

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI OUZOU**  
**FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES**  
**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE**



**Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de**  
**Master en Sciences biologiques**  
**Option : Biochimie de la nutrition**

**Thème :**

***Extraction et caractérisation des  
extraits coagulants issus de caillettes  
de dromadaires adultes et non sevrés***

**Présenté par :**

**BENHAMADOUCHE Yasmine et NESNAS Assia**

**Soutenu le : 14 juillet 2019**

**Devant le jury :**

**Promotrice : Mme ISSELNANE-TAMACHE S.**

**Maître assistante A.**

**Présidente : Mme DERMECHE S.**

**Maître assistante A.**

**Examinatrice : Mme SI AHMED-ZENNIA S.**

**Maître de conférence B.**

**Examinatrice : Mme ALMI-SEBBANE D.**

**Maître de conférence B.**

**Année universitaire : 2018/2019**

## **Remerciements**

*Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de finaliser se travail dans de meilleurs conditions.*

*Nous tenons à exprimer toute nos gratitudee et nos sincères remerciements à Monsieur MATI A., professeur en biochimie appliquée à l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi Ouzou, pour nous avoir accueillis dans son laboratoire de recherche biochimie analytique et biotechnologies(LABAB) en nous proposons ce travail et qui a mis à notre disposition les conditions et matériels nécessaires pour la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nos sincères remerciements vont également à notre promotrice M<sup>me</sup> ISSALNANE –TAMACHE Souad qu'elle nous soit permise de la remercier vivement, et lui exprimer notre profonde gratitude pour l'aide précieuse et les conseils qu'elle nous sans cesse prodigué afin de mener à terme ce travail. Tout ce travail lui doit beaucoup, elle nous avons initié à la recherche et nous avons transmis ses connaissances. Nous lui rendons hommage pour avoir lutte avec nous devant toutes les entraves afin que notre travail soit mené à de meilleurs résultats.*

*Tous nos enseignants trouvent ici l'expression de notre profond respect. Un grand merci à tous les membres du laboratoire de biochimie qui grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur, nous ont soutenu en rendant agréables les moments de travail :*

- ✓ *Mme ISSELNANE-TAMACHE S. Maître assistante A.*
- ✓ *Mme DERMECHE S.: présidente, Maître assistante A.*
- ✓ *Mme SI AHMED-ZENNIA S.: examinatrice, Maître de conférences B.*
- ✓ *Mme ALMI-SEBBANE D.: examinatrice, Maître de conférences B.*

*Nous tenons à remercier aussi très chaleureusement les personnels de la bibliothèque.*

*Enfin, nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail Qu'ils trouvent ici l'expression de toute notre reconnaissance et notre noble gratitude.*

## *DEDICACE*

*Je dédie ce travail*

*A ma très chère mère pour tous ses  
sacrifices et ses soucis pour les besoins de  
nos études,*

*A mon très cher père pour tous les efforts  
fournis afin de nous voir un jour réussir  
nos projets et nos études,*

*A mes frères, Mebrouk, Hocine, Ahcen et  
sa femme Linda pour leurs soutien et  
encouragements sans limite,*

*A tous mes amies et amis : Ziza, Meliza,  
Hlima, Nina, Ouiza, Hakima, Sonia...et  
plus particulièrement à Fissa qui a été  
tout le temps à mes cotés, qui m'a aidé et  
soutenu jusqu'à ce jour.*

*Assia*

## *DEDICACE*

*Je dédie ce travail*

*A ma très chère mère pour tous ses  
sacrifices et ses soucis pour les besoins de  
nos études,*

*A mon très cher père pour tous les efforts  
fournis afin de nous voir un jour réussir  
nos projets et nos études,*

*A Mon frère Abdelhak et sa femme  
Nadia, ma sœur Rima et son mari pour  
leurs soutien et encouragements sans  
limite,*

*A mes chers neveux Rayane et Aymane,*

*A tous mes amies : Lamia, Assia, Nesrine,  
Meliza, Sabrina.*

*Yasmine*

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
<b>Figure 1</b>	Systématique des camélidés.	<b>01</b>
<b>Figure 2</b>	Les effectifs d'élevage camelin dans le monde.	<b>02</b>
<b>Figure 3</b>	Effectifs du cheptel camelin dans le monde arabe.	<b>03</b>
<b>Figure 4</b>	Evolution d'élevage camelin en Algérie.	<b>03</b>
<b>Figure 5</b>	Répartition géographique des principales races de dromadaires en Algérie.	<b>05</b>
<b>Figure 6</b>	La part du lait de chamelle dans le monde.	<b>05</b>
<b>Figure 7</b>	La production laitière nationale de chaque espèce.	<b>06</b>
<b>Figure 8</b>	Anatomie de l'estomac d'un ruminant et d'un camélidé.	<b>07</b>
<b>Figure 9</b>	La composition chimique globale du lait de chamelle comparée avec le lait de vache.	<b>08</b>
<b>Figure 10</b>	Modèle de micelle de caséine avec la sous unité k.	<b>12</b>
<b>Figure 11</b>	Comparaison des régions sensibles à la chymosine des caséines k camelines et bovines.	<b>13</b>
<b>Figure 12</b>	Structure par rayon X de la pepsine porcine, diagramme en ruban.	<b>18</b>
<b>Figure 13</b>	Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine recombinante et cameline recombinante.	<b>19</b>
<b>Figure 14</b>	Structure par rayon X de la pepsine porcine. Vue agrandie des résidus Asp du site actif avec la molécule d'eau qui leur est lié.	<b>19</b>
<b>Figure 15</b>	Mécanisme d'action des protéases aspartiques.	<b>20</b>
<b>Figure 16</b>	Modifications de la structure micellaire au cours de l'acidification.	<b>21</b>
<b>Figure 17</b>	Modifications de la structure micellaire au cours de la coagulation présure.	<b>22</b>
<b>Figure 18</b>	Plasmide de l'expression pGAMpR-C d' <i>Aspergillus. Niger</i> .	<b>24</b>
<b>Figure 19</b>	Protocole d'isolement des extraits enzymatiques gastriques préconisé par VALLES et FURET (1977) pour le bovin, et adapté aux extraits issus de caillettes de dromadaire.	<b>34</b>
<b>Figure 20</b>	Courbe d'étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence.	<b>35</b>
<b>Figure 21</b>	Mesure du temps de floculation par la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLIN et al (1977).	<b>37</b>
<b>Figure 22</b>	Courbe d'étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al (1951). La tyrosine est utilisée comme protéine de référence.	<b>39</b>

<b>Figure 23</b>	Protocole d'isolement des caséines et des protéines du lactosérum à partir du lait bovin (SCHAMET et al, 1992) et du lait camelin (WONGOHO et al, 1998).	<b>40</b>
<b>Figure 24</b>	Rapport AC/AP pour les extraits coagulants.	<b>44</b>
<b>Figure 25</b>	Influence de la température sur l'activité coagulante de l'ECD A et l'ECD NS.	<b>45</b>
<b>Figure 26</b>	Influence de la température sur l'activité coagulante de la pepsine et la chymosine.	<b>46</b>
<b>Figure 27</b>	Influence de la stabilité thermique sur les extraits coagulants ECD A, ECD NS, pepsine et chymosine à 50°C en fonction du temps.	<b>48</b>
<b>Figure 28</b>	Influence de la stabilité thermique sur les extraits coagulants ECD A, ECD NS, pepsine et chymosine à 55°C en fonction du temps.	<b>49</b>
<b>Figure 29</b>	Influence de la stabilité thermique sur les extraits coagulants ECD A, ECD NS, pepsine et chymosine à 60°C en fonction du temps.	<b>50</b>
<b>Figure 30</b>	Influence du pH de l'ECD A, ECD NS et PEP sur l'activité coagulante.	<b>52</b>
<b>Figure 31</b>	Influence de la concentration en CaCl <sub>2</sub> sur l'activité coagulante de l'ECD A, ECD NS, CHYM et PEP.	<b>54</b>
<b>Figure 32</b>	Effet de la concentration des caséines cameline (a) et des caséines bovines (b) sur l'ECD A.	<b>56</b>
<b>Figure 33</b>	Effet de la concentration des caséines cameline (a) et des caséines bovines (b) sur l'ECD NS.	<b>57</b>
<b>Figure 34</b>	La Cinétique de l'ECD A sur les caséines cameline (a) et sur les caséines bovines (b) selon la représentation de Lineweaver-Burk.	<b>58</b>
<b>Figure 35</b>	La Cinétique de l'ECD NS sur les caséines camelines (a) et sur les caséines bovines (b) selon la représentation de Lineweaver-Burk.	<b>59</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau I</b>	Composition moyenne en acides gras des laits de chamelle et de vache.	<b>08</b>
<b>Tableau II</b>	Composition moyenne en principaux minéraux du lait de dromadaire et le lait de vache (g/l).	<b>09</b>
<b>Tableau III</b>	Composition en vitamines ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) du lait de chamelle avec le lait de vache.	<b>10</b>
<b>Tableau IV</b>	teneurs comparatives des fractions azotées (mg/100ml) du lait camelin et bovin.	<b>10</b>
<b>Tableau V</b>	Caractéristiques physico-chimiques de la caséine <i>K</i> bovine et cameline.	<b>13</b>
<b>Tableau VI</b>	Caractéristiques physico-chimiques de la chymosine bovine et cameline.	<b>16</b>
<b>Tableau VII</b>	Caractéristiques physico-chimiques de la pepsine bovine et cameline.	<b>16</b>
<b>Tableau VIII</b>	La comparaison de la ration C/P des différents types de la chymosine avec une concentration en calcium supérieure à 2 mM et une température supérieure à 50°C.	<b>24</b>
<b>Tableau IX</b>	La comparaison de l'activité coagulante du lait cru bovin et camelin par différentes chymosines recombinante.	<b>25</b>
<b>Tableau X</b>	Caractéristiques physico-chimiques de la chymosine fermentaire.	<b>25</b>
<b>Tableau XI</b>	La composition et le rendement du fromage Cheddar (stocké 60jour) fabriqué par la CCR et la CBR.	<b>26</b>
<b>Tableau XII</b>	Évaluation sensorielle du fromage Domiati au lait de chamelle fait par les enzymes coagulantes CCR et CBR pendant la période de stockage à $4 \pm 1$ ° C.	<b>29</b>
<b>Tableau XIII</b>	Le rendement moyen des fromages	<b>29</b>
<b>Tableau XIV</b>	Caillettes de dromadaires utilisées.	<b>31</b>
<b>Tableau XV</b>	Rendement d'extraction pour les deux ECD non sevrés et adulte.	<b>41</b>
<b>Tableau XVI</b>	Concentration en protéines des extraits et leurs activité coagulante (UP) et protéolytique.	<b>42</b>

