations trop longues provoquent le passage en solution d'une plus grande quantité de protéines et l'enrichissement en germes microbiens. Afin d'éliminer les protéines inactives et les mucilages en suspension par une défécation, le bouillon est additionné de phosphate trisodique. Cette opération élimine aussi une partie des microorganismes ce qui est important dans un milieu souvent très chargé en germes. Le bouillon est laissé ensuite au repos pendant deux heures, puis le pH est remonté par l'hydroxyde de sodium jusqu'à pH 5,5-5,6. La défécation et le réajustement de pH doivent se faire sous une forte agitation. Le jus brut est

alors filtré et est en général de couleur « jaune-or ». Un gramme de la solution de présure (après macération de la caillette et filtration) peut coaguler de 2 à 4 litres de lait. Dans 1 kg d'extrait de présure, il y a environ 0,7 grammes d'enzymes actives, le reste est de l'eau et du sel et parfois du sodium benzoate utilisé comme conservateur à des proportions de 0,5 % - 1 % (Alais, 1982).

La présure est un produit ancestral, déjà utilisé il y a plusieurs milliers d'années pour coaguler le lait. La présure est la base de tous les fromages. On peut dire que sans présure, il n'y a pas de fromage possible, car, s'il est vrai, qu'abandonné à lui-même le lait se coagule spontanément sous l'influence des ferments dont il s'infecte par le simple contact de l'air et des agrès de la fromagerie, qui transforment le sucre qu'il renferme en acide lactique, un tel caillé ne peut se travailler suivant la volonté du fromager en une sorte de fromage déterminé ce caillé restera sec, pulvérulent ; la pâte en sera cassante et ne se liera pas de façon à former la masse homogène demandée (Jean, 2015).

a. Succédanés de la présure

Depuis quelques années de nombreux facteurs ont favorisé les recherches de succédanés de la présure en vue de la fabrication du fromage. Tout produit de remplacement de la présure doit pouvoir coaguler le lait dans une zone de températures comprises entre 25 et 45 °C, et la durée de coagulation doit être inversement proportionnelle à la quantité de succédanés utilisés. Le choix de ces derniers pourra également dépendre de leur influence sur le rendement en caillebotte et sur les pertes de graisse dans le sérum. Tout procédé de préparation de produits destinés à remplacer la présure comporte généralement l'isolement de l'enzyme intéressante dans les produits de départ, au moyen d'une solution saline, d'alcool dilué, d'eau saturée de chloroforme ou de tout autre réactif approprié. Après centrifugation de la masse, l'extrait obtenu doit être purifié par dialyse, par précipitation au moyen de sel, ou par coagulation par l'alcool ou l'acétone. Lorsqu'on cherche à préparer des succédanés d'origine microbienne, les cultures utilisées comme matière de départ doivent être purifiées par les mêmes méthodes. Actuellement, les différents succédanés de la présure peuvent être divisés en trois groupes : les produits d'origine animale, les produits d'origine végétale et enfin les produits d'origine microbienne provenant de bactéries ou de champignons (Karesten, 1937 ; Polaina *et al.*, 2007).

4. Pepsine

La pepsine présente un intérêt particulier car elle a été la première enzyme découverte. Le nom de la pepsine a été donné par Theodor Schwann (1810 - 1882) en 1836, et il est devenu pepsine, le terme pour la digestion dans les écrits hippocratiques. Dans le milieu du XIX^{ème} siècle, les scientifiques ont montré que la pepsine a cassé les protéines en «peptones» (Fruton, 2002).

Cependant, la nature chimique et les propriétés des enzymes comme les protéines ne sont pas complètement comprises. Ce ne fut que John H. Northrop qui a pu cristalliser la pepsine en 1930, un exploit pour lequel il a partagé le prix Nobel en 1946 et que la nature protéique des enzymes a été créée (Manchester, 2004).

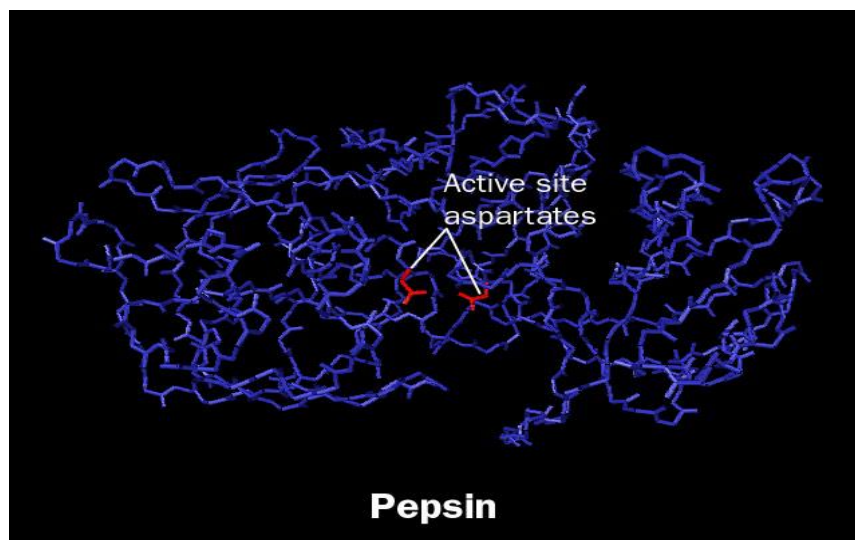


Figure 01 :Structure de pepsine (www.thingling.com).

4.1.La pepsine porcine

L'extraction et l'utilisation de la pepsine porcine ont débuté durant la première guerre mondiale pour pallier une pénurie de la présure, mais n'a été réellement industrialisée qu'à partir des années 60. Elle est extraite de l'estomac de porcs sous forme inactive, puis activée par acidification à pH 2, son poids moléculaire est de 34500 Da (Ernstrom, 1983 ; Payne ,2009) .

4.2.La pepsine bovine

C'est un des constituants mineurs normaux de la présure (Alais, 1974 ; Fox 1969) ; cité par (Ernstrom, 1983). Elle est extraite des caillottes de bovidés adultes, et son poids moléculaire est de 33400 Da.

L'activité coagulante de la pepsine bovine n'est pas aussi dépendante du pH que celle de la pepsine porcine, et peut coaguler le lait à des pH supérieurs à 6.9, son activité protéolytique est proche de celle de la présure. Elle est utilisée en fromagerie en mélange 50:50 avec la présure (Ramet, 1997).

4.3. La pepsine de poulet

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

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

Le pH optimum de la pepsine de poulet est de 2.8. L'enzyme reste stable à pH 8, et devient inactive à pH 8,5 (Bohak, 1969).

Les travaux de Green et al, 1984, ont montré que le cheddar préparé par un mélange de pepsine de poulet et de pepsine porcine était similaire à celui préparé par de la présure.

Gordin et Rosenthal, 1978, ont utilisé la pepsine de poulet pour la fabrication de l'emmental et un autre fromage traditionnel de type Kashkaval, qui sont des fromages à pâte molle ; ils ont obtenu de meilleurs résultats et des fromages de qualité comparables à ceux obtenus par la présure.

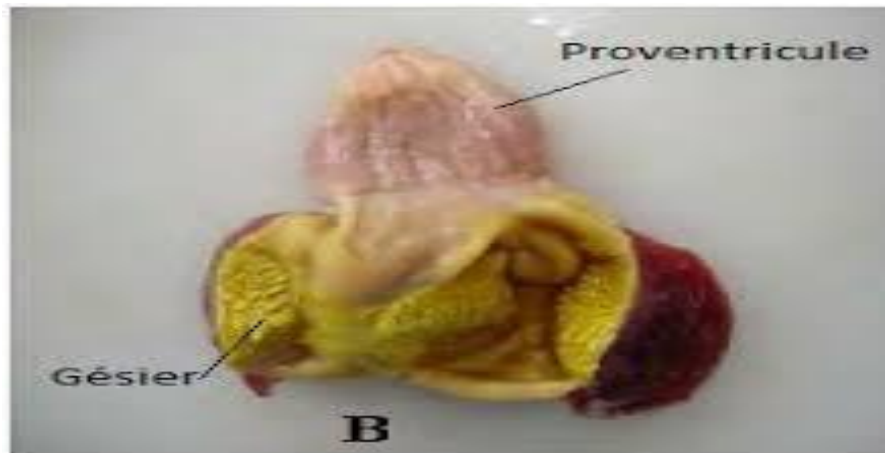


Figure 02 : Complexe stomacal du poulet (Bohak, 1969).

La pepsine opère comme eux en vertu d'une force particulière qu'on est convenue d'appeler catalytique. Elle a pour fonction de transformer les matières albuminoïdes en une substance soluble endosmotique assimilable. Propre à satisfaire aux différents besoins de composition et de décomposition organique. Le caractère qui distingue la pepsine de toutes les autres matières organiques est de coaguler le lait sans l'intervention d'un acide.

Selon Rymond, 1999, la mesure où l'activité optimale de ces endopeptidases (pepsines) se situe dans un milieu très acide (pH : 1,5 à 2,5); à partir des cellules dites des glandes fundus est secrète un précurseur inactif (pepsinogène).

Le Pepsinogène est un zymogène présent dans la muqueuse gastrique, la sécrétion ouverte dans l'estomac acide, il se transforme rapidement en pepsine ; tout bien pepsinogène ainsi que des zymogènes similaires se trouvent dans la plupart des espèces de vertébrés (Staffan, 1977).

La pepsine hydrolyse les protéines de la nourriture en courtes chaînes polypeptidiques incomplètement digérées avant que le mélange de nourriture partiellement digéré et de suc gastrique est appelé chyme. Chez les humains adultes seuls les protéines sont partiellement digérées dans l'estomac. Les glucides et les lipides ne sont pas digérés (Beisson *et al* , 2009).

La pepsine a plusieurs modes d'application comme la digestion des anticorps, la préparation de collagène, l'évaluation de la digestibilité des protéines dans la chimie alimentaire, la culture des cellules épithéliales mammaires viables (Riser *et al* , 1983).

4.3.1. Proventricule de poulet

Le proventricule est situé légèrement à gauche dans la cavité abdominale, centralement à l'aorte, dorsalement au foie qui l'enveloppe partiellement. C'est un renflement fusiforme (de 3 cm de long en moyenne chez la poule) dont la muqueuse est très riche en glandes à mucus.

La paroi interne très épaisse, est formée de lobules dont chacun constitue une glande composée radialement à l'axe de l'organe. Ces glandes en tube se jettent dans un canal commun à plusieurs glandes et se déverse dans la lumière du proventricule au sommet d'une proéminence bien marquée. La paroi du ventricule des carnivores et des piscivores est moins épaisse et plus riche en fibres musculaires et élastiques. Elle est alors très extensible. Le transit des aliments ne dure que quelques minutes dans le proventricule (Alamargot, 1982).

Les poulets ont un système digestif très simple, le proventricule est l'organe bulleux situé juste avant le gésier et il est parfois connu comme l'estomac glandulaire ; c'est ici que l'enzyme pepsine gastrique et l'acide chlorhydrique sont produits. La pepsine agit pour briser les molécules de protéines complexes ; l'acide chlorhydrique modifie le contenu du tube digestif de l'alcalin à des acides et donc la digestion orteil (Figure. 03)(Donald *et al*, 1972).

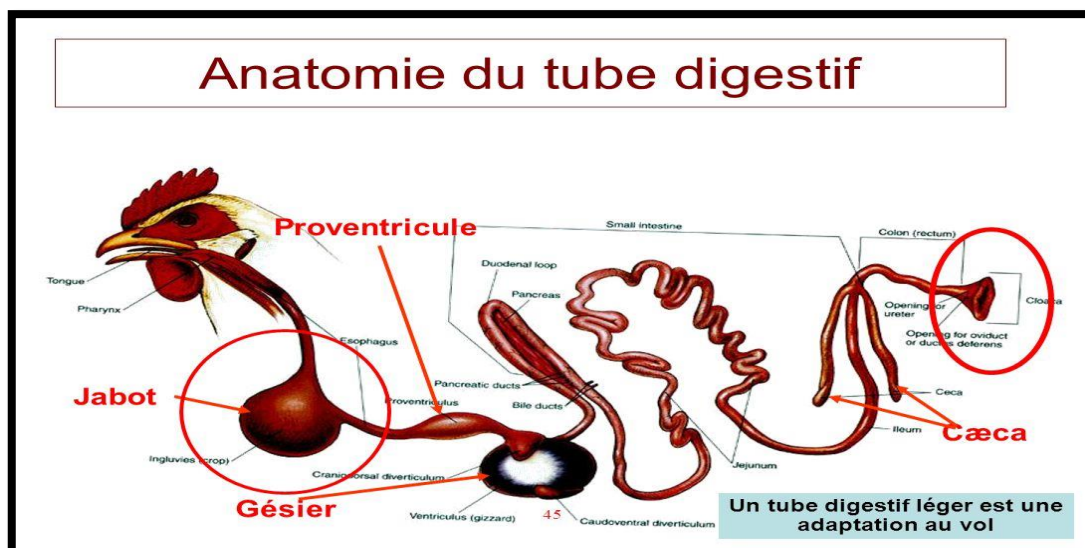


Figure 03 : Anatomie du tractus du poulet (Aouissi *et al*, 2016).