### Liste des abréviations

<b>AC</b>	Activité coagulante
<b>AP</b>	Activité protéolytique
<b>BSA</b>	Sérum albumine bovine
<b>CBR</b>	Chymosine bovine recombinante
<b>CCR</b>	Chymosine cameline recombinante
<b>CMP</b>	Caséinomacropéptide
<b>DO</b>	Densité optique
<b>ECD</b>	Extraits issus des caillettes de dromadaires
<b>ECD A</b>	Extraits issus des caillettes de dromadaires adultes
<b>ECD NS</b>	Extraits issus de caillettes de dromadaires non sevrés
<b>FAO</b>	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>k-CN</b>	Caséines Kappa
<b>MM</b>	Masse moléculaire
<b>P/V</b>	Poids/Volume
<b>V/V</b>	Volume/Volume
<b>PEP</b>	Pepsine porcine
<b>CHY</b>	Chymosine
<b>Phi</b>	pH isoélectrique
<b>PM</b>	Poids moléculaire
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficient de corrélation
<b>TCA</b>	Acide trichloracétique
<b>UP</b>	Unité présure
<b>FPC</b>	Chymosine produite par fermentation

## Résumé

Le dromadaire (*camelus dromedarius*) est un animal particulièrement adapté aux rudes conditions agro-climatiques des régions arides et semi-arides. La transformation du lait de chamelle en fromage présente des difficultés ayant pour origine une teneur réduite en caséine Kappa et une aptitude très limitée à l'acidification et à la coagulation enzymatique. Parmi les adaptations technologiques proposées par les auteurs, figure la possibilité de substituer des enzymes gastriques camelines à la présure. Dans le présent travail, nous avons étudié les activités coagulantes et protéolytiques d'extraits enzymatiques coagulants issus de caillettes de dromadaires non sevrés (ECD NS) et adultes (ECD A). L'ECD A se caractérise par une activité coagulante (5,40 UP) légèrement supérieure à celle de l'ECD NS (5 UP), tant dit que ce dernier possède une activité protéolytique plus faible envers les caséines camelines et bovines. L'activité coagulante maximale des deux extraits était obtenue à des températures de 60°C, un pH de 2,2 et une concentration en CaCl<sub>2</sub> de 0,07 M. L'étude cinétique des deux extraits a montré que les constantes de Michaelis (KM) sont de 5,816 µM et 9,539 µM et des vitesses maximales (Vmax) sont de 69,76 µM/min et 84,34 µM/min pour l'ECD A et l'ECD NS respectivement dans le cas des caséines camelines. On a également obtenu KM de 11,86 µM et 23,8 µM et des Vmax de 246,7 µM/min et 749,9 µM/min pour l'ECD A et l'ECD NS respectivement dans le cas des caséines bovines.

**Mot clés :** Dromadaire, caillettes, extraits coagulants, activité coagulante, activité protéolytique, cinétique enzymatique.

## Abstract

The camel (*camelus dromedarius*) is an animal particularly adapted to the harsh agro-climatic conditions of the arid and semi-arid regions. Transformation of camel's milk into cheese presents difficulties related to this milk's low levels of Kappa casein and very limited ability to acidify or enzymatically coagulate. One technological adaptation proposed by the authors involves the use of camel gastric enzyme extract rather than bovine rennet. In the present work, we have studied the milk clotting and proteolytic activities of the crude enzymatic extract derived from unweaned camel (ECD NS) and adult (ECD A) abomasum. ECD A is characterized by slightly higher milk clotting activity (5.40 UP) than ECD NS (5 UP), as long as it has a lower proteolytic activity towards camel and bovine caseins. The maximum milk clotting activity of both extracts was obtained at temperatures of 60 ° C, a pH

of 2.2 and a CaCl<sub>2</sub> concentration of 0.07 M. The kinetic study of the two extracts showed that the Michaelis constants (  $K_M$ ) are 5, 816  $\mu\text{M}$  and 9.539  $\mu\text{M}$  and maximum speeds ( $V_{\text{max}}$ ) are 69.76  $\mu\text{M} / \text{min}$  and 84.34  $\mu\text{M} / \text{min}$  for ECD A and ECD NS respectively in the case of camel caseins. . There was also obtained  $K_M$  of 11, 86  $\mu\text{M}$  and 23.8  $\mu\text{M}$  and  $V_{\text{max}}$  of 246.7  $\mu\text{M} / \text{min}$  and 749.9  $\mu\text{M} / \text{min}$  for ECD A and ECD NS respectively in the case of bovine caseins.

**Key words :** Dromedary, abomasus, crude enzymatic extracts, milk clotting activity, proteolytic activity, enzymatic kinetic.

## Sommaire

<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction</b>	<b>01</b>
<b>Partie 01 : Synthèse bibliographique</b>	
1. Classification du dromadaire	<b>03</b>
2. Importance économique	<b>04</b>
2 .1. Effectif du cheptel camelin	<b>04</b>
2.1.1. Les populations camelines Algériennes	<b>06</b>
2.2. Production laitière	<b>06</b>
2.2.1. La production mondiale du lait camelin	<b>06</b>
2.2.2. La production nationale du lait de chamelle	<b>07</b>
3. Disposition de l'estomac	<b>08</b>
4. La composition du lait de chamelle	<b>09</b>
4.1. La composition chimique	<b>09</b>
4.2. Matière grasse	<b>10</b>
4.3. Les minéraux	<b>10</b>
4.4. Les vitamines	<b>11</b>
4.5. La fraction azotée	<b>12</b>
4.6. Les protéines camelines	<b>12</b>
5. Les enzymes coagulantes utilisées en technologie	<b>15</b>
5.1. Les enzymes d'origine végétale	<b>15</b>
5 .2.Les enzymes d'origine microbienne	<b>16</b>
5.3. Les enzymes d'origine animale	<b>16</b>
6. Etude de la structure des enzymes coagulantes d'origine animale	<b>19</b>
6.1. Structure primaire	<b>19</b>
6.2. Structure secondaire et tertiaire	<b>19</b>
6.3. Site actif et mécanisme catalytique	<b>20</b>
7. La coagulation	<b>22</b>
7.1. Définition	<b>22</b>
7.2. Types de coagulation	<b>22</b>

7.3. Aptitude du lait de chamelle à la coagulation	24
8. La production fromagère par la chymosine cameline recombinante	24
8.1. La chymosine produite par génie génétique	25
8.2. La production fromagère	27
8.3. Les étapes de fabrication du fromage	28
8.4. La mesure des propriétés sensorielles et texturales	30
8.5. Le rendement fromager	31
8.6. Les avantages des enzymes fermentaires	31
<b>Partie 02 : Partie expérimentale</b>	
<b>1. Matériels et méthodes</b>	
1. Matériels	32
1.1. La source enzymatique	32
1.2. Les matériels biologiques	32
1.3. L'appareillages	33
1.4. Le petit matériel	33
1.5. Les produits chimiques et réactifs	33
2. Méthodes	33
2.1. L'extraction des enzymes coagulantes	33
2.2. Calcul du rendement de l'extraction	34
2.3. Caractérisation des extraits coagulants gastriques	34
2.3.1. Dosage des protéines totales	36
2.3.2.1. Détermination de la température optimale	37
2.3.2.2. Détermination de la stabilité thermique	37
2.3.2.3. Détermination du pH optimum	39
2.3.2.4. Détermination de la concentration optimale de CaCl <sub>2</sub>	39
2.3.2.5. Détermination des paramètres cinétiques	39
2.3.3. Mesure de l'activité protéolytique	39
2.4. Les statistiques	40
<b>2. Résultats et discussions</b>	
2.1. Le rendement d'extraction des enzymes coagulantes	42
2.2. La caractérisation des extraits de caillettes de dromadaires non sevrés et adultes	42
2.2.1. Mesure de l'activité coagulante et protéolytique	42

2.2.2. Le rapport activité coagulante/ activité protéolytique	<b>44</b>
2.3. Les facteurs affectant l'activité coagulante de l'ECD A et l'ECD NS	<b>46</b>
2.4. Les paramètres cinétiques des extraits coagulants	<b>56</b>
<b>Conclusion générale</b>	<b>61</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et comportementales du dromadaire, lui permettant de produire et de se nourrir dans les conditions écologiques les plus difficiles, le dromadaire demeure l'animal d'élevage le plus adapté aux régions désertiques. Cet animal a toujours joué, et joue encore, un rôle considérable dans le développement de l'économie régionale des zones arides de par le monde, par ses productions et services variés.

Parmi ces productions, le lait camelin est un aliment de grande valeur nutritionnelle, car il est bien équilibré en nutriments de base (glucides, lipides et protides). Il se singularise en outre par sa richesse en vitamine C, en oligoéléments et en certaines protéines et enzymes (lysozyme, lactoperoxydase, lactoferrine) qui forment un système protecteur puissant avec une activité antimicrobienne intense. Les vertus thérapeutiques qui lui sont attribuées et sa valeur alimentaire plaident naturellement en faveur du développement et de l'extension de l'élevage camelin laitier. Toutefois, sa valorisation est encore assez limitée compte tenu de ses aptitudes faibles à la coagulation.

Les essais menés pour la valorisation de ce produit *via* sa transformation ont montré sa faible aptitude à la coagulation par la présure. Cette caractéristique assignée à la composition quantitative et qualitative de ce lait se traduit par des temps de floculation et de coagulation plus longs et par une faible consistance des gels obtenus.

Dans le but de remédier au retard à la coagulation du lait de chamelle, des adaptations technologiques ont été proposées par divers auteurs. Les corrections recommandées reposent généralement sur l'amélioration de la teneur en matière sèche et de l'équilibre salin de ce lait. Toutefois, le choix des enzymes coagulantes à employer demeure le facteur déterminant des temps de floculation et de coagulation du lait. En effet, des travaux antécédents ont révélé le statut privilégié de la pepsine bovine qui se concrétise par des temps de floculation plus faibles lors de la coagulation enzymatique du lait. Dans ce contexte, les auteurs préconisent l'utilisation des enzymes coagulantes issus des estomacs de dromadaires, dans le but d'améliorer le temps de floculation du lait camelin, et donc sa capacité à coaguler.

Bien que présentant ces aptitudes technologiques plus limitées, ce lait a été testé avec succès dans la fabrication de plusieurs produits dérivés (fromage, laits fermentés, beurre, crèmes glacées...), ce qui laisse augurer de réelles possibilités d'utilisation de ce produit par les populations du sud du pays sous des formes variées.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à faire une extraction et caractérisation des extraits coagulants issus de caillettes de dromadaire adultes et non sevrés.

Dans notre travail, nous avons traité dans la première partie, la classification du dromadaire, des généralités sur le lait, les caséines ainsi que les études faites sur les enzymes coagulantes utilisées en fromagerie, particulièrement les enzymes d'origine animale.

La deuxième partie, expérimentale, porte sur les méthodes et les démarches suivies pour l'extraction et la caractérisation des extraits.

La dernière partie est consacrée à la discussion des résultats obtenus.

## I. Synthèse bibliographique

### 1. Classification du dromadaire

Le dromadaire appartient à l'embranchement des vertébrés, classe des mammifères ongulés et sous classe des placentaires. Il appartient à l'ordre des Artiodactyles, sous-ordre des Tylopodes (CORRERA, 2006) et à la famille des camélidés.

La famille des camélidés ne comprend que deux genres : *Camelus* et *Lama*. Le genre *Camelus* au sein duquel existent deux espèces : *Camelus bactrianus*, donné à l'espèce de chameau à deux bosses et *Camelus dromedarius* la deuxième espèce à une seule bosse (FAYE, 2014) qui représente presque 90% de ce genre (WILSON, 1998 cité par KADIM *et al*, 2008).

Il occupe les régions désertiques de l'Ancien Monde (Afrique, Asie et Europe) alors que le genre *Lama* est spécifique des déserts d'altitude du Nouveau Monde où il a donné naissance à quatre espèces distinctes (figure 01).

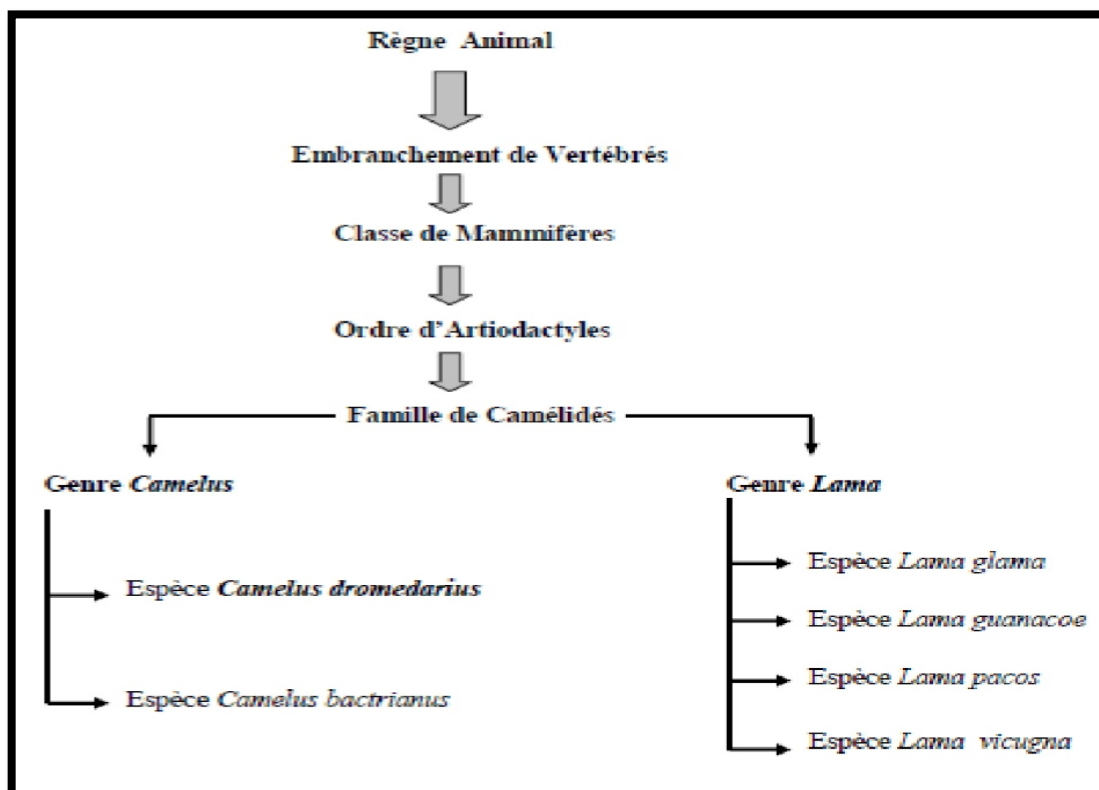


Figure 01 : Systématique des camélidés (Faye, 1997).

## 2. Importances économiques

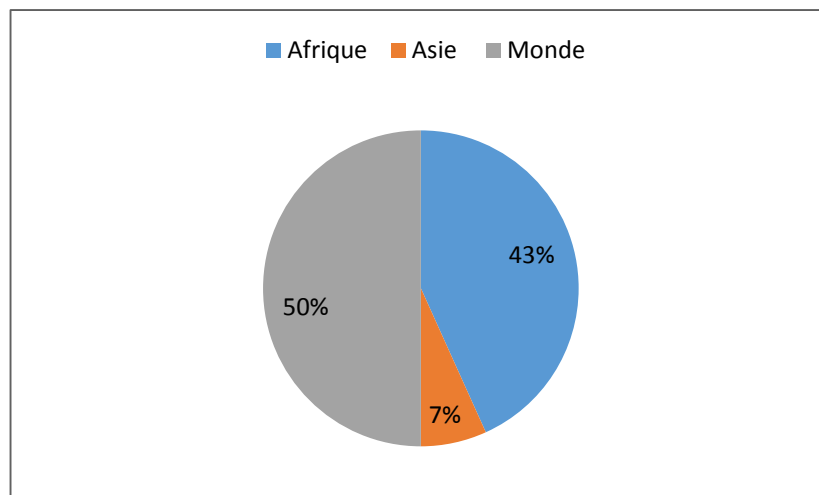
### 2.1. Effectif du cheptel camelin

#### \* Dans le monde

Le dromadaire est d'autant plus performant et d'autant mieux portant qu'il vit dans un climat plus chaud et plus sec. IL ne supporte pas un climat trop froid. Vers le sud, son habitat n'est limité que par la présence de la végétation équatoriale (BECHIR ,1983).

Le dromadaire est répertorié dans 35 pays « originaire » qui s'étendent du Sénégal à l'inde et du Kenya à la Turquie. (CORRERA, 2006).

La population cameline connaît un développement constant de leurs effectifs (figure 02). Elle compte plus de 34 millions de têtes (FAO, 2017).

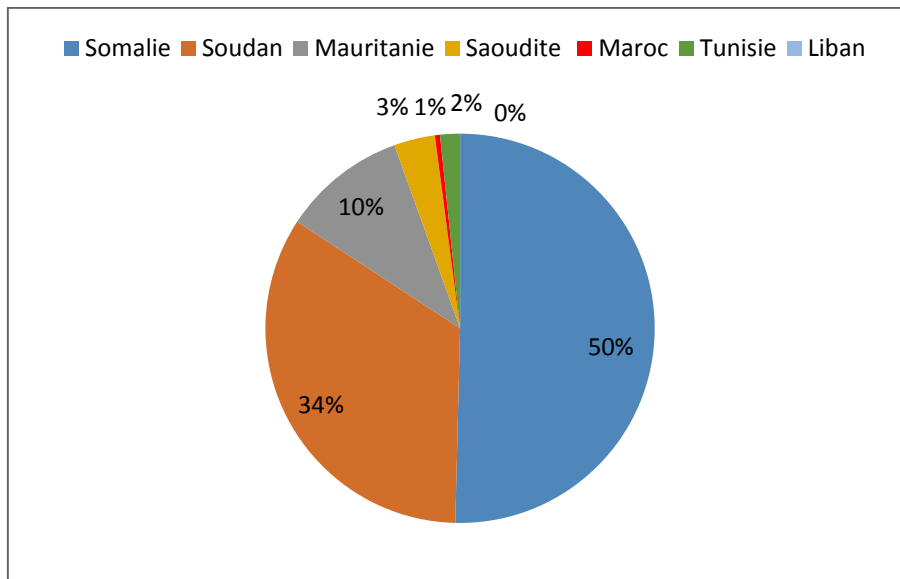


**Figure 02 : L'effectif du cheptel camelin dans le monde (FAO STAT, 2017)**

#### \*Dans le monde arabe

L'effectif camelin du monde Arabe est représenté par le dromadaire (*Camelus dromedarius*). La FAO estime que l'effectif mondial du dromadaire est presque 16 millions têtes dont 61% dans le monde Arabe (figure 03).