5. Comparaison entre l'action des différentes protéases

Les différentes protéases acides ont un poids moléculaire voisins, compris entre 30000 et 40000 Da. Leur pH optimum varie de 1.5 à 5. Dans le lait leur activité augmente avec la diminution du pH .

L'activité coagulante diminue nettement quand le pH dépasse respectivement 6,8 – 6,6 et 5,5 pour la chymosine, la pepsine bovine et la pepsine porcine (Andren *et al*,1982).

Ces enzymes sont irréversiblement dénaturées à des pH alcalins, uniquement la pepsine du poulet reste stable à pH 8 (Bohak, 1970) alors que la chymosine est instable à pH 6.5 (Fruton, 1971, cité par Dalglish, 1997 et Payne, 2009) et la pepsine porcine à pH 6 (Foltmann, 1979, cité par Dalglish 1982 et Payne,2009).

Herriot, Bartz et Northop en 1938 cité par Bohak, 1969 ont observé que la pepsine de poulet diffère de la pepsine bovine et porcine par sa stabilité dans les solutions à pH neutre et modérément alcalin. La pepsine de poulet est stable aux pH de 8 à 8,5 alors que la plupart des autres pepsines sont inactives à pH 6,5 à 7.

La chymosine attaque la liaison phe105-Met106 de la κ -caséine, alors que l'hydrolyse de la β -caséine et la α -caséine est très faible dans les conditions de la coagulation (pH, température et force ionique). La protéolyse générale est donc très réduite au cours de la coagulation, mais s'accroît lors de la maturation (Dalglish,1997).

La pepsine porcine possède un pouvoir protéolytique plus prononcé (DeKoning, 1978 cité par Dalglish, 1997), alors que la pepsine bovine semble avoir un pouvoir protéolytique assez proche de la chymosine (Alais,1974). Selon Richardson ,1975 le taux de protéine totale du gel est stable entre 15 et 60 min pour la présure et la pepsine.

***Chapitre II : Coagulation du lait et formation
du gel fromager***

1. Définition

La coagulation est la première étape de transformation du lait en fromage. Cette coagulation se traduit par la formation d'un gel, résultant 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 ou par action des enzymes coagulantes.

2. Différents types de coagulation

2.1 Coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ($pH_i = 4,6$) par acidification biologique à l'aide des ferments lactiques qui fermentent le lactose en acide lactique, ou par acidification chimique l'addition d'un agent acidogène (glucono- δ -lactone) ou ajout de protéines sériques à pH acide. Le gel obtenu par acidification présente une bonne perméabilité mais une friabilité élevée. Le manque de structuration du réseau a pour conséquence une élasticité et une plasticité pratiquement nulles et une faible résistance aux traitements mécaniques (Jeantet *et al*, 2008).

2.2 Coagulation mixte

La coagulation mixte est réalisée par acidification du lait et addition des enzymes coagulantes. En pratique cette méthode est utilisée pour la fabrication des fromages frais ou fromages à pâte molle (Boughellout, 2007).

Le coagulum obtenu présente des caractères intermédiaires entre ceux du gel lactique et présure. Il est caractérisé par une souplesse et une élasticité moins grande, une fermeté et friabilité plus accentuées que celle du gel présure (Jeantet *et al*, 2008).

2.3 Coagulation enzymatique

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire. Un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne, présente la propriété de coaguler le complexe caséinique (Kellil, 2015).

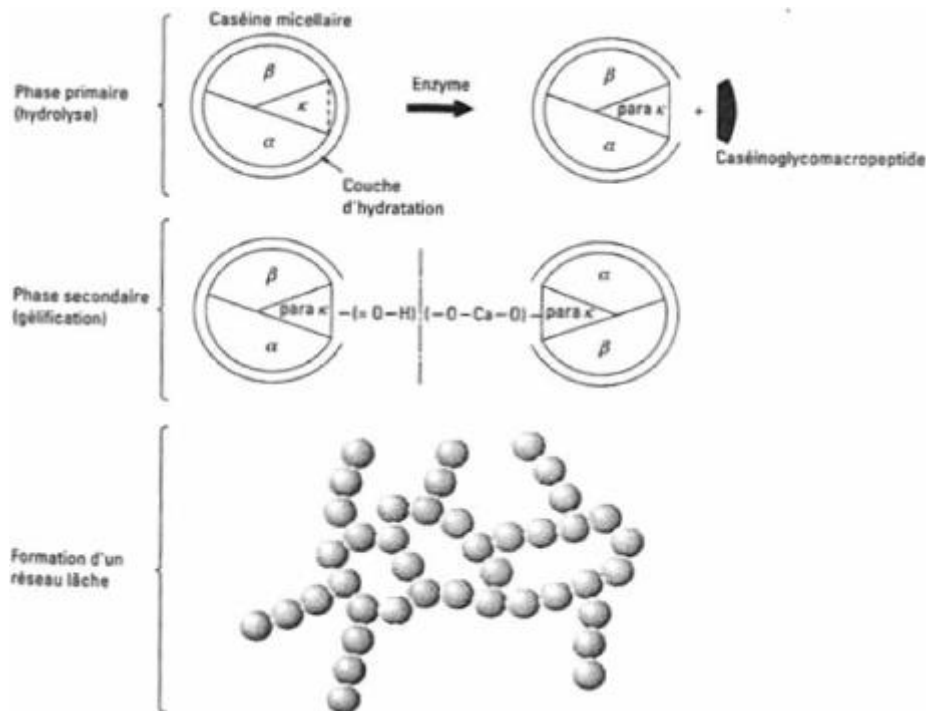


Figure 04 : Phases de coagulation de lait et formation de réseau (Vignola, 2002).

3. Etapes de coagulation

3.1. Phase primaire

La micelle est principalement constituée de caséine κ avec son segment C-terminal hydrophile libre qui s'étend dans la phase aqueuse du lait assurant la stabilité stérique et agissant comme une barrière contre l'association des micelles (Eck et Ghilis, 2006).

Au cours de la phase enzymatique (primaire), il y a une attaque de l'enzyme sur la caséine- κ (composante qui stabilise la micelle) au niveau de la liaison PHE105-MET106. La chaîne peptidique se trouve ainsi coupée en deux segments, le segment 1-105 est la paracaséine- κ (Figure. 05) et le segment 106-169 qui est le caséinomacropeptide (CMP). La paracaséine- κ liée aux caséines α et β reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré dans le lactosérum, ce qui entraîne une réduction de la charge négative et leurs degrés d'hydratation (Lij *et al*, 2006).

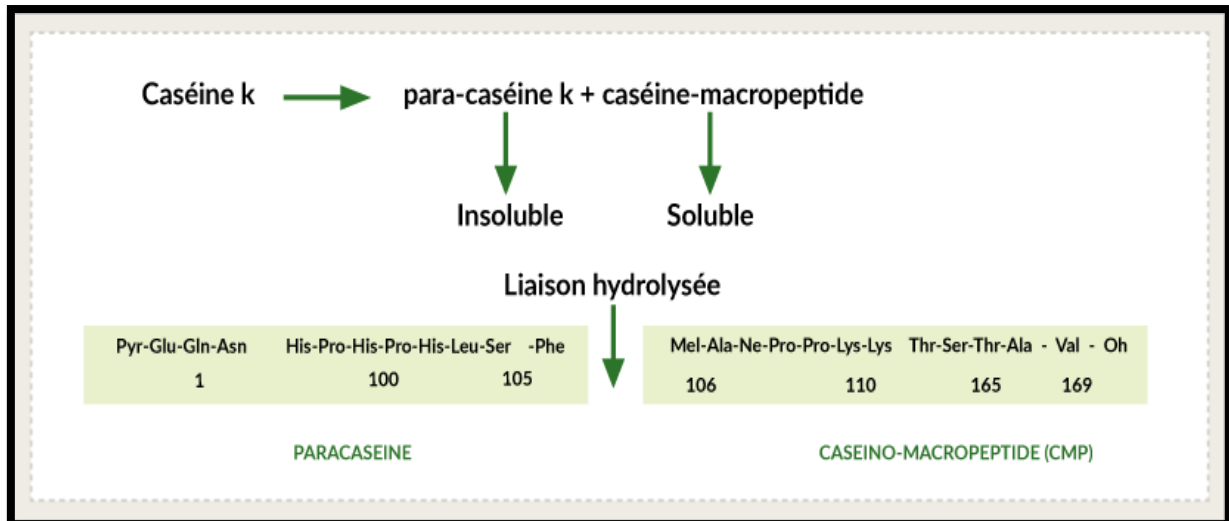


Figure 05 : Hydrolyse de la caséine κ par la présure (Fox et *al.*, 1994).

3.2. Phase secondaire

Cette phase commence dès que 85 % de la caséine- κ est hydrolysée. Elle est dite phase d'agglomération ou d'agrégation ou phase de coagulation proprement dit (Lucey, 2002).

Durant laquelle la libération du macropeptide de la caséine- κ sous l'action de l'enzyme entraîne la réduction des répulsions électrostatiques entre les micelles de caséines hydrolysées. L'élimination de ces macropeptides entraîne également une réduction du diamètre hydrodynamique et une perte de la stabilité (Lucey, 2002 ; Polaina *et al.*, 2007).

La nature des interactions intervenant durant cette phase n'est pas encore bien connue. Toutefois, les ponts calciques et les forces de Van der Waals ainsi que les interactions hydrophobes semblent être impliqués (Schmidt, 1982). Les micelles déstabilisées s'agrègent en présence des ions de calcium libres (Ca^{++}). Au début, il y a une formation de chaînes linéaires de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas. Ces derniers constituent le gel protéique qui se sépare nettement de lactosérum (Lucey, 2002).

3.3. Phase tertiaire

Durant cette phase, les micelles agrégées subissent une profonde réorganisation par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut être de ponts disulfures entre les para caséines (Vignola, 2002).