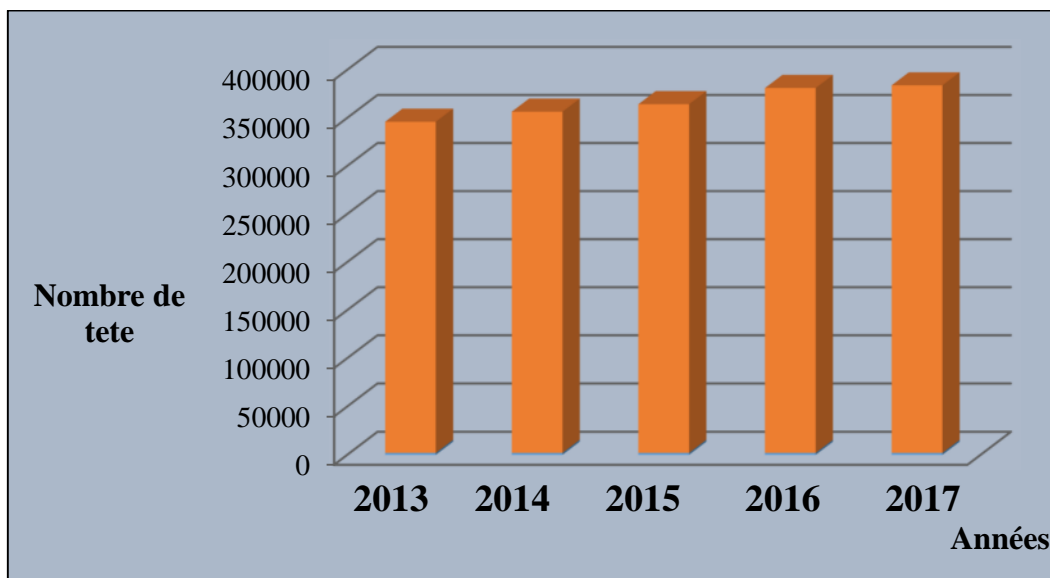
La Somalie, le Soudan, la Mauritanie, l'Arabie Saoudite comptent à eux seuls 97% de l'effectif camelin arabe. Les pays Maghrébins comptent environ 1,920 millions de têtes (CHAÏBOU, 2005) soit 15.28% des effectifs camelin arabes.



**Figure 03 : L'effectif du cheptel camelin dans le monde arabe (FAO STAT, 2017).**

**\*Effectif du dromadaire en Algérie**

Les camelins en Algérie sont réparties sur 17 wilayas, dont 9 sahariennes, et 8 Steppiques. Selon FAO (2017), l'effectif camelin national en 2017 comptait 381882 têtes, soit 17,01% de l'effectif Maghrébin et presque 2% de la population mondiale cameline. L'Algérie occupe, de ce fait, le 14<sup>ème</sup> rang mondial. Durant la décennie (1996-2006), le cheptel camelin national s'est élevé de 136000 têtes en 1996, à 286670 têtes en 2006 (MADR, 2007). Cette évolution est le résultat de l'encouragement de l'élevage camelin par l'Etat. La figure 04 représente l'évolution de l'élevage camelin en Algérie.



**Figure 04: Evolution d'élevage camelin en Algérie (FAO STAT, 2017)**

### **2.1.1. Les populations camelines Algériennes**

Les différentes populations rencontrées en Algérie se retrouvent dans les trois pays d'Afrique du Nord, Il s'agit des populations suivantes (figure 05) :

#### **Le Chaambi**

Très bon pour le transport, moyen pour la selle. Sa répartition va du grand ERG Occidental au grand ERG Oriental. On le retrouve aussi dans le Metlili des Chaambas.

#### **L'Ouled Sidi Cheikh**

C'est un animal de selle. On le trouve dans les hauts plateaux du grand ERG Occidental.

#### **L'Ait Khebbach**

Est un animal de bât. On le trouve dans l'aire Sud-Ouest.

#### **Le Chameau de la Steppe**

Il est utilisé pour le nomadisme rapproché. On le trouve aux limites Sud de la steppe.

#### **Le Targui ou race des Touaregs du Nord :**

Excellent Méhari, un animal de selle par excellence, souvent recherché au Sahara comme reproducteur. Réparti dans le Hoggar et le Sahara Central.

#### **L'Ajjer**

Bon marcheur et porteur. Se trouve dans le Tassili d'Ajjer.

#### **Le Reguibi**

Très bon méhari. Il est réparti dans le Sahara Occidental, le Sud Orannais (Béchar, Tindouf). Son berceau: Oum El Asse1 (Reguibet).

## **2.2. Production laitière**

### **2.2.1. La production mondiale du lait camelin**

L'effectif mondial des dromadaires est estimé à 34 millions de têtes dont les femelles laitières représentent 24% avec une de l'ordre de 5,4 millions de tonnes dont 55% environ est prélevée par les chamelons (figure 06). Les productions individuelles varient entre 1000 et 2700 litres par lactation en Afrique, mais peuvent atteindre 7000 à 12000 litres selon certaines sources en Asie. (FAYE, 2008).



Figure 05 : Répartition géographique des principales races de dromadaires en Algérie (Benaïssa, 2014).

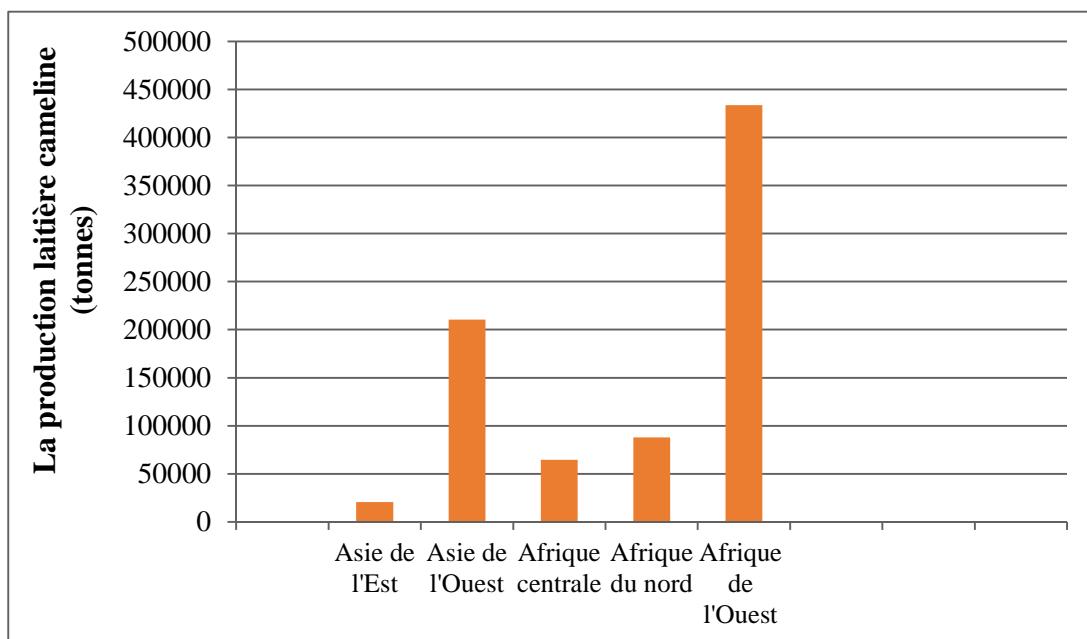
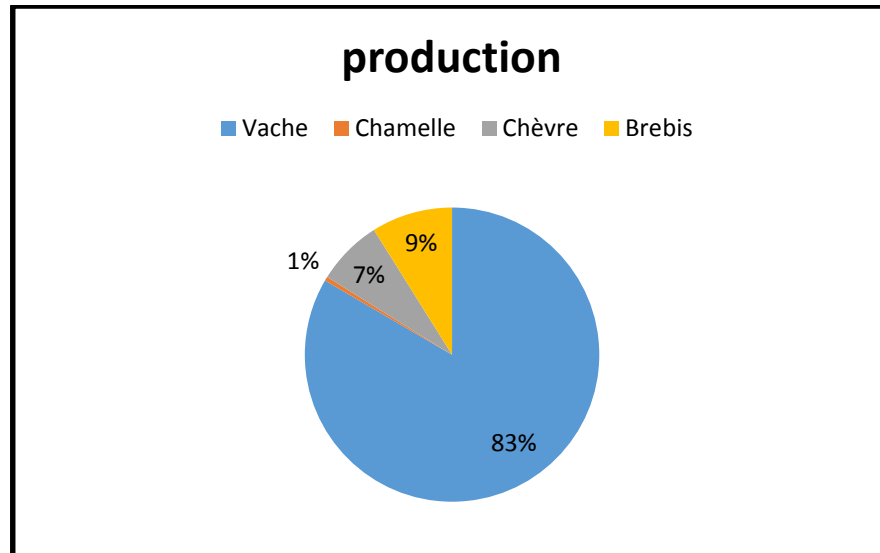


Figure 06 : La part du lait de chamelle dans le monde (FAO STAT, 2017).

### 2.2.2. La production nationale du lait de chamelle

La production laitière cameline algérienne est d'environ 14004 tonnes (figure 07). En effet, la chamelle laitière reste très loin derrière les autres femelles laitières, soit par sa part dans l'effectif national des femelles laitières (88970 têtes), ou dans la production laitière nationale, donc elle reste moins introduite dans la filière du lait, selon (FAO, 2017).