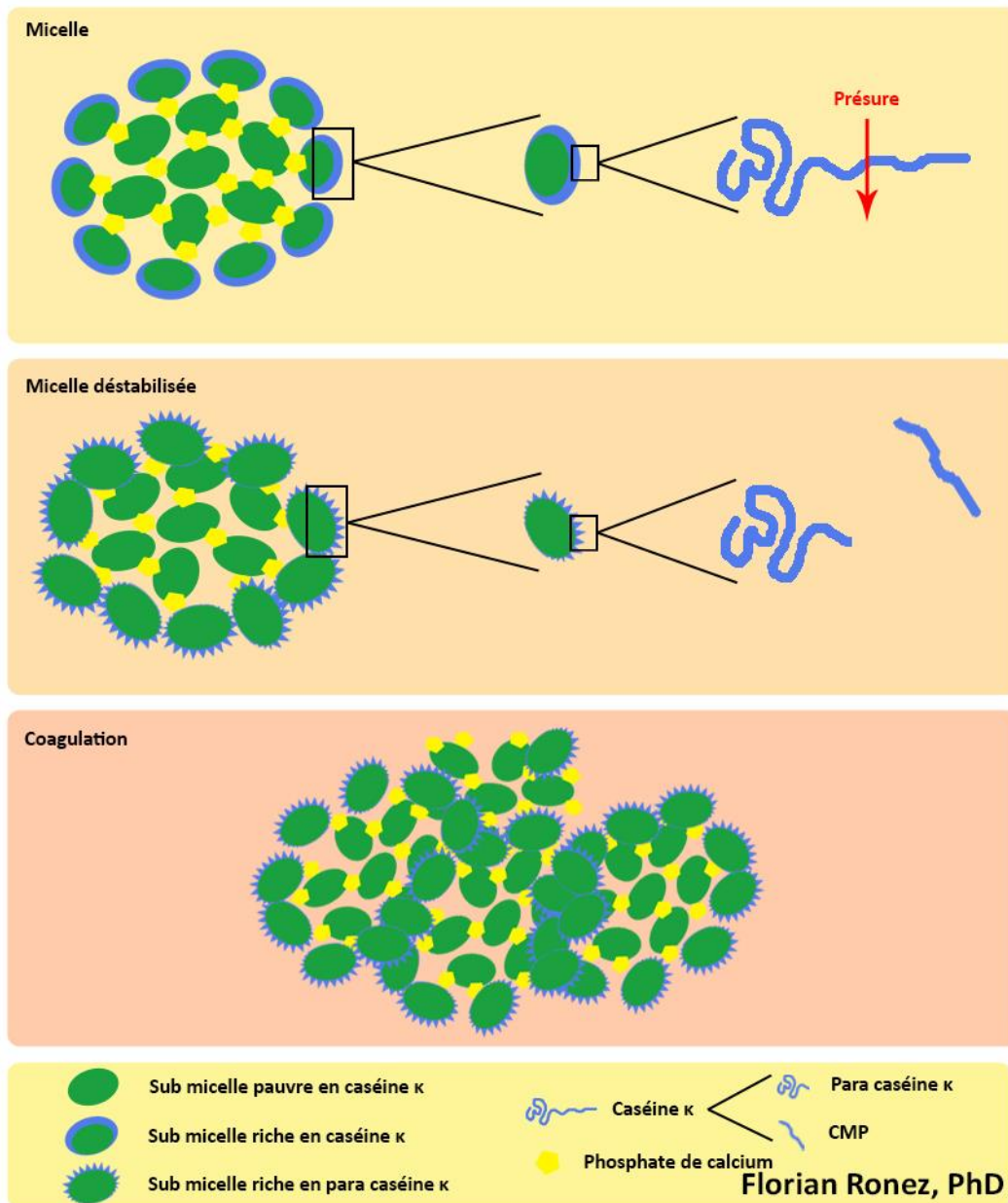


Figure 06 : Formation d'un caillé présure par action de la présure sur les caséines du lait (Florian R , 2012).

4. Facteurs influençant la coagulation

De nombreux facteurs sont susceptibles de modifier la coagulation du lait et les caractéristiques physiques des coagulums. Ces facteurs sont principalement liés à la concentration en enzyme, à la température, au pH, à la teneur en calcium, à la teneur en caséines et à la dimension des micelles (Eck *et al*, 2006).

4.1. Concentration en enzyme

La concentration en enzyme est inversement proportionnelle au temps de coagulation. Cependant, elle est proportionnelle à la vitesse d'hydrolyse de la caséine κ (phase enzymatique) et à la vitesse d'agrégation des micelles (phase physique) (Boughellout, 2007).

4.2. Température

La température optimale d'activité de la chymosine et de la pepsine est de 40-42 °C. A cet intervalle de température, le temps de floculation est minimal, puis augmente aux températures plus élevées et devient nul à 65 °C où la présure est inactivée. On note que le temps de raffermissement du gel diminue avec l'élévation de la température (Boughellout, 2007).

4.3. pH

En passant de pH 6,7 à 5,6, la vitesse de coagulation est accrue. Ceci résulte d'un accroissement de la vitesse d'hydrolyse et par suite une augmentation de la vitesse de raffermissement du gel. La fermeté est significativement importante de pH 6,6 à pH 6,0 due à une plus grande disponibilité du calcium ionisé. Au-dessous de pH 6,0, la caséine se déminéralise et la désagrégation de la structure micellaire est accentuée jusqu'à devenir totale à pH 5,2 (Boughellout, 2007).

4.4. Teneur en calcium

La réticulation du gel lors de la coagulation du lait par la présure, impliquant des liaisons phosphocalciques, est particulièrement influencée par la teneur et la nature du calcium présent. L'addition du CaCl_2 entraîne une augmentation du calcium ionisé et du calcium colloïdal ayant pour conséquence un temps de coagulation plus court et une fermeté du gel plus élevée (Kellil, 2015).

4.5. Teneur en caséines

La vitesse d'hydrolyse enzymatique est proportionnelle à la teneur en protéines. Ainsi, la vitesse d'agrégation et la fermeté des gels augmentent avec la teneur des caséines (Kellil, 2015).

4.6. Dimension des micelles

La relation entre les dimensions des micelles et le temps de coagulation est proportionnelle. Pour les micelles de faible diamètre, riches en caséine κ , la vitesse d'hydrolyse est plus rapide (Kellil,2015).

Les effets des facteurs principaux qui influencent les paramètres de coagulation sont résumés sur la figure 07.

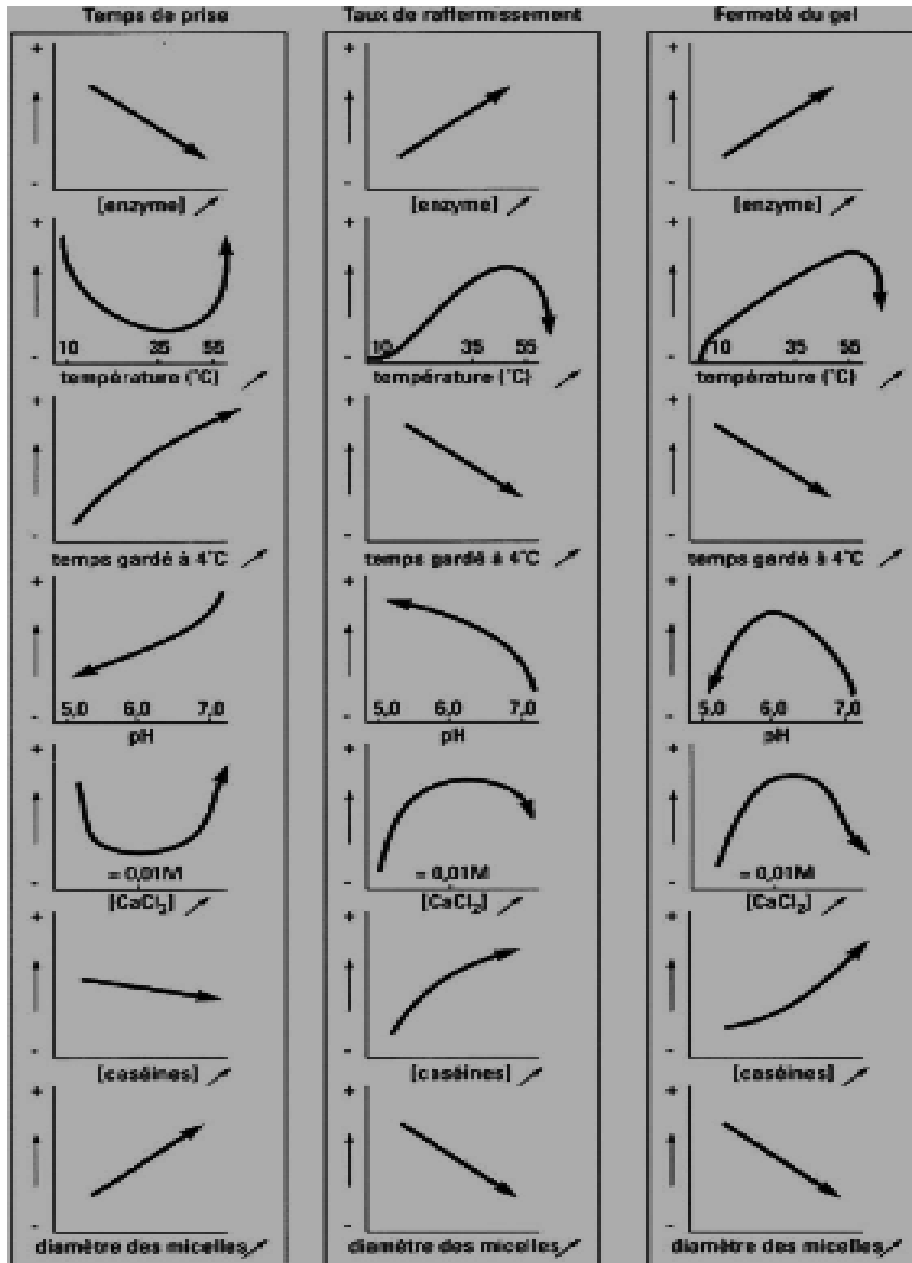


Figure 07 : Facteurs influençant les paramètres de coagulation enzymatique du lait (Vignole, 2002).

5. Evaluation de la coagulation

5.1. Temps de coagulation

Le temps de coagulation correspondant au temps entre l'addition d'enzyme coagulante et le début de tranchage du gel (Eck et Ghillis, 2006).

5.2. Temps de prise

Le temps de prise ou durée de prise est le temps qui s'écoule entre l'emprésurage et le début de la floculation, c'est-à-dire, gélification apparente du lait (Luquet, 1985).

5.3. Activité coagulante

L'activité coagulante est définie par l'unité présure (UP). Selon (Berridge, 1955), cette unité correspond à la quantité d'enzyme contenue dans 1 centimètre cube (cm³), qui peut coaguler 10 centimètres cubes de substrat standard en 100 secondes à 30 °C (Alais, 1984).

5.4. Force coagulante

Les méthodes anciennes et les plus répandues ont été proposées par (Soxhlet, 1879 et Berridge, 1955). L'unité Soxhlet correspond au nombre d'unité de poids ou de volume du lait qui peuvent être coagulés par une unité de poids ou de volume de préparation coagulante en 40 min et à 35 °C (Alais, 1984).

6. Mécanisme de la syntonèse et de l'égouttage

Un coagulum obtenu par voie enzymatique (présure) maintenu au repos, après un certain temps de sa formation, présente une "sueur" sur toute sa surface composée de gouttelettes de lactosérum, ces dernières grossissent et se rejoignent pour constituer une enveloppe liquide autour du gel, ce phénomène est la syntonèse, où il y a concentration et diminution de volume du coagulum par élimination d'eau et de constituants solubles (Weber, 1997).

Après formation du gel, et sous l'influence de nouvelles liaisons qui s'établissent entre les micelles, ou du renforcement des liaisons existantes, il se produit une rétraction du gel aboutissant à l'expulsion d'une fraction du lactosérum. (Lodaite *et al.*, 2000) ; (Lenoir et Veisseyere, 1987) ; (Alais, 1974), cette expulsion est favorisée par le tranchage et l'agitation du gel (Calvo *et al.*, 2000 et Daviau *et al.*, 2000).

La séparation du lactosérum expulsé par syntonèse qu'il soit à l'extérieur ou entre les couches du caillé est une étape clé dans la fabrication fromagère, cette séparation se fait généralement par décantation et filtration, ou sous une action mécanique telle que la pression après tranchage. L'ensemble des opérations de syntonèse et d'évacuation du lactosérum, constitue l'opération d'égouttage (Weber, 1997).

Les quantités d'enzymes retenues après égouttage varient de 40% (pour le camembert) à 6% pour le cheddar. Ces taux sont fonction du pH : plus le pH du lait est bas plus la quantité de présure retenue est importante (Holmes *et al* , 1977) ; cité par (Desmazeaud, 1997).

Selon(Weber , 1997) ; Les mécanismes fondamentaux de la syntonèse et de l'égouttage d'une coagulation présure sont répartis sur 3 étapes principales :

La première étape débute sous l'action de la protéase coagulante par libération de composés hydrophiles (le glycomacropéptide). L'eau qui entoure les micelles et les agrégats de micelles empêche leur réunion, et s'oppose à la syntonèse par l'établissement de liaisons secondaires. Le traitement thermique (cuisson des pâtes pressées) diminue le degré d'hydratation des micelles en favorisant l'établissement des liaisons intermoléculaires et accentue l'égouttage.

Dans la deuxième étape, la protéolyse due à l'enzyme coagulante et la réduction progressive de l'eau d'hydratation libère des sites réactionnels favorables à l'établissement de nouvelles liaisons variées entre les agrégats micellaires. Ces liaisons devenant de plus en plus nombreuses et fortes provoquent la contraction du coagulum et l'expulsion du lactosérum.

En troisième étape, lorsque la syntonèse est suffisamment avancée, des ponts disulfures s'établissent entre les molécules protéiques par les acides aminés soufrés, caractéristiques de la fin de la syntonèse. L'accroissement progressif de la force et du nombre des liaisons produit un resserrement du réseau filamenteux de caséine et une expulsion du lactosérum interstitielle.

L'aptitude à l'égouttage varie avec l'intensité et la spécificité de l'activité protéolytique de l'enzyme utilisé (Knoop *et al* , 1975 et Ramet, 1976 cité par Weber, 1997).

L'acidification favorise la syntonèse, cela est due à deux raisons, d'une part, la baisse du pH diminue l'eau d'hydratation des micelles, et d'autre part, la solubilisation d'une partie du calcium lié aux protéines favorise l'établissement de liaisons en libérant des sites (Alais , 1974).

7. Propriétés rhéologiques du caillé

La rhéologie est l'étude de la déformation d'un corps sous l'effet d'une force externe, elle permet de suivre le comportement dynamique d'un corps en le soumettant à une contrainte physique et en étudiant la déformation qui lui est associée. Les deux grandeurs physiques fondamentales de la rhéologie sont la contrainte (stress) et la déformation (strain) (Roudot, 2002).

La contrainte (τ) est une grandeur dynamique qui correspond à la force de contact qui est appliquée au système par unité de surface ; elle s'exprime en N/m².

La déformation (ε) est une grandeur cinématique qui décrit la modification du système dans l'espace ; c'est une grandeur sans dimension.

Le comportement rhéologique d'un corps dépend de ses propriétés visqueuses et élastiques. En rhéologie, il est rare de rencontrer un liquide complètement visqueux (dit newtonien) ou un solide élastique parfait.

Il est possible de décrire la consistance "le corps" d'un gel par un ensemble de paramètres rhéologiques ayant un sens physique précis : module d'élasticité, viscosité et temps de relaxation. Le gel est un corps visco-plasto-élastique, autrement dit, il présente, lorsqu'il est soumis à une contrainte physique (compression mécanique, pénétration par une aiguille, cisaillement etc....) une déformation globale, qui est une combinaison de déformations élémentaires qui sont l'élasticité, la viscosité et la plasticité (Lucey, 2003 et Tunick, 2000). Ce comportement dépend de plusieurs facteurs tels que le temps et la vitesse de déformation, le type de déformation, la composition du gel, la température et la géométrie de l'échantillon. (Tunick, 2000).

Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

1. Méthodologie

Cette étude a été réalisée au laboratoire des sciences et techniques de production animales de Hassi-Mamèche (Mostaganem) , et au laboratoire de la filiale GIPLAIT “Laiterie le littoral Mostaganem.

2. Provenance des échantillons expérimentaux

2.1 Les proventricules de poulet

Les échantillons de proventricules de poulet ont été ramenés de l’abattoir de Zahana appartenant au Groupe Avicole de l’Ouest « GAO » Mascara et conservés à 04 °C (pendant une nuit) jusqu’à l’entame de l’expérimentation.

2.2 Le lait

Le lait expérimental a été reconstitué à raison de 12% (p/v) à partir d’une poudre de lait écrémé low heat enrichi en protéines récupérée de la filiale GIPLAIT «Laiterie le littoral Mostaganem » (voir en annexe B).

Pour amender l’équilibre minéral, le lait a été enrichi avec du phosphate monocalcique (0,01M) et stabilisé avec de l’azide de sodium (0,025%) pour éviter tout développement microbien. IL est ensuite stocké au réfrigérateur pendant 10 à 15 heures pour une bonne réhydratation des protéines et permettre l’équilibre physico-chimique.

La poudre de lait utilisée a été récupérée de la filiale GIPLAIT, Laiterie le Littoral Mostaganem, du même lot, de marque AGROPUR Canada, conservée à l’abri de la lumière et de l’humidité.

2.3 La présure animale

La présure utilisée est une présure animale en poudre commerciale de marque CHR HANSEN Danemark de force 1/125000 à 650 mg de chymosine /100 g acheté du groupe FLY CHEMICALS Oran (Voir en annexe A) .La poudre de présure utilisée est conservée hermétiquement à 4 °C.

Nous avons préparé pour notre expérimentation, une solution mère par dissolution de 2 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée (se référant à la fiche technique du fournisseur). La solution est conservée dans un réfrigérateur à 4 °C avant son utilisation.

Lors de chaque utilisation expérimentale, nous avons dilué la solution mère dans de l'eau distillée à raison de 2,5% (v/v) se référant au fournisseur correspond à un temps de floculation à 30 °C compris entre 8 et 15 minutes.

3 Extraction de la pepsine

La pepsine est extraite à partir de proventricules de poulets selon la méthode définie par (Bohac ,1969) Le protocole d'extraction est résumé comme suit sur la figure 08 :

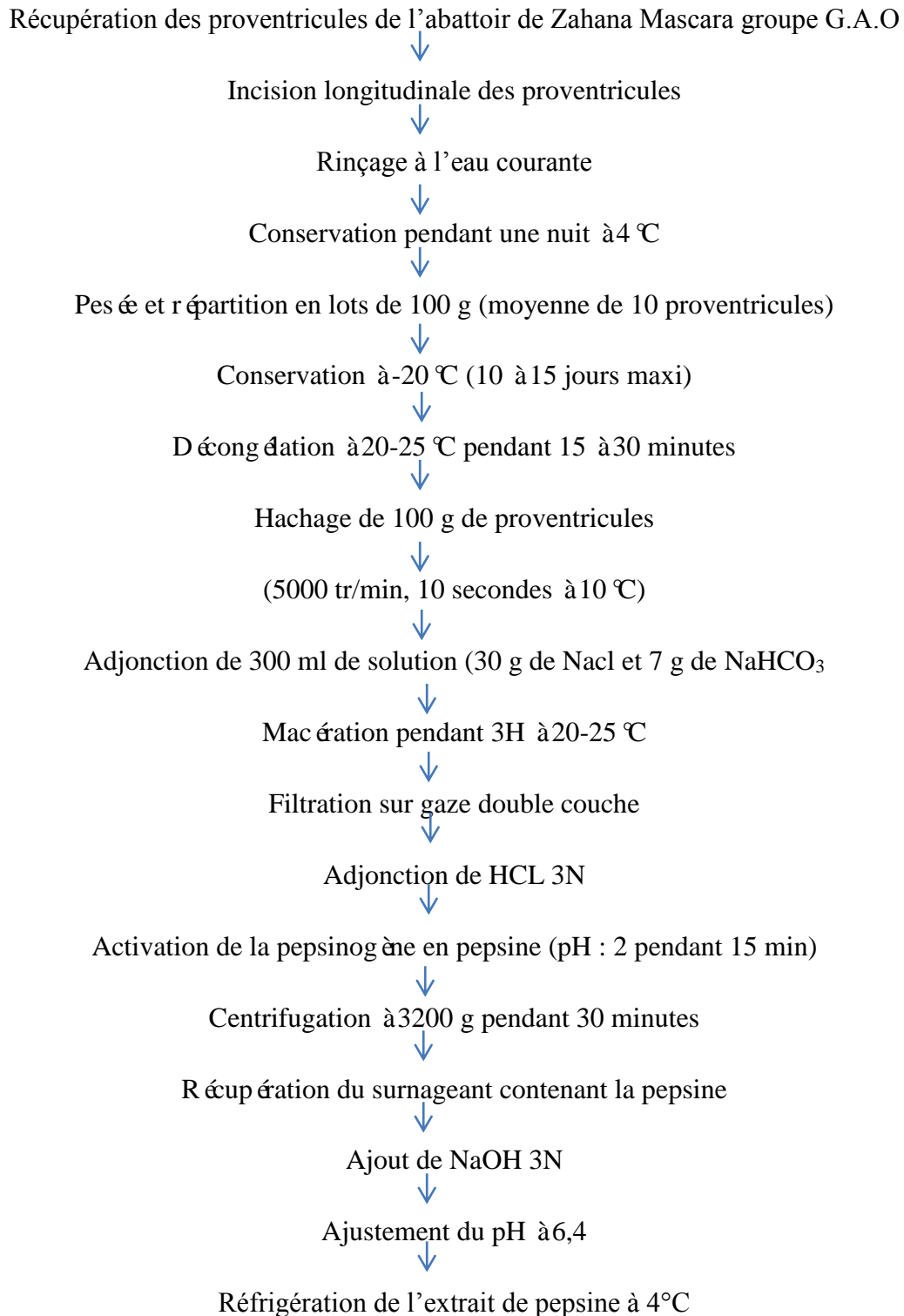


Figure 08 : protocole d'extraction de la pepsine de poulet selon (Bohac, 1969).

4. Techniques d'analyse

4.1 Caractérisation du lait reconstitué

4.1.1 Détermination de l'acidité titrable

La mesure de l'acidité titrable est établie selon la norme F.I.L ISO 707.

4.1.1.1 Définition

L'acidité du lait est la somme de l'acidité des composants d'une matière organique (le lait) qui sont : la caséine, les substances minérales et les acides organiques, les réactions secondaires des phosphates, de l'acide lactique et des autres acides organiques résultants de l'activité microbienne.

Elle est déterminée par titrage de l'acide lactique.

4.1.1.2 Principe

L'acidité du lait est réalisée par titrage avec une solution alcaline en présence de phénolphthaléine.

4.1.1.3 Réactifs

Hydroxyde de sodium, solution titré à 0,1 mol/l.

Phénolphthaléine, solution alcoolique à 1 g pour 100 ml.

4.1.1.4 Mode opératoire

Un échantillon de 10 ml de lait reconstitué a été introduit dans un bécher de 100 ml puis un volume de 0,3 ml de l'indicateur a été ajouté. Le titrage se fait par la solution sodique jusqu'au virage au rose, faiblement perceptible par comparaison avec un témoin. On considère que le virage est atteint lorsque la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes.

4.1.1.5 Expression des résultats

Pour exprimer les résultats ; il faut considérer que 1ml de solution titrée correspond à 0,01 g d'acide lactique, L'acidité titrable exprimée en grammes d'acide lactique pour 100 g d'échantillon , est donnée par la formule :

$$0,01 \text{ g} \times V \times 100/2 = V/2$$

Où

V représente le volume en millilitres de solution sodique à 0,111 ml/l utilisé pour le titrage .

Pour une fiabilité de l'analyse on doit prendre la moyenne de deux déterminations.

Ce résultat est traduit en degré Dornic (°D) : 1°D = 0,1 grammes d'acide lactique dans 100g de poudre de lait .

4.1.2 Mesure du pH

La mesure du pH est établie selon la norme F.I.L ISO 707.

4.1.2.1 Définition

Le pH traduit la concentration en ions hydrogènes .Pour le lait normal, il est compris entre 6,6 et 6,8.La légère acidité ainsi observée est due à la présence des anions phosphoriques et citriques ainsi que de la caséine.

4.1.2.2 Principe

Une mesure directe du pH à l'aide d'un pH-mètre HANNA (HI-2210) de paillasse a été faite sur une prise d'échantillon de 10 ml de lait reconstitué.

4.1.2.3 Réactifs

Les réactifs doivent être de qualité analytique conforme.

Solution tampon de référence à pH 7,00.

Solution tampon de référence à pH connu au second décimal près, compris entre 4 et 5.

4.1.2.4 Mode opératoire

Dans un bécher, mettre 10 ml de l'échantillon de lait, plonger l'électrode dans le liquide (le lait) et effectuer la mesure potentiométrique à 20 °C +/- 2 °C en agitant le contenu du bécher. Lire directement la valeur de pH avec deux décimales. Les résultats sont exprimés en unité de pH et à la température de 20 °C.

Pour une fiabilité de l'analyse on doit prendre la moyenne de deux déterminations.

4.1.3 Détermination de l'extrait sec total du lait

La détermination de l'extrait sec total du lait est établie selon la norme F.I.L ISO 707

L'extrait sec total correspond au poids du résidu restant après dessiccation de l'échantillon à 105 °C dans dessiccateur infra-rouge (KERN MLS 50-3C). Le principe consiste à sécher 1 ml de lait par infrarouge et à contrôler en continu le poids à l'aide d'une balance de précision intégrée jusqu'à poids constant.

Le pourcentage d'extrait sec total est calculé par la différence entre le poids initial et le poids final après évaporation complète de l'eau contenue dans l'échantillon analysé. L'extrait sec total est donné en % par affichage sur l'écran du dessiccateur.

Trois déterminations de l'extrait sec total ont été effectuées sur le même échantillon pour chaque essai.

4.1.4 Détermination de la teneur en azote total (protéines) et de l'azote non protéique NPN

La détermination de la teneur en azote total est effectuée par la méthode de Kjeldahl et selon la norme FIL ISO 707. Elle consiste en une minéralisation de l'échantillon du lait reconstitué par chauffage en présence d'un mélange d'acide sulfurique concentré, de sulfate de potassium et de sulfate de cuivre, utilisés comme catalyseurs pour convertir l'azote organique de l'échantillon en sulfate d'ammonium.