**Figure 07 : La production laitière national de chaque espèce (FAO STAT ; 2017).**

### **3. Anatomie de l'estomac**

Le dromadaire, comme les vrais ruminants, est un poly gastrique, mais il se singularise néanmoins par des différences avec les autres ruminants sur le plan de la conformation et de la structure de l'estomac (EMA *et al*, 1980). Globalement, on peut distinguer 3 réservoirs gastriques (compartiments) : C1, C2 et C3 (figure 08).

La digestion enzymatique est réalisée dans la caillette qui est l'analogue de l'estomac d'un monogastrique comme l'homme (GALLOUIN et FOCANT, 1980).

➤ **Compartiment 1 (Rumen)**

Le rumen possède des sacs aquifères, diverticules contenant des millions de cellules glandulaires qui jouent un rôle important dans l'action de la salive et dans la production d'une partie liquide, caractéristique du contenu stomacal des dromadaires. Par ailleurs, le débouché de l'œsophage, se situe directement sur le rumen chez les camélidés. (FAYE, 1997).

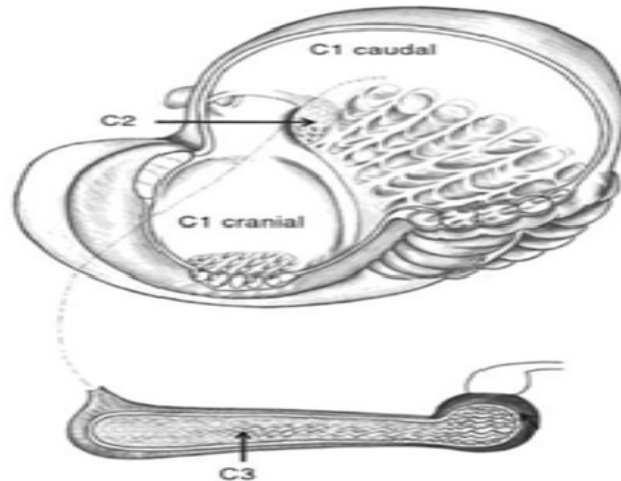
➤ **Compartiment 2 (Réticulum)**

En forme de poire, il possède des papilles disposées en alvéoles d'abeille. Extérieurement, il n'est pratiquement pas possible de distinguer la partie (C2) de la partie (C3). En fait, une différence nette de la muqueuse interne est visible entre la partie proximale (omasum) et la partie distale (abomasum) (CORRERA, 2006).

➤ Compartiment 3 (Caillette)

Elle comprend trois parties :

- Une partie antérieure où la muqueuse présente quelques plis en réseau ;
- une partie moyenne avec des petits plis muqueux longitudinaux et
- enfin une partie postérieure digestive : qui est formée d'une muqueuse épaisse et plissée et de nombreuses glandes digestives (CORRERA, 2006).



**Figure 08 : Anatomie de l'estomac d'un camélidé (ALJASSIM et HOGAN, 2013).**

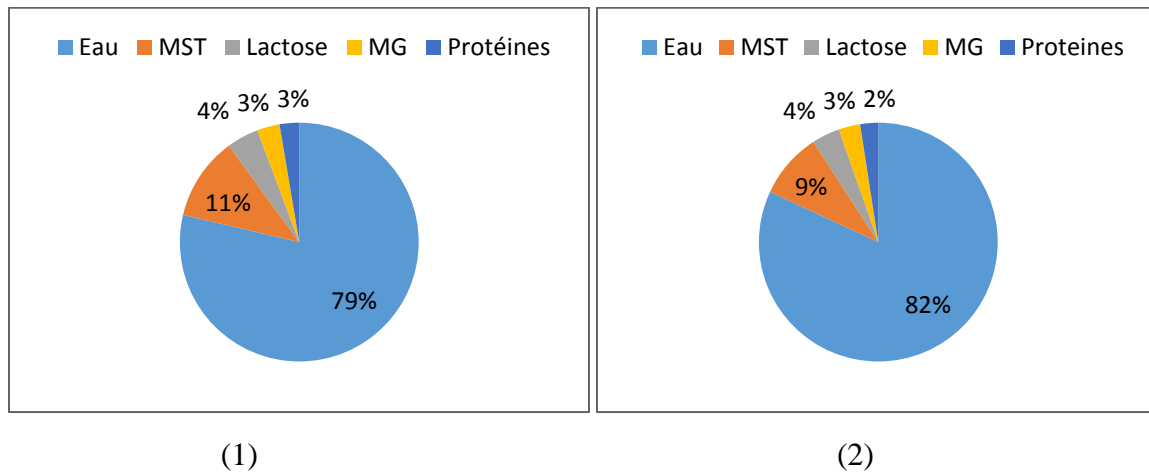
#### **4. La composition du lait de chamelle**

Le lait de chamelle a une composition semblable à celle du lait de vache, mais il est légèrement plus salé. Le lait de chamelle peut être trois fois plus riche en vitamine C que le lait de vache et représente une source vitale de cette vitamine pour les personnes vivant dans les zones arides et semi-arides, qui ne peuvent souvent pas obtenir de vitamine C par la consommation de fruits et de légumes. Le lait de chamelle est également riche en acides gras insaturés et en vitamine B. Le lait du chameau de Bactriane a un pourcentage plus élevé de matières grasses que le lait de dromadaire, mais les niveaux de protéines et de lactose sont similaires. En général, le lait de chamelle est consommé cru ou fermenté. (Dairy Gateway, FAO 2017).

##### **4.1. La composition chimique**

La composition chimique globale du lait de chamelle, même si elle fluctue selon les auteurs, montre néanmoins des teneurs importantes et équilibrées en nutriments de base

(protéines, matière grasse et lactose) avec des proportions similaires à celle présentes dans le lait de vache (figure 09 (1 et 2)).



**Figure 09 : Composition chimique globale (%) du lait de chamelle (2) comparée avec le lait de vache (1) (DESAL *et al*, 1982 ; SAWAYA *et al*, 1984).**

**MST : matière sèche totale. MG : matière grasse.**

#### 4.2. Matière grasse

La matière grasse qui représente une source importante d'énergie, est constituée essentiellement de lipides et de substances lipoidiques. Elle constitue également, un apport important en acides gras essentiels et en vitamines liposolubles (tableau I).

**Tableau I : Composition moyenne en acides gras des laits de chamelle et de vache (ATTIA *et al*, 2000)**

Nature des acides gras	Lait camelin (g/Kg)	Lait bovin (g/Kg)
C4 : 0	0,60	2,60
C8 : 0	0,21	1,12
C12 : 0	1,19	3,98
C16 : 1	11,62	2,30
C18 : 0	16,12	8,65
C18 : 2	1,91	1,92

#### 4.3. Les minéraux

Le lait de dromadaire constitue une bonne source d'apport en minéraux (macro et oligoéléments) (BENGOUMI *et al*, 1994). FARAH (1993), a rapporté que la variation de la composition minérale du lait camelin est influencée par la saison, l'état sanitaire de la

mamelle et le stade de lactation (tableau II). Le lait de chamelle est plus concentré en manganèse et en fer comparé au lait de vache.

**Tableau II : Composition moyenne en principaux minéraux du lait de dromadaire et du lait de vache (g/l)**

	Sodium	Potassium	Calcium	Magnésium	Phosphore	Fer	Références
<b>Lait de chamelle</b>	0,90	2,11	0,87	0,11	1,46	3,41	BENGOUMI <i>et al</i> , (1994)
<b>Lait de vache</b>	0,35-0,6	1,35-1,55	1-1,40	0,1-0,15	0,75-1,10	-	ALAIS (1984)

Légende : (-) : non rapportée

#### 4.4. Les vitamines

Le lait de chamelle se singularise par sa richesse relative en vitamines B3 (niacine) et en vitamine C (Tableau III). Même si des variations importantes (de 25 à 60 mg/l) de la teneur de cette dernière dans les laits camelin sont rapportés (FARAH, 1993), il n'en demeure pas moins que les teneurs signalées sont en moyenne 3 fois plus élevées que celles présentes dans le lait bovin. Cette caractéristique est particulièrement intéressante, car elle permet au lait de cette espèce, par son apport important en cette vitamine, de répondre aux besoins nutritionnels, aussi bien du jeune chamelon que des populations locales, qui vivent dans un environnement où l'apport en ce type de vitamine est particulièrement limité. FARAH (1993) signale que le lait camelin contient des teneurs plus faibles en vitamines A et E et en certaines vitamines du groupe B (vitamine B2, B5 et B9).

**Tableau III : Composition en vitamines (µg/kg) du lait de chamelle avec le lait de vache.**

	Lait de chamelle	Lait de vache
A (Rétinol)	150	170-380
B1 (Thiamine)	600	280-900
B2 (Riboflavine)	800	1200-2000
B3 (Niacine)	4600	500-800
B5 (Acide pantothénique)	880	2600-4900
B6 (Pyridoxine)	520	400-630
B12 (Cobalamine)	2	2-7
B9 (Acide folique)	4	10-100
E (Tocophérol)	530	100-200
C (Acide ascorbique) en mg/kg	24-36	3-23
Références	KAPPELER (1998)	FARAH (1993)

#### **4.5. La fraction azotée**

La fraction azotée du lait de chamelle, comme celle du lait de vache, est répartie en deux sous fractions : l'azote non protéique et l'azote protéique (tableau IV).

**Tableau IV : teneurs comparatives des fractions azotées (mg/100ml) du lait camelin et bovin (MEHAIA et ALKANHAL, 1992).**

Formes d'azotes	Lait de chamelle	Lait de vache
Azote total	485	540
Azote protéique	436	509
Azote non protéique	49	31

##### **4.5.1. L'azote non protéique**

Sa teneur, qui représente 5 à 10%, est environ deux fois plus élevée que celle généralement retrouvée dans le lait de vache. Cette fraction est caractérisée par une haute valeur biologique qui est due à sa richesse en acides aminés libres, en nucléotides et certains précurseurs de vitamines ainsi que des peptides, de l'acide urique, urée et créatine...etc. Dans le lait camelin, les acides aminés libres les plus abondants sont : l'acide glutamique, l'alanine, la phospho-sérine, la glutamine et la phénylalanine (TAHA et KIELWEIN, 1990 ; MEHAIA et ALKANHAL, 1992).

##### **4.5.2. L'azote protéique**

Cette fraction représente 90 à 95 % de l'azote total du lait de chamelle (contre 94 – 95 % pour le lait de référence). Elle contient aussi bien les protéines micellaires (ou caséines, environ 75%) que et les protéines sériques (25%). Comme précisé, cette fraction constitue une partie importante de notre étude, nous ferons dans ce qui suit un point des connaissances relatives à ces macromolécules d'intérêt dans le cas du lait camelin (SIBOUKEUR, 2007).

#### **4.6. Les protéines camelines**

De part leur apport nutritionnel (source d'acides aminés essentiels) et leurs propriétés techno-fonctionnelles particulières, les protéines du lait revêtent une importance considérable au double plan quantitatif et qualitatif. La teneur moyenne en protéines dans le lait de chamelle est comparable à celle du lait bovin (autour de 33g/l). La composition en acides aminés de ces protéines est aussi très similaire à celle rapportée dans le lait de référence (SAWAYA *et al*, 1989 ; MEHAIA et ALKANHAL, 1989).

### 4.6.1. Les caséines

L'appellation caséine regroupe en fait quatre protéines majeures : les caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  ainsi que des composants issus de l'hydrolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine ( $\gamma$  caséines et protéase-peptones). La micelle de caséine est une particule sphérique d'un diamètre de 30 à 300nm (MAHAUT *et al*, 2000). Toutes les micelles n'ont pas les mêmes dimensions mais la même composition. Les grosses micelles ont une charge minérale plus élevés et des proportions relatives de caséine  $\beta$  et  $\kappa$  plus faible que les petites. Elles précipitent à leur pH isoélectrique (4,6) pour le lait bovin et 4,2 et 4,3 respectivement pour le lait caprin et camelin (BRULE *et al*, 1997).

Les caséines ont tendance à s'associer en particules sphériques ou micelles, de taille variable et fortement hydratées et minéralisées. L'assemblage et la cohésion de cette structure micellaire sont assurés par des liens phospho-calciques (HAMBRAEUS, 1982) (figure10). En comparant les caséines bovine et camelines, KAPPELER *et al*, (1998) déduisent que les dernières sont moins phosphorylées et moins riches en phosphate de calcium micellaire.

A la différence des protéines solubles qui ont une structure globulaire compacte et résistante à l'attaque protéolytique, les caséines présentent une structure lâche et peu ordonnée qui les rend accessibles aux enzymes protéolytiques (SCHMIDT, 1982).

La constitution de la micelle de caséine est différente au centre et en périphérie. Les caséines  $\beta$  et  $\alpha_1$  sont plus présentes au centre de la micelle et forment le cœur hydrophobe, tandis que la partie externe de la micelle est formée de caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\kappa$  (AMIOT *et al*, 2002).

Elles représentent 80 % des protéines du lait. Ce sont elles qui constituent le coagulum qui donnera naissance, après égouttage et maturation, au fromage.

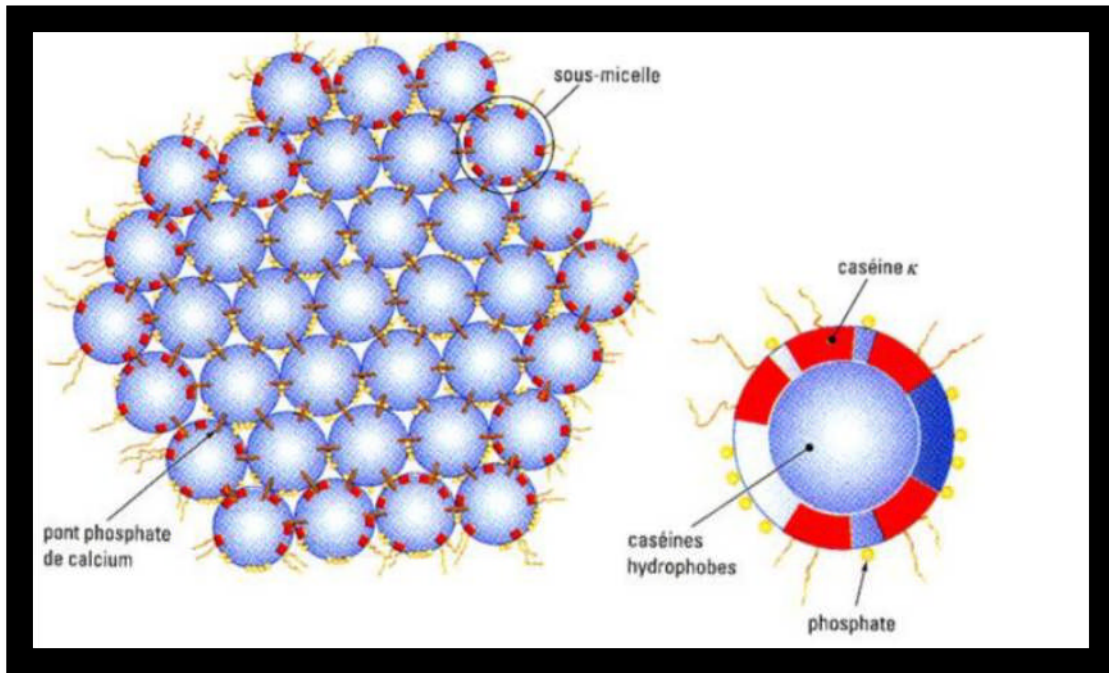


Figure 10: Modèle de micelle de caséine avec sous unités  $\kappa$  (SCHMIDT, 1980).

#### 4.6.1.1. La Caséine $\kappa$

Une grande majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure. Cette caséine est insensible au  $\text{Ca}^{2+}$  et stabilise les autres caséines phosphorylées vis-à-vis de ce cation. La coagulation du lait se fait suite à la protéolyse de cette caséine par la présure, son site de clivage par la chymosine (figure 11) est au niveau de la liaison Phe 105-Met 106 dans le cas du lait bovin et Phe<sup>97</sup>-Ile<sup>98</sup> pour le lait camelin (CHAOUI-KHEROUATOUI et ATTIA, 2008). Elle est la plus hydrophobe des caséines après la caséine  $\beta$ . Toutefois, elle est caractérisée par la présence d'une portion glycomacropéptide du côté C-terminal contenant des résidus glucidiques à caractère très hydrophile, par contre, le reste de la chaîne protéique (para-caséine) est de nature très hydrophobe (tableau V). Cela confère à cette protéine un caractère amphiphile (HILL et WAKE, 1969).

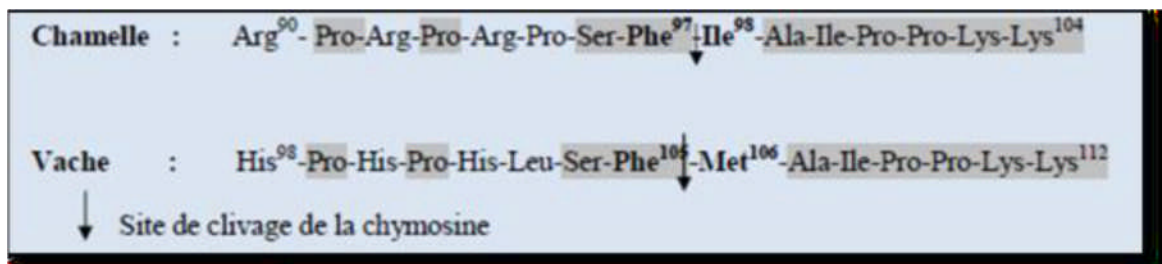


Figure 11 : Comparaison des régions sensibles à la chymosine des caséines- $\kappa$  cameline et bovine (KAPPELER *et al*, 1998).

**Tableau V : Caractéristiques physico-chimiques de la caséine K bovine (EIGEL et al, 1984 ; FARRELL et al, 2004) et de la caséine K cameline (OCHIRKHUYAG et al, 1997 et KAPPELER et al, 1998).**

	Caséine K Bovine	Caséine K Cameline
Masse moléculaire (Da)	19007,0±1,1	18254-22987
Proportion dans les caséines totales	13	3,5-5
Point isoélectrique	3,97	4,11
Nombre d'acides aminés	169	162
Résidus cystéines	2	2
Nombre de groupements phosphoryles/mole	1-2	1
Présence de glucides	+	+

## 5. Les enzymes coagulantes utilisées en technologie

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est l'une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire. Dans le monde, l'enzyme protéolytique la plus utilisée pour permettre cette transformation, notamment en fromagerie (en dehors des fromages frais) est la présure. Elle est extraite de caillettes de jeunes veaux non sevrés et a une composition où prédomine la chymosine (80%) mais contenant aussi de la pepsine (20%). Toutefois et pour plusieurs raisons, particulièrement économiques, où la présure ne peut répondre à la demande sans cesse croissante dans le monde, l'utilisation de succédanés d'origine animale, végétale et microbienne s'est développée.

### 5.1. Enzymes d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale sont réparties en groupes basés sur le mécanisme catalytique utilisé pendant le processus hydrolytique. Les principaux types catalytiques sont aspartate, sérine, cystéine et métalloprotéases (BAH *et al*, 2006). Les protéases végétales coagulantes appartiennent aux trois premiers groupes (BRUNO *et al*, 2006).