Le produit de la réaction est additionné de la soude pour libérer de l'ammoniac qui sera titré par une solution d'acide chlorhydrique en présence d'acide borique.

4.1.4.1 Minéralisation

Une prise d'essai de 10 ml de lait expérimental est pesée dans un tube en verre appelé matras, ensuite ,5g de sulfate de potassium (K₂SO₄), 0,5 g de sulfate de cuivre (CuSO₄) et 15 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄, 0,2 N) ont ajoutés à l'échantillon, ensuite le matras est placé dans l'appareil de Kjeldahl à une température de 400°C pendant 1h30 min.

4.1.4.2 Distillation et dosage de l'azote total

L'échantillon minéralisé est refroidi à température ambiante, puis son contenu est dilué avec 75 ml d'eau distillée qui servent en même temps à rincer les parois du matras. Ensuite , ce dernier est raccordé à l'appareil de distillation où 60 ml (3x20ml) de l'hydroxyde de sodium à 30% sont ajoutés à l'échantillon. L'ammoniac produit (suite à l'ajout de la solution de NaOH), est capté avec 25 ml d'acide borique (H₃BO₃) qui vire du rose au vert. L'ammoniaque contenu dans la solution d'acide borique est titré avec une solution d'acide sulfurique à 0,1N jusqu'à obtention de la couleur de départ de l'acide borique (rose).

L'azote total de l'échantillon est obtenu par la formule suivante :

$$\text{Azote total en \%} = \frac{(\text{Cb} - 0,1) \times \text{N} \times 14}{\text{Pe}} \times \frac{100}{1000}$$

Cb : Chute de la burette (ml).

N : Normalité de l'acide sulfurique (solution de titration).

14 : Masse équivalente de l'azote.

Pe: Masse de la prise d'essai (g).

La quantité des protéines totales est obtenue par la formule suivante :

$$\text{Azote totale en \%} \times \text{F}$$

F : facteur de conversion de l'azote en protéines = 6,38

Le taux d'azote non protéique (NPN) est déterminé après précipitation des protéines du lait avec une solution d'acide trichloroacétique (T.C.A) à une concentration finale de 12% suivi d'une filtration.

Le taux d'azote total et d'azote non protéique ont été déterminés sur un échantillon de 5 ml de lait reconstitué servant à l'expérimentation.

4.2 Caractérisation de l'extrait enzymatique

4.2.1 Détermination des temps de coagulation

L'activité coagulante est déterminée par la mesure du temps de floculation et du temps de prise selon la méthode d'Alais,(1974) et actualisée par(Tanaka *et al*, 2001) .

4.2.1.1 Détermination du temps de floculation

Le temps de floculation est l'intervalle de temps compris entre le moment de l'emprésurage et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu.

L'unité d'activité coagulante U.A.C ou l'unité présure est défini par la quantité d'enzyme contenu dans 1 ml qui peut coaguler 10 ml de lait (substrat standard d'**Alais (1974)** : 12% p/v de lait écrémé en poudre dissout dans une solution de CaCl_2 0,01 M en 100 secondes à 30 °C.

$$\text{U.A.C} = 10. V / T . V'$$

Où:

V : volume du lait

V': Volume de l'extrait enzymatique

T : temps de floculation

Un volume de 10 ml de lait est versé dans un tube à essai et porté à 30 °C dans un bain marie.

Au temps zéro, 1 ml de la solution enzymatique est ajouté et le chronomètre déclenché. Le tube immergé est maintenu incliné, de telle sorte que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du lait. Il est régulièrement animé d'un mouvement rotatif autour de son axe. Le lait forme

ainsi un film mince et homogène. Au moment de la floculation des petits flocons apparaissent au sein même de ce film. Le chronomètre est arrêté à ce moment et le temps de floculation est ainsi noté.

4.2.1.2 Détermination du temps de prise

Le temps de prise est le moment où apparaissent les premières gouttelettes du lactosérum (début de l'exsudation du lactosérum) sur la surface du gel appelé aussi coagulum qui devient rigide et ne coule plus sur les parois du tube. Ce temps de prise en masse compacte est noté.

Pour toute coagulation, le temps de prise représente généralement environ le double du temps de floculation : ainsi pour un temps de floculation compris entre 8 et 15 minutes, le temps de prise se situe entre 16 et 30 minutes (FAO /OMS, 1999).

4.3 Cinétique de la protéolyse

L'activité protéolytique d'une enzyme coagulante se traduit par l'augmentation du taux d'azote non protéique (non protéique nitrogen : NPN) libéré dans la masse du coagulum.

La comparaison du rapport NPN/NT (où NT représente l'azote total) entre la coagulation pepsine et la coagulation présure, permet d'évaluer la différence de la protéolyse entre les deux enzymes.

Le dosage de l'azote non protéique, est estimé après précipitation, avec de l'acide trichloroacétique (TCA) à 12% de concentration finale des protéines du lait expérimental mis en contact avec l'enzyme coagulante. Après filtration, l'azote est dosé par la méthode Kjeldahl.

Une série de 10 tubes à essai contenant 10 ml de lait expérimental chacun est maintenue à 35 °C pendant 1 heure dans un bain marie. Au temps 0, une dose de 1ml de l'enzyme est ajoutée pour chaque tube, et le chronomètre est actionné. Pour chaque temps de la cinétique, 10 ml d'une solution TCA 12% sont ajoutés, et le tube est bien agité.

IL faut noter que nous avons utilisé des concentrations de présure et de pepsine assurant un temps de floculation compris entre 8 et 15 minutes pour toute l'expérimentation.

Chaque tube est filtré et le sérum est récupéré pour déterminer la teneur en azote NPN par la méthode Kjeldahl.

La cinétique de la protéolyse des deux enzymes (trypsine et pepsine) est étudiée en dosant le NPN à temps de prise.

L'expérience permettant l'obtention de cette cinétique est répétée cinq fois, et nos résultats exprimeront la courbe moyenne.

4.4 Analyse statistique :

Les résultats sont la moyenne des cinq essais, et présentés sous forme de moyenne – écart type. L'étude statistique par analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée par le logiciel statistique MINITAB 19.

Chapitre II : Résultats et Discussion

II.1 Qualit é physico-chimique du lait expérimental utilisé

Le lait expérimental utilisé préparé à raison de 12% (p/v) a présenté une humidité de 87,50% , un taux protéique de 3,63% , un taux de NPN de 0,185% , une acidité Dornic de 15,8 °D et un pH de 6,65 . Ces résultats sont conformes aux normes de la F.I.L , de la FAO et du JORA (voir Tableau 02) .

Tableau 02 : Qualit é physico-chimique du lait expérimental utilisé

| Analyse | Moyenne obtenue et écart type | Méthode utilisée |
|----------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Humidité du lait reconstitué(%) | 87,50 ± 0,025 | Dessication à 105°C |
| Taux protéique (%) | 3,63 ± 0,05 | Kjeldahl |
| NPN(%) | 0,185 ± 0,001 | Kjeldahl |
| NPN/NT | 5,0 | |
| Acidité Dornic | 15,8 ± 0,25 | Dornic |
| Ph | 6,65 ± 0,01 | pH-métrie |

La coagulation enzymatique d'un lait est la première étape de la fabrication d'un fromage qui peut être considérée comme le résultat d'un processus dans lequel la caséine est concentrée après élimination du lactosérum (Mahaut *et al* , 2000).

Pour le fromager, un lait de qualité joue un rôle important pour une bonne aptitude coagulante , assurer une cinétique adéquate de la floculation à la prise du lait, éviter les déperditions des protéines solubles après exsudation du lactosérum et la formation d'un gel ferme (Larbaletrier , 2015).

II.2 Qualité de la pepsine de poulet extraite en comparaison à la présure commerciale

Les résultats du contrôle de l'extrait clarifié de pepsine de poulet et de la dilution retenue, ainsi que celles de la présure commerciale sont regroupés dans le tableau 03

L'extraction de la pepsine de poulet à partir de 100 grammes de proventricules a donné un volume de 185 ml d'extrait enzymatique

Tableau 03 : Qualité de l'extrait enzymatique « pepsine de poulet »

| Contrôle effectué | Pepsine | | Présure | |
|------------------------------|------------------|--------------|------------------|---------------|
| | Extrait clarifié | Dilution 3% | Solution mère 1% | Dilution 2,5% |
| Temps de floculation (s) | 55,10 ± 1,10 | 870 ± 5,50 | 28,75 ± 1,45 | 725 ± 12,5 |
| Temps de prise (s) | 96,50 ± 2,45 | 1560 ± 12,75 | 48,50 ± 1,60 | 1490 ± 35,20 |
| Activité coagulante U.A.C/ml | 3,25 ± 0,15 | 0,15 ± 0,002 | 3,10 ± 0,10 | 0,12 ± 0,001 |

IL est à noter que lors de notre expérimentation nous avons opté pour une dilution de 3% (v/v) suite aux essais préalables effectués pour obtenir un temps de floculation conforme à une bonne coagulation compris entre 8 et 15 minutes comme décrit par (Tanaka *et al*, 2001).

Dans ce sens, l'extrait clarifié de la pepsine de poulet donne un temps moyen de floculation de 55 secondes à 30°C. La dilution à 3% (v/v) dans de l'eau distillée stérile a donné un temps moyen de floculation de 870 secondes (14,5 minutes) et un temps moyen de prise de 1560 secondes (26 minutes)

En comparaison, la solution de présure à 1% a donné un temps de floculation moyen de 28,75 secondes. A une dilution calculée de 2,5%, on a obtenu un temps moyen de floculation contrôlé de 725 secondes (12 minutes) et un temps de prise moyen de 1490 secondes (environ 25 minutes)

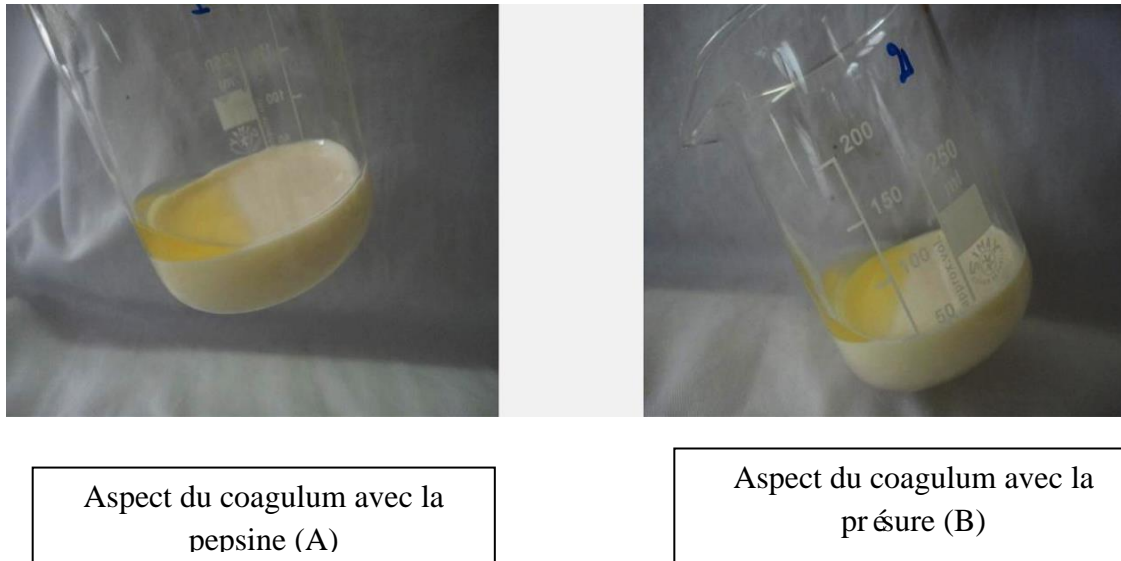


Figure 09 : Aspect du gel form é par les deux enzymes

La figure 09 montre l'aspect des deux gels enzymatiques formés après activité enzymatique et atteinte du temps technologique «le temps de prise » à une température comprise entre 30 et 35 °C. Il apparaît clairement que les deux gels montrent une bonne consistance et fermeté avec le peu de lactosérum soit une faible libération du NPN soluble. Cette qualité de gel est très demandée en industrie de fromage à pâte pressée pour laquelle le gel à coagulation enzymatique dominante doit être ferme et tenace (Mahaut *et al* , 2000).

L'unité de l'activité coagulante (U.A.C) qui représente la quantité d'enzyme contenue dans 1 ml de la solution enzymatique pour coaguler 10 ml de lait en 100 secondes à 30 °C ; est de 3,25 unité /ml pour l'extrait clarifié de pepsine de poulet, et de 3,10 unité/ml pour la solution mère de présure commerciale (1%).

Le temps de floculation pour les 02 enzymes mises en dilution est entre 12 et 14,5 minutes avec une U.A.C moyenne comprise entre 0,12 et 0,15 unité/ml.

Ces résultats obtenus sont conformes à une activité et à une cinétique coagulante réussie et adapté à toute transformation fromagère.

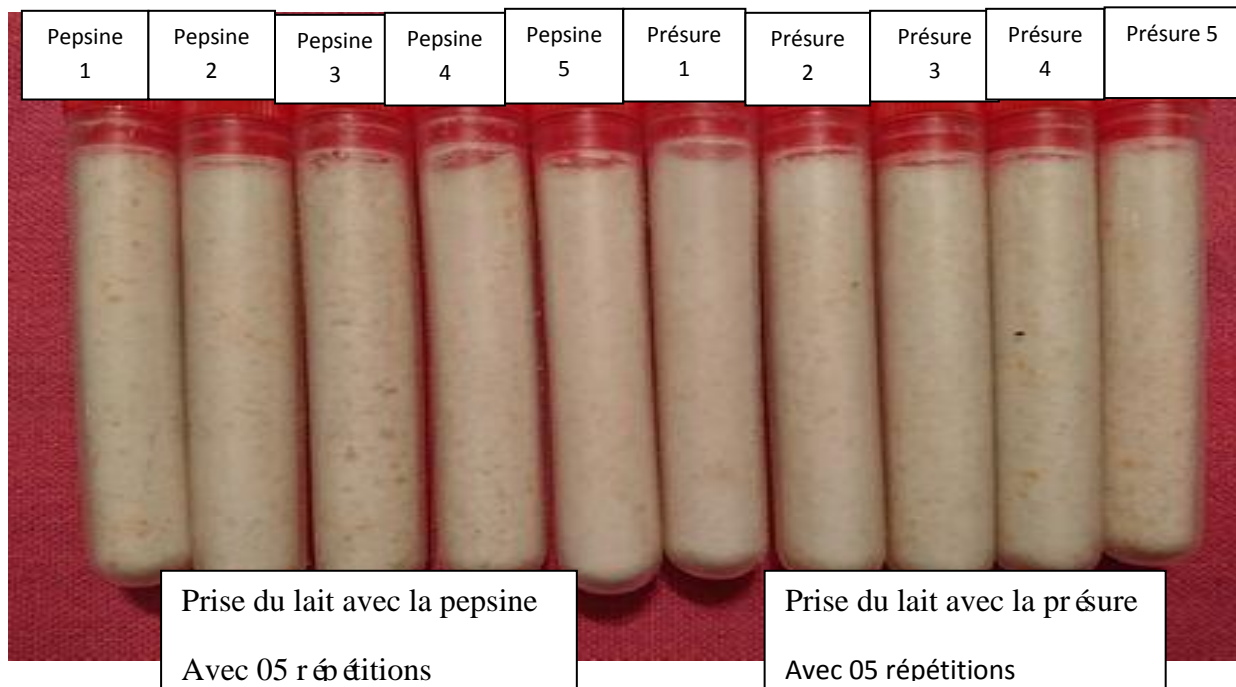


Figure 10 : Aspect du coagulum form é après temps prise et activité enzymatique pour des 02 enzymes.

II.3 Cin é t i q u e d e l a p r o t é o l y s e c o a g u l a n t e

La cin é t i q u e d e l a p r o t é o l y s e c o a g u l a n t e d o n n e p a r a l l è l e m e n t u n e l i b é r a t i o n d ' a z o t e n o n p r o t é i q u e N P N , s o l u b l e d a n s u n e s o l u t i o n d ' a c i d e t r i c h l o r a c é t i q u e T C A à u n e c o n c e n t r a t i o n d e 12%.

Cette lib é r a t i o n é v o l u t i v e d e l a t e n e u r e n a z o t e n o n p r o t é i q u e e n f o n c t i o n d u t e m p s e s t d o n n é d a n s l e t a b l e a u 04

Tableau 04 : Teneur en azote non protéique libéré

| Répétition | Pepsine | | Présure | |
|-----------------|------------------------------|---------------|------------------------------|----------------|
| | NPN (g/100ml)+ Ecart type | % NPN / NT(*) | NPN (g/100ml)+ Ecart type | % NPN / NT (*) |
| 1 | 0,215 ± 0,0016 | 5,77 | 0,210 ± 0,0014 | 5,64 |
| 2 | 0,218 ± 0,0018 | 5,86 | 0,225 ± 0,002 | 6,05 |
| 3 | 0,221 ± 0,0019 | 5,94 | 0,229 ± 0,0025 | 6,15 |
| 4 | 0,227 ± 0,0022 | 6,10 | 0,226 ± 0,0021 | 6,07 |
| 5 | 0,225 ± 0,002 | 6,05 | 0,222 ± 0,002 | 5,96 |
| Moyenne obtenue | 0,221 ± 0,002 | 5,94 | 0,222 ± 0,002 | 5,96 |
| Azote total NT | 3,72 ± 0,035 | 100,00 | 3,72 ± 0,035 | 100,00 |

* Pas de différence significative ($P > 0,05$)

L'analyse de la variance a été faite pour pouvoir déterminer le temps à partir duquel la différence devient non significative entre le nombre de répétition réalisé (05 répétitions).

La teneur en azote non protéique est semblable pour les deux enzymes et se situe à une moyenne 0,22. Après la floculation la teneur en azote non protéique libéré est la même à un temps de prise moyen compris entre 25 et 26 minutes pour les enzymes sur un lait expérimental contrôlé en teneur protéique.

Le taux de NPN / NT pour la coagulation pepsine et la coagulation présure est le même et se stabilise à une moyenne contrôlée de 5,94 -5,96 ce qui confirme la maîtrise des dilutions à l'obtention des temps technologiques conformes à une coagulation enzymatique maîtrisée et adapté à toute transformation fromagère.

La cinétique de la libération de l'azote non protéique NPN pour les 02 types de coagulation est représenté sur la figure qui suit :

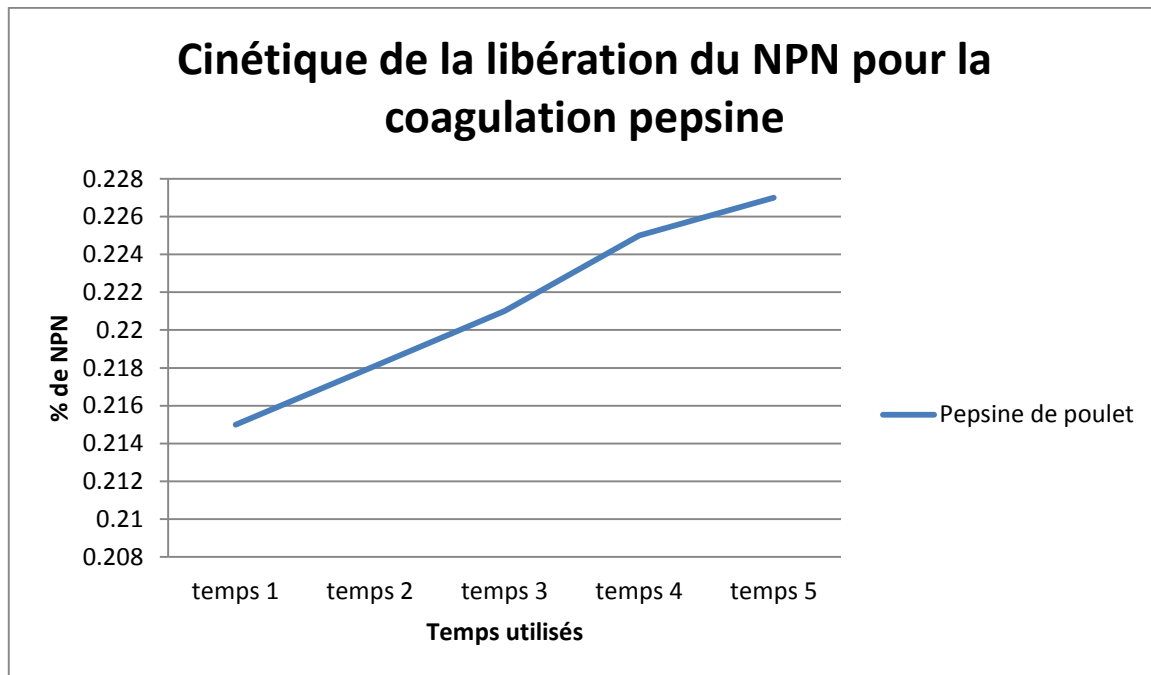


Figure 11 : Cinétique de la libération du NPN pour une coagulation à base de pepsine

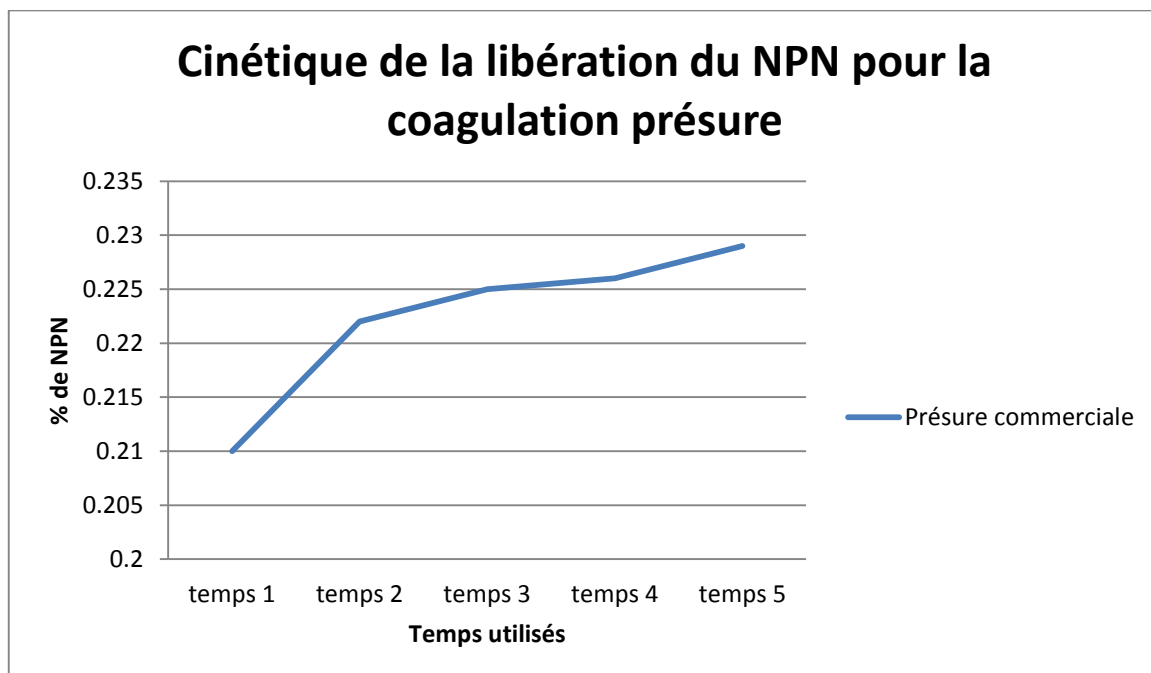


Figure 12 : Cinétique de la libération du NPN pour une coagulation à base de présure

Les deux figures montrent deux cinétiques avec une allure identique. Les taux du NPN libérés sont presque identiques pour les deux enzymes. La moyenne obtenue pour l'enzyme pepsine de poulet est de 0,221 g / 100 ml contre 0,222 g/100 ml pour la présure commerciale.

Après 20 minutes de coagulation, temps de prise de 25 minutes pour la présure commerciale et de 26 minutes pour la pepsine de poulet, le taux NPN est presque identique et significative à cause de la maîtrise des dilutions donnant les mêmes aptitudes de coagulation pour les 02 enzymes.