Dans certains pays d'Afrique comme le Nigéria et la République du Bénin, les extraits de *Calotropis procera* (pomme de Sodome) sont utilisés dans la fabrication de fromage Peulh (ROSEIRO *et al*, 2003). Dans les régions chaudes plusieurs plantes renferment des principes coagulants telle que la ficine provenant de latex du figuier, la papaïne issu de papayer et la bromélaïne issu du l'ananas (ECK et GILLIS, 1997).

### 5.2. Enzymes d'origine microbienne

L'industrie de fermentation s'est intéressée à la production de protéases susceptibles de remplacer efficacement et à moindre coût la présure, à partir de la culture de microorganismes. Dans ce but, de multiples espèces de bactéries et de champignons inférieurs ont été étudiées afin de pallier à la pénurie mondiale en présure. De plus et à l'inverse des protéases gastriques qui sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, les protéases microbiennes sont produites sous une forme active (DALGLEISH, 1997). Ainsi, plusieurs bactéries ont été testées dans ce but, entre autre : *Streptococcus liquifaciens*, *Micrococcus caseolyticus*, *Bacillus subtilis* ...etc. Ces protéases, malgré un rendement intéressant, n'ont pas toujours donné des résultats concluants au vu de la non spécificité de l'hydrolyse et la protéolyse excessive enregistrée qui ont pour conséquence une modification des caractéristiques organoleptiques des fromages (apparition d'amertume, gout acide ...etc), (ERNSTROM, 1983).

Les travaux réalisés sur différents types de levures et moisissures, ont permis de sélectionner trois types de moisissures dont les propriétés coagulantes et protéolytiques de leurs enzymes se rapprochent le plus de celles de la présure. Ces moisissures sont : *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* et *Mucor pusillus* (GOURSAUD, 1999 ; TUBESHA et AL-DELAIMY, 2003 ; NOUANI, 2011). Les enzymes produites à partir de ces micro-organismes ont donné de grandes similarités dans le mécanisme de la coagulation du lait, comparativement à l'action de la présure traditionnelle.

### 5.3. Les enzymes coagulantes d'origine animale

Les enzymes coagulants d'origine animale sont des protéases gastriques. Ils appartiennent à la catégorie des endo-peptidases actives à pH acide appelées protéases à aspartate ou encore protéases acide (PELMONT, 1993). Les plus employés sont la présure, constituée principalement de chymosine (E.C,3.4.23.4) et de pepsines (E.C,3.4.23.1), d'origine bovine ou porcine. Ces protéases sont formées à partir d'un précurseur (zymogène), forme inactive, secrété par la muqueuse gastrique (RICHTER *et al*, 1998).

#### 5.3.1. La présure

La dénomination de présure est réservée à l'extrait coagulant provenant de la caillette du veau nourris exclusivement au lait (avant sevrage) (ECK et GILLIS, 1997). Elle contient deux fractions actives, l'une majeure, constituée par la chymosine, l'autre mineure, par la

pepsine avec un rapport de masse chymosine/pepsine  $\geq 1,38$ . Au pH du lait (6,2-6,6), la chymosine représente plus de 80% de l'activité coagulante (ANDREN, 2002).

### 5.3.2. Chymosine

C'est une protéase (E.C.3.4.23.4) capable d'hydrolyser les protéines et plus spécifiquement la caséine. Elle est employée pour la coagulation du lait, étape nécessaire à la fabrication des fromages. Depuis plusieurs années, des techniques d'ingénierie génétique permettent de produire de la chymosine (dite recombinante) à partir de microorganismes (*Aspergillus niger* par exemple).

Dans la caquette. Elle est sécrétée sous forme de prochymosine qui vient elle-même d'un précurseur, la pré-prochymosine, contenant en plus une séquence signal de 16 aa. L'activation du zymogène se fait après départ des 49aa N-terminaux par la coupure autocatalytique à pH acide ou sous l'effet de la pepsine stomacale (PELMONT, 1993). C'est une holoprotéine (tableau VI) de PM=40KDa comportant 323aa (POLAINA et MAC-CABE, 2007).

Au cours de la fabrication du fromage, la chymosine assure un double rôle. D'une part, elle se caractérise par une activité coagulante élevée en provoquant l'hydrolyse spécifique de la K- caséine au niveau du lien Phe105- Met 106, et d'autre part, elle possède une faible activité protéolytique générale sur les différentes fractions de caséine (SIDIKOU *et al*, 2012). De ce fait, cette enzyme conduit à un développement optimal de la saveur dans le fromage mature et la formation d'un caillé fort, aboutissant à un rendement élevé en fromage (ESKANDARI *et al*, 2012).

**Tableau VI : Caractéristiques physico-chimiques de la chymosine bovine et la chymosine cameline.**

Coagulant	Espèces	MM (KDa)	Nombre d'isoformes	pH optimum	Température optimale °C	pHi	Références
<b>Chymosine</b>	Bovin	36	3	5,5-6	20-50	4,5-5	BAUDYS <i>et al</i> , 1988 ; FOLTMAN, 1993.
	Camelin	39-52	-	5,8-6	50	-	ELAGAMY <i>et al</i> , 2000.

Légende : (-) : non rapportée.

### 5.3.3. Pepsine

La pepsine, du grec « pepsis » signifiant digestion, est le membre le mieux connu de la classe des protéases à aspartate et l'une des premières enzymes à y être découverte et purifiée dans sa forme cristalline. Cette enzyme a pour code EC, 3.4.23.1 (Tang *et al*, 1973).

La pepsine (tableau VII) est sécrétée en proportion plus importante après sevrage dans l'estomac des mammifères, est produite par les cellules de la muqueuse gastrique sous forme de pepsinogène inactif de PM= 42000 et comporte 371 aa (POLAINA et MAC-CABE, 2007), Elle peut s'activer de façon auto-catalytique en pepsine par perte de 44 aa du côté N-Terminal (PELMONT, 1993).

A l'opposé de la chymosine, la pepsine possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante (ABDELLAOUI, 2007).

**Tableau VII : caractéristiques physico-chimiques de la pepsine bovine et cameline.**

coagulant	espèces	MM (kDa)	Nombre d'isoformes	pH optimum	Température optimale °C	pHi	Références
<b>Pepsine</b>	Bovin	3 <sup>3</sup>	4	2,2	40	3	MARTIN, 1984 ; RAMPILLI <i>et al</i> , 2005.
	camelin	35,5	2	1,8	-	-	ABOUHAEFEEL et ABUEREISH, 1984 ; AL-MAZAIEN, 2007.

Légende : (-) : non rapportée.

## **6. Etude de la structure des enzymes coagulantes d'origine animale**

### **6.1. Structure primaire**

Les structures primaires de la chymosine et de la pepsine ont une identité de séquence de l'ordre de 50% (JENSEN *et al*, 2013). Par ailleurs, ces deux enzymes se caractérisent par une teneur élevée en acides aminés acides et  $\beta$ -hydroxylés et par la présence d'un petit nombre de résidus basiques (KAGAYAMA, 2002).

Ces protéines contiennent trois ponts disulfures : Cys45-Cys50, Cys206-Cys210 et Cys250-Cys283 (pepsine numérotation) (TANG *et al*, 1973 ; GILLILAND *et al*, 1990 ; NEWMAN *et al*, 1991). CHEN *et al* (2000) ont démontré que le pont Cys250-Cys283 est indispensable pour le repliement correct de la prochymosine, alors que le pont Cys45-Cys50 est dispensable mais a une certaine contribution à la stabilité et la spécificité de l'enzyme. Le pont Cys206-Cys210 est aussi dispensable mais joue un rôle plus important dans le repliement correct de l'enzyme.

Certaines de ces protéines gastriques sécrétées peuvent subir une glycosylation qui entraîne une augmentation de leur solubilité et empêche leur agrégation dans la voie de sécrétion. De plus, elle stabilise leur conformation et augmente leur thermo-stabilité (MACHALINSKI *et al*, 2006). D'après KAPPELER *et al* (2006), la chymosine de dromadaire glycosylée a une thermo-stabilité plus élevée que la chymosine de veau non glycosylée. Cette thermo-stabilité peut être un inconvénient pour son utilisation dans la production de fromages industriels.

### **6.2. Structure secondaire et tertiaire**

La cristallographie aux rayons X a révélé que la pepsine (figure 12) et la chymosine sont constituées principalement par une structure secondaire en feuillet  $\beta$  avec très peu d'hélices  $\alpha$  (JAMES et SIELECKI, 1986 ; CHITPINITYOL et CRABBE, 1998). En fait, la chymosine comprend 13% d'hélices  $\alpha$  (9 hélices, 44 résidus) et 48% de feuillet  $\beta$  (29 feuillets, 158 résidus) (NEWMAN *et al*, 1991).

Comme toutes les protéases aspartiques, elles possèdent ainsi une forme bilobée avec un domaine N-terminal et un domaine C-terminal ayant seulement 9% de séquence en acides aminés identiques (NEWMAN *et al*, 1991) et séparés par une fente perpendiculaire capable d'accueillir de sept à huit résidus d'acides aminés d'un substrat (TANG *et al*, 1978). Cette

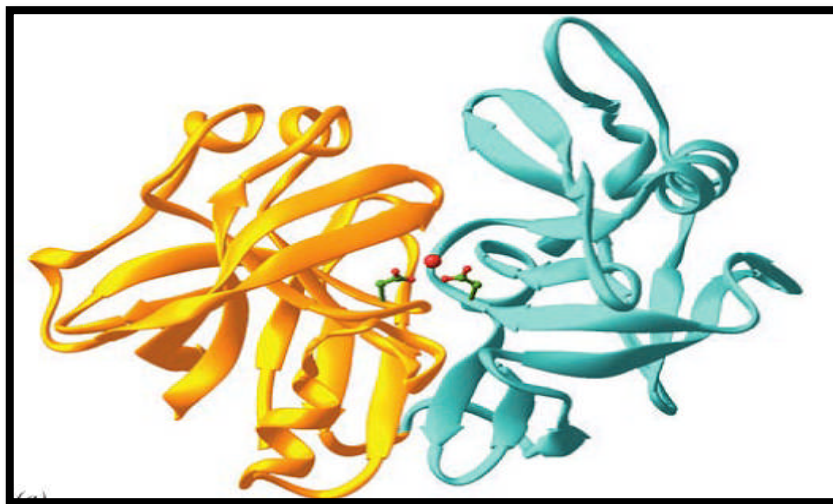
fente constitue un site de liaison du substrat et contient les deux résidus aspartyls impliqués dans le mécanisme catalytique (GILLILAND *et al*, 1990).