Gordin et Rosenthal(1978) , Findly *et al.*(1984) , Tanaka *et al.*(2001) et Hamrani (2008) ont montré que la libération d'azote non protéique (soluble dans une solution de TCA 12%) par la pepsine de poulet d'une solution de caséine maintenue à pH 5,49, était égale à celle de la présure lors des premières 15 minutes du temps de floculation. De plus la libération de l'azote dans le lactosérum à fin du temps de prise (estimé à 2 fois le temps de floculation) était égale entre les deux types d'enzymes .

Notre étude a montré que la coagulation par la pepsine de poulet présente les mêmes phases que la coagulation présure. Même si la floculation ne donne pas le même aspect des flocons primaires de coagulation avec la même qualité du lait. Les études de (Mahaut *et al* ,2000) ont montré que les différences des aspects du lait à la floculation sont due essentiellement aux activités protéolytiques des pepsines élevés pour les pH acides (4,6) alors que les présures (à dominance chymosine) tolèrent des pH moyennement acide (5,2)

Cependant au temps de prise le gel obtenu est du même aspect avec un taux de libération d'azote non protéique presque identique à celui de la présure commerciale.

L'analyse statistique des résultats, réalisée par le logiciel statistique MINITAB 19, a donné des valeurs de signification supérieures à 5% avec une activité coagulante presque similaire pour les 02 extraits enzymatiques avec 3,25 UAC/ml pour l'extrait de pepsine contre 3,10 UAC/ml pour la présure commerciale. La cinétique de la coagulation représentée par le pourcentage NPN/NT est aussi presque identique pour les 02 enzymes 5,94 % pour la pepsine de poulet contre 5,96 % pour la présure. Les temps technologiques (temps de prise) , de 1560 secondes pour la pepsine et de 1490 secondes pour la présure ,respectent la norme FIL fixé entre 960 secondes à 1800 secondes pour obtenir un caillé fromager enzymatique conforme.

Conclusion

Conclusion

L'ensemble des résultats aux quels a abouti notre étude constitue une première évaluation de la caractérisation des étapes de la coagulation lors de la substitution de la présure par de la pepsine de poulet.

L'extraction de la pepsine de poulet a permis de donner à partir de 100 g de proventricules 185 ml d'extrait enzymatique de pepsine , donnant un temps de floculation moyen de 55,10 secondes , un temps de prise de 96,50 secondes et une activité coagulante de 3,25 U.A.C/ml. Pour obtenir un temps technologique de floculation compris entre 8 et 15 minutes. L'extrait obtenu doit être dilué à raison de 3%.

Les résultats ne décèlent aucun inconvénient à substituer la présure par de la pepsine de poulet lors de la phase de la coagulation enzymatique.

Au contraire nous avons remarqué des aptitudes avantageuses à la coagulation avec la maîtrise des temps technologiques (de la floculation à la prise totale du coagulum).

La capacité de rétention du lactosérum est un autre avantage avec un taux d'hydratation élevé des deux gels issus des deux activités enzymatiques . Cette capacité de rétention est essentielle à la bonne maîtrise des rendements fromagers escomptés.

La maîtrise de la concentration enzymatique (dilution étudiée de l'extrait enzymatique) de la pepsine de poulet donne des cinétiques de coagulation contrôlées avec de faibles dépenses d'azote non protéique NPN soluble dans le lactosérum.

Cette étude mérite d'être complétée par le suivi du comportement de cette enzyme extraite au niveau de l'affinage du fromage.

En perspectives, il est intéressant de poursuivre cette étude par :

- La détermination du rendement et du coût de l'extraction de la pepsine de poulet.
- La détermination des produits de la protéolyse par électrophorèse lors des différentes phases de la coagulation.
- La détermination des conditions optimales, de pH, de température pour obtenir les meilleures caractéristiques du gel (fermeté synérèse ...).
- La détermination du type de fromage à adapter pour cette enzyme.

Annexes

Annexe A : Caractéristiques techniques de la présure



CHY-MAX[®] M

Le coagulant de première qualité sur le marché

Introduit en 2008, CHY-MAX[®] M a rapidement conquis les cœurs de nombreux fabricants de fromage dans le monde en raison de sa supériorité. CHY-MAX[®] M offre aux fabricants de fromage de nombreux avantages qui varient selon l'application.

Exemples d'avantages

- Rendement fromager accru et meilleur contrôle du processus
- Texture plus ferme pendant la durée de conservation
- Absence d'amertume
- Dosage réduit
- Lactosérum de qualité supérieure
- Empreinte CO₂ réduite

CHY-MAX[®] M est une chymosine (de force 1/125000 à 650 mg de chymosine /100 g) de deuxième génération produite par fermentation (FPC) offrant une spécificité élevée de coagulation du lait associée à une activité protéolytique réduite. CHY-MAX[®] M est proposé dans plusieurs conditionnements et concentrations, sous forme liquide ou granulée. Pour un rendement accru et un meilleur contrôle du caillé, il est possible d'associer CHY-MAX[®] M à YIELDMAX[®].

Annexes

Annexe B : Caractéristiques techniques du lait écrémé en poudre

Caractéristiques techniques

Poudre de Lait Ecrémé Low Heat.

AGROPUR CANADA



Présentation :

Poudre solide obtenue directement par élimination de l'eau du lait écrémé de la vache non atteinte de maladies contagieuses ou de mammites par le procédé de concentration sous vide et séchage spray.

Spécifications Physico-chimiques :

| Critères | Exigences |
|--|--|
| Humidité | ≤ 4% |
| Matière Grasse | 0.15 % Maximum (m/m) |
| Matière Protéique | 34% Minimum sur 100 Grs d'extrait sec dégraissé. |
| WPN index | ≥ 1.51 à 6 mg /g |
| Lactose | 49- 54% |
| Minéraux | 8% Maximum |
| Acidité (exprimée en % d'acide lactique par 100 g de poudre) | 0.15% Maximum |
| Lactates | ≤ 100 mg / 100 g d'extrait sec dégraissé. |
| Test de Ramsdell | Minimum 1.8 ml |
| PH (Reconstitution à 10 %) | 6.60-6.80 |
| Stabilité Thermique (*) | ≥ 12 minutes |
| Solubilité | ≥ 99% minimum |
| Propreté ADPI | A/B |

Annexes

(*) Aucune floculation ou dépôt ne doit pas être observé sur un lait reconstitué à 10% de matière sèche soumis au test de bain d'huile à une température de 140 °C pendant au moins 12 minutes.

Spécifications Microbiologiques :

| Critères | Exigences |
|---|-------------------------|
| Germes aérobies à 30°C (CFU) | Maximum 10 000 |
| Coliformes Totaux (par gr) | 10 |
| Germes Anaérobies sulfito-réducteurs à 46°C | 05 |
| Levures et Moisissures (CFU/gr) | Absence |
| Escherichia Coli (/gr) | Absence |
| Salmonella | Absence dans 30 grammes |
| Mycotoxines | Absence |

Spécifications Toxicologiques :

| Critères | Exigences |
|---------------|---|
| Antibiotiques | Absence |
| Antiseptiques | Absence |
| PCB | ≤ 100 nano grammes par gramme de matière grasse |
| Dioxine | 1 à 4 pico grammes par gramme de matière grasse |
| Fer | 10 ppm max |
| Cuivre | 1.5 ppm max |

Annexes

Concentrations radioactives maximales :

| Source | Concentration radioactive |
|---------------|---------------------------|
| Américium 241 | 1 Becquerel / Kg |
| Plutonium 239 | 1 Becquerel / Kg |
| Iode 131 | 67 Becquerels / Kg |
| Strontium 90 | 67 Becquerels / Kg |
| Césium 134 | 202 Becquerels / Kg |
| Césium 137 | 267 Becquerels / Kg |

Spécifications Organoleptiques :

| Critères | Exigences |
|---------------|---|
| Goût et Odeur | <ul style="list-style-type: none">• Absence d'odeur étrangère et désagréable• Odeur et goût Francs du Lait |
| Aspect | <ul style="list-style-type: none">• Homogène, sans grumeaux, ni points brulés ou colorés. |
| Couleur | <ul style="list-style-type: none">• Poudre blanche ou légèrement crème de couleur homogène. |

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abdellaoui R. (2007)** . Obtention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait d'*Aspergillus niger* isolé sur Sole de la région de Boumerdes. Mémoire de Magister, Université M'hamed Bougara, Boumerdes. 3-7 p.
2. **Alais C (1974)** . Science du lait principes des techniques laitières. 3ème édition 807P.
3. **Alais, C (1982)** . Science du lait - principes des techniques laitières. Paris, Editions Sepaic. 4éd. 814 pages.
4. **Alamargot J (1982)**. Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaires. Maisson_Alfort : Eddu Paint Vétérinaire .1982 ,136p.
5. **Aouissi L et Brinet H (2016)** . Extraction de la pepsine à partir des proventricules des volailles et aptitude à la coagulation du lait. Mémoire de master académique, Université 8 Mai 1945 Guelma. 45 p.
6. **Banga M.H , Godeau J.M , Drion P.V , El Amiri B , Perenyi Z , Souna N.M , Beckers J.F, (2002)**. Evaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguin comme bio marqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc. Ann. Méd. Vét.,146, 339-346.
7. **Bohak Z(1969)** . Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin, The journal of Biological chemistry Vol. 244, N° 17 Sept 1969 PP 4638-4648.
8. **Boughellout H(2007)** . Coagulation du lait par la pepsine de poulet. Mémoire de Magister, Université Mentouri, Constantine. 13-20 p.
9. **Brulé G. et Lenoir J(1987)**. La coagulation du lait in Le Fromage A. Eck 2ème édition Tech. et Doc.
10. **Calvo M.M. Balcones E (2000)**. Some factors influencing the syneresis of bovine, ovine and caprine milks. J Dairy Sci 83: 1733-1739.
11. **Cuvellier G.F (1993)** . Production des enzymes in Biotechnologie. Coord Scriban R. 4ème édition Tec&Doc, Lavoisier. 948 p.
12. **Dalgleish D.G(1997)** . The Enzymatic coagulation of milk. in Advanced Dairy Chemistry V1 Proteins. P.F. Fox Blackie and son Ltd. P579-619.
13. **Daviau C., Famelart M.-H., Pierre A., Goudéranche H. and Maubois J.-L (2000)**. Rennet coagulation of skim milk and curd drainage : Effect of PH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. Lait 80(2000) 397-415.
14. **Desmazeaud M (1997)** . Les enzymes utilisées en industrie laitières PP582-602 in Laits et produits laitiers coord. Luquet F.M. Tech et Doc Lavoisier.

15. **Donald D., Bell.,W. et Daniel W (1972)** . Commercial Chicken Meat and Egg Production, 5th ed. 2002. Soft cover reprint of the original 5 th Ed. 2002 (14 November 2012). Springer Science +Business Media, LCC, 925p.
16. **Eck A et Ghilis J. (2006)** . Le fromage., lavoisier TEC et DOC 3 eme edition .,891 p.
17. **Ernstrom C.A (1983)**. Milk clotting enzymes and their action in fundamentals of dairy chemistry. Webb B.H., AH. Johnson and J.A. Alford . The Avi Publishing company Inc. 2nd Edition. PP 663-718.
18. **F.I.L ;** la référence ISO 707/ F.I.L octobre 2018 (Normes définies pour les analyses microbiologiques et chimique des laits , produits laitiers et des laits en poudre
19. **Findly C.I,StanleyD.W et Coumons D.B (1984)**. Chicken pepsin as rennet substitute. Food SCT. Journal 17(2) : 97-101.
20. **Florian R (2012)** . Le lait et sa coagulation (**image en ligne**), **disponible à l'adresse** :<https://www.youlab.fr/blog/ressources-scientifiques-bibliographie/le-lait-et-sa-coagulation/>.
21. **Fox P.F., Singh T.K. et Mc Sweenely P.L.H. (1994)**. Proteolysis in cheese during ripening. 1-32 p.
22. **Fruton. J (2002)** A History of Pepsin and Related Enzymes , Q Rev Biol Vol. 77-127p.
23. **Ghaoues S (2011)**. Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien.
24. **Gorden S et Rosenthali I(1978)**. Efficacy of chicken pepsin as a milk-clotting enzyme. Journal of food protection September Vol. 41 N° 9. 684-688 p.
25. **Hamrani L (2008)**. Etude comparative de deux protéases coagulant le lait , extraites de proventricules de poulet et d'estomacs de Limon. Thèse de doctorat, 77p.INA ElHarrach, Alger.
26. **Jean c. c (2015)**. Présures et coagulants de substitution (comment faire le bon choix), QUAE. 200p.
27. **Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brule G(2008)**. Les produits laitiers. Ed. Tec& Doc, Lavoisier, 39-40 p.
28. **JORA « Journal Officiel de la République Algérienne N°39 du 02/07/2017**. Relatif aux spécifications microbiologiques et physico-chimiques de certaines denrées alimentaires.
29. **Karesten. A (1937)**. Le Lait.918-927p. 53- 59 p.

30. **Kellil S (2015)**. Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie. Thèse de Doctorat, Université M'hamed Bougara, Boumerdes. 24 p.
31. **Larbaletrier A (2015)** .Traité pratique,de,laiterie: Lait, crème, beurre et fromages. Edition MAXTOR.ISBN 979102080139 (266p).France.
32. **Lenoir J., Schneid N (1987)**. L'aptitude du lait à la coagulation par la présure in Le Fromage A. Eck 2ème édition Tech. et Doc.
33. **Lij D et Daligleish G (2006)**. Mixed coagulation of milk – gel formation and mechanism, J. Agric. Food Chem. 54, 4687–4695.
34. **Lodaite K., Ostergren K., Paulson M. and Dejmek P (2000)**.One dimensional syneresis of rennet-induced gels. International Dairy Journal 10 (2000) 829-834.
35. **Lucey J.A. (2002)**. Formation and physical properties of milk protein gels. J. Dairy Sci. 8: 281-294.
36. **Lucey J.A., Johnson M.E. Horne D.S (2003)**. ADSA invited review : perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. J. Dairy Sci. 86 : 2725-2743.
37. **Luquet M (1985)**. Lait ET produits laitiers. Vache, brebis, chevre. 1. Les laits. De la mamelle a la laiterie. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 884p.
38. **Mahaut M., Jeantet R. et Brulé G (2000)**. Initiation à la technologie fromagère .Ed.Tec et Doc , Lavoisier , Paris 194 p.
39. **Mailhe M. et pressa M (1860)**. De la pepsine et ses propriétés gastriques, Librairie de victor masson ,32p.
40. **Manchester K (2004)**. The Crystallization of Enzymes and Virus Proteins: Laying to Rest the Colloidal Concept of Living Systems , Endeavor, 28- 25 p
41. **Payne T.C (2009)**. Enzymes in meat systems . « Enzymes Chapter 8 .R.Tarté (ed.), Ingredient in meat products : Properties, Functionality and Applications.26p
42. **Polaina J., and Maccabe A.P (2007)** . Industrial enzymes .Structure , Fonction and Applications .New York : Springer .12p.
43. **Richardson G.H (1975)**. Dairy industry p 362-391 in Enzymes in food Processing. G. Reed 2nd edition. Academic press 573 pp
44. **Riser. M., Huff. B., and Medina. D(1983)**. Pepsin Can Be Used To Subculture Viable Mammary Epithelial Cells, In Vitro 19, 730,
45. **Roudot A.C (2002)** Rhéologie et analyse de texture des aliments. Tech et Doc 2002 (2000) 829-834.

- 46. Rymond K (1999).** Biologie et physiologie animales: bases moléculaires, cellulaires, traduction de la 3ème Ed allemande par Christiane Meyer Révision scientifique par Raymond kirsch, 282-285p.
- 47. Siar H (2014).** Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait. Mémoire de Magister, Université Constantine 1. 17-32 p.
- 48. Staffan. M. et al (1977).** From regulatory proteolytic enzymes and their inhibitors, Ed Pergamum press, 1978 University du Michigan .28Juil.2008, 35-38 p.
- 49. Tanaka T. et Yada R (2001).** N terminal portions acts as an initiation of the inactivation of pepsin at neutral Ph .Protein Engineering ,14(9) :669-674.
- 50. Tunick M.H (2000).** Symposium: Dairy product rheology, rheology of dairy foods that gel, stretch and fracture. J. Dairy Science 83: 1892-1898.
- 51. Vignola C.L (2002).** Science et technologie du lait, transformation du lait. Presses internationales polytechnique, Québec; 608 p.
- 52. Weber F(1997).** L'égouttage du coagulum in Le Fromage A. Eck 2ème édition Tech. et Doc.

Table des matières

Table des matières

Page

Remerciements

Dédicaces

| | |
|--|------------|
| Abréviations , sigles, acronymes et symboles..... | III |
| Liste des tableaux..... | V |
| Liste des figures..... | VII |
| Liste des Annexes..... | IX |
| Sommaire..... | XI |
| Introduction | 13 |

Revue de littérature

Chapitre I : Enzymes utilisées en fromagerie

| | |
|---|----|
| 1.Origine..... | 17 |
| 2. Les enzymes coagulantes..... | 17 |
| 2.1. Enzymes d'origine microbienne..... | 17 |
| 2.2. Enzymes d'origine végétale | 19 |
| 2.3. Enzymes d'origine animale..... | 19 |
| 3. La présure..... | 19 |
| 3.1. Succédanés de la présure..... | 20 |
| 4. Pepsine..... | 21 |
| 4.1 La pepsine porcine | 21 |
| 4.2 La pepsine bovine..... | 22 |
| 4.3 La pepsine de poulet..... | 22 |
| 4.3.1 Proventricule de poulet..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 5. Comparaison des différentes enzymes protéase..... | 25 |
|--|----|

Chapitre II : Coagulation du lait et formation du gel fromager

| | |
|--|----|
| 1. Définition..... | 27 |
| 2. Différents types de coagulation..... | 27 |
| 2.1. Coagulation acide..... | 27 |
| 2.2. Coagulation mixte..... | 27 |
| 2.3. Coagulation enzymatique | 27 |
| 3. Etapes de coagulation..... | 28 |
| 3.1. Phase primaire..... | 28 |
| 3.2. Phase secondaire..... | 29 |
| 3.3. Phase tertiaire..... | 29 |
| 4. Facteurs influençant la coagulation..... | 30 |
| 4.1. Concentration en enzyme..... | 31 |
| 4.2. Température..... | 31 |
| 4.3. pH..... | 31 |
| 4.4. Teneur en calcium..... | 31 |
| 4.5. Teneur en caséines..... | 31 |
| 4.6. Dimension des micelles..... | 32 |
| 5. Evaluation de la coagulation..... | 33 |
| 5.1. Temps de coagulation..... | 33 |
| 5.2. Temps de prise..... | 33 |
| 5.3. Activité coagulante..... | 33 |
| 5.4. Force coagulante..... | 33 |
| 6. Mécanisme de la synérèse et de l'égouttage..... | 33 |
| 7. Propriétés rhéologiques du caillé..... | 35 |

Etude expérimentale

I- Matériels et Méthodes

| | |
|--|----|
| 1.Méthodologie..... | 38 |
| 2. Provenance des échantillons expérimentaux..... | 38 |
| 2.1 Les proventricules de poulet..... | 38 |
| 2.2 Le lait..... | 38 |
| 2.3 La présure animale..... | 38 |
| 3.Extraction de la pepsine..... | 39 |
| 4. Techniques d'analyse..... | 41 |
| 4.1 Caractérisation du lait reconstitué..... | 41 |
| 4.1.1 Détermination de l'acidité titrable : Norme F.I.L ISO 707..... | 41 |
| 4.1.1.1 Définition..... | 41 |
| 4.1.1.2 Principe..... | 41 |
| 4.1.1.3 Réactifs..... | 41 |
| 4.1.1.4 Mode opératoire..... | 41 |
| 4.1.1.5 Expression des résultats..... | 41 |
| 4.1.2 Mesure du pH : Norme F.I.L ISO 707..... | 42 |
| 4.1.2.1 Définition..... | 42 |
| 4.1.2.2 Principe..... | 42 |
| 4.1.2.3 Réactifs..... | 42 |
| 4.1.2.4 Mode opératoire..... | 43 |
| 4.1.3 Détermination de l'extrait sec total du lait : validée par la norme FIL ISO707..... | 43 |
| 4.1.4 Détermination de la teneur en azote total (protéines) et de l'azote non protéique NPN : Norme F.I.L ISO 707..... | 43 |
| 4.1.4.1 Minéralisation..... | 44 |

| | |
|--|----|
| 4.1.4.2 Distillation et dosage de l'azote total..... | 44 |
| 4.2 Caractérisation de l'extrait enzymatique..... | 45 |
| 4.2.1.1 Détermination du temps de floculation..... | 45 |
| 4.2.1.2 Détermination du temps de prise..... | 46 |
| 4.3 Cinétique de la protéolyse..... | 46 |
| 4.4. Analyse statistique..... | 47 |

II- Résultats et Discussions

| | |
|---|-----------|
| II.1. Qualité physico-chimique du lait expérimental utilisé..... | 49 |
| II.2. Qualité de la pepsine de poulet extraite en comparaison à la présure commerciale..... | 50 |
| II.3. Cinétique de la protéolyse coagulante..... | 52 |
| Conclusion..... | 57 |
| Annexes..... | 59 |
| Références Bibliographiques..... | 64 |

Résumé, ملخص , Abstract

Résumé

Dans cette étude nous avons essayé de substituer la présure commerciale par la pepsine de poulet comme agent coagulant du lait. Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé à l'extraction de la pepsine de poulet à partir des proventricules, et la caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu. Afin de comparer l'effet de la pepsine à celui de la présure, nous avons approché les temps technologiques de coagulation représentés par la floculation et la prise, l'activité protéolytique a été contrôlée par la cinétique de la coagulation. Les résultats obtenus ont montré la conformité des temps de floculation respectant la norme FIL entre 8 et 15 minutes. La coagulation par la pepsine de poulet se produit à un taux de libération d'azote non protéique identique à celui de la présure commerciale. En utilisant des dilutions contrôlées des extraits enzymatiques, le gel pepsine a présenté le même comportement rhéologique que le gel présure avec une floculation entre 12 et 14,5 minutes et une U.A.C moyenne comprise entre 0,12 et 0,15 unité/ml. Il a été observé aucune différence significative pouvant empêcher la substitution de la présure par la pepsine de poulet lors de la phase de coagulation enzymatique.

Mots-clés : coagulation, pepsine de poulet, présure, protéolyse.

المخلص

في هذه الدراسة ، حاولنا استبدال المنفحة التجارية بالدجاج بيبسين الدجاج مع الحليب المكسور إلى بيبسين. لتحقيق هذا الهدف ، شرعنا في استخراج البيبسين من الكريات وتوصيف المستخلص الإنزيمي الذي تم الحصول عليه. من أجل مقارنة تأثير البيبسين مع تأثير المنفحة ، اقتربنا من أوقات التخثر التكنولوجي للتبلد والتحصير ، وتم التحكم في نشاط التحلل بواسطة حركة التخثر. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن أوقات التبلد قد لوحظت مع مراعاة معيار الاتحاد الدولي للحليب بين 8 و 15 دقيقة ، ويحدث التخثر مع بيبسين الدجاج بمعدل إطلاق من النيتروجين بخلاف البروتين المقابل لـ المنشطات. تجاري. باستخدام التخفيفات الخاضعة للرقابة من مستخلصات الإنزيم ، أظهر هلام البيبسين نفس السلوك المبسط مثل المنفحة باستخدام التخفيفات الخاضعة للرقابة من المستخلصات الأنزيمية، أظهر جل البيبسين نفس السلوك الريولوجي مثل جل الريسور floculation بين 12 و 14.5 دقيقة ومتوسط U.A.C بين 0.12 و 0.15 وحدة / مل

الكلمات المفتاحية: تخثر الدم ، بيبسين الدجاج ، المنفحة ، انهيار البروتين

Abstract

In This study we tried to substitute commercial rennet with chicken pepsin as the milk coagulant. To achieve this objective, we proceeded to the extraction of chicken pepsin from proventricules, and the characterization of the enzymatic extract obtained. In order to compare the effect of pepsin to that of rennet, we approached the technological clotting times represented by flocculation and setting, the proteolytic activity was controlled by the kinetics of coagulation. The results obtained showed the conformity of the flocculation times respecting the IDF standard between 8 and 15 minutes. Coagulation with chicken pepsin occurs at a rate of release of non-protein nitrogen identical to that of commercial rennet. Using controlled dilutions of enzymatic extracts, pepsin gel exhibited the same rheological behavior as rennet gel with flocculation between 12 and 14.5 minutes and an average U.A.C. between 0.12 and 0.15 unit/ml. No significant difference was observed which could prevent the substitution of rennet by chicken pepsin during the enzymatic coagulation phase.

Keywords: coagulation, chicken pepsin, rennet, proteolysis.