JENSEN *et al* (2013) ont travaillé sur la structure cristalline d'un variant doublement glycosylé de la chymosine cameline recombinante ainsi que sur la structure cristalline de la chymosine bovine recombinante non glycosylée (Figure 14). Ils ont montré que les deux chymosines adoptent un repliement spatial similaire à l'exception des feuillets  $\beta$  antiparallèles centraux qui connectent les domaines N et C terminaux. Cette différence a conduit à une augmentation de la flexibilité dans les mouvements des domaines de la chymosine cameline recombinante. Cette dernière se caractérise par une grande malléabilité dans la capacité d'interaction avec le substrat et présente en sa surface des charges supplémentaires qui lui permettent d'améliorer cette interaction.

### **6.3. Site actif et mécanisme catalytique**

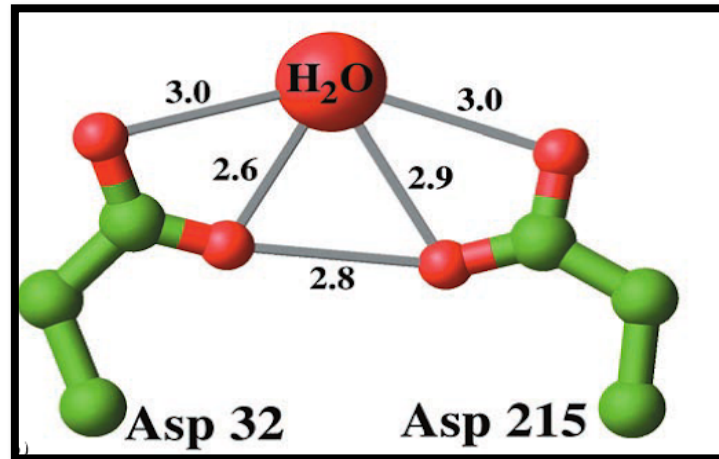
#### **6.3.1. Site actif**

Les protéines aspartiques, également connues sous le nom de protéases acides, sont une famille d'enzymes dont l'activité catalytique dépend de deux résidus d'acides aspartiques présents au niveau du site actif (NAGASAWA *et al*, 2016 ; BOTHAM *et al*, 2017). Ce dernier se situe entre les deux domaines N Terminal et C Terminal et la protéine et est assez large pour héberger un segment polypeptidique d'au moins 7 résidus (KAGEYAMA, 2002).

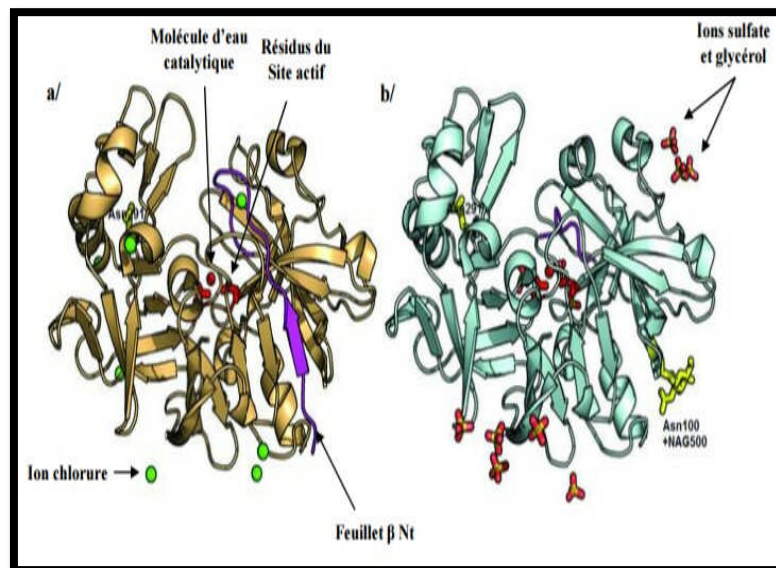


**Figure 12 : Structure par rayon X de la pepsine porcine, diagramme en ruban (VOET D. et VOET J.G., 2016).**

Les deux Asp32 (Asp32 : Asp -32- Thr/ Ser-33-Gly-34 dans le domaine C-terminal et Asp 215 : Asp-215-Thr /Ser -216-Gly-217 (figure 13) dans le domaine N-terminal selon la numérotation de la pepsine) forment le site catalytique (PEARL et BLUNDELL, 1984 ; BERRYA *et al*, 1999 ; KAGEYAMA, 2002).



**Figure 13 : Structure par rayon X de la pepsine porcine. Vue agrandie des résidus Asp du site actif avec la molécule d'eau qui leur est lié (VOET D et VOET J.G, 2016).**



**Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine recombinante (a) et cameline recombinante (b) (JENSEN *et al*, 2013). NAG : N acétyl glucosamine**

### 6.3.2. Mécanisme d'action

Le mécanisme catalytique des protéases aspartiques se produit par l'intermédiaire d'une molécule d'eau activée, cette dernière constitue l'agent nucléophile permettant d'attaquer la liaison peptidique. Les résidus impliqués dans la catalyse sont les deux résidus acides (aspartates) (DUNN, 2002), mais les détails exacts du mécanisme restent controversés.

Selon VEERAPANDIAN *et al* (1992) et JAMES *et al* (1992), il s'agit d'un mécanisme général d'acide-base. L'un des résidus d'acide aspartique, agissant comme une base (Asp 215), doit être chargé, alors que l'autre, agissant comme un acide (Asp 32), doit être protoné (SUGUNA *et al*, 1987 ; DAVIES, 1990 ; JAMES *et al*, 1992 ; PARRIS *et al*, 1992). Par conséquent, le premier rôle important des résidus adjacents au centre catalytique est de préserver l'état chargé de l'Asp215 et l'état protoné de l'Asp32 (ANDREEVA et RUMSH, 2001).

## 7. La coagulation du lait

### 7.1. Définition

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

### 7.2. Types de coagulation

#### 7.2.1. Coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ( $pH_i = 4,6$ ) soit :

- par acidification biologique à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains) (MAHAUT *et al*, 2005) et ;
- par acidification chimique (injection de  $CO_2$  addition de gluconodelta lactone) (MAHAUT *et al*, 2000).

Le gel formé présente une perméabilité satisfaisante, mais une friabilité élevée avec une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau (figure 15). Les liaisons sont de faibles énergies de type hydrophobe et résistent peu aux traitements mécaniques (MAHAUT *et al*, 2005).

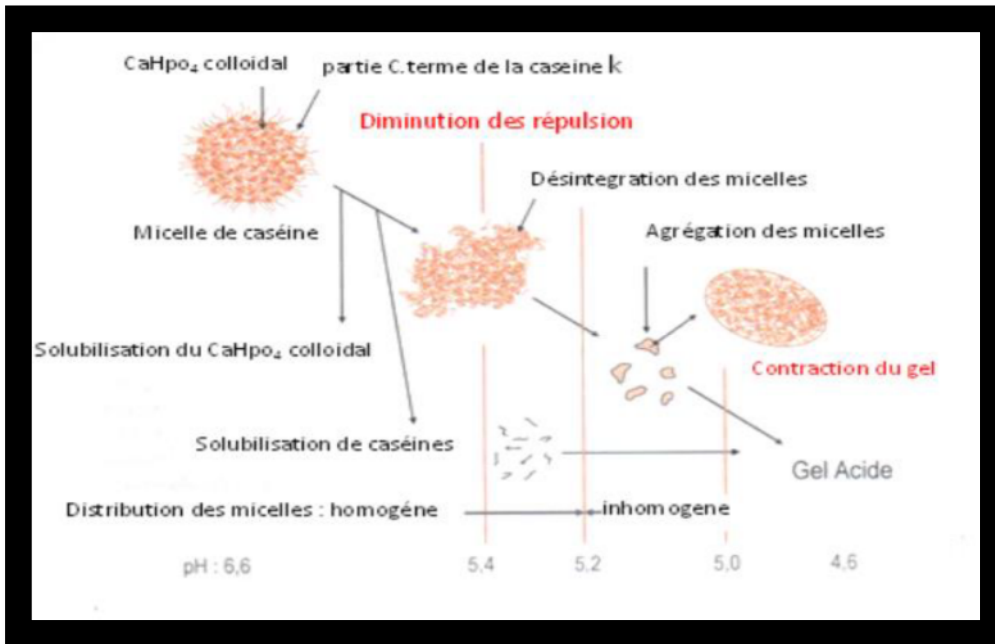


Figure 15 : Modification de la structure micellaire au cours de l'acidification (JEANTET, 2007).

### 7.2.2. Coagulation enzymatique

Il s'agit de l'action de la présure (plus précisément de la chymosine) qui va hydrolyser préférentiellement la caséine  $\kappa$  en un site préférentiel de coupure (figure 16).

La coagulation de type présure a généralement lieu pour des pH compris entre 6.2 et 6.7 : Ph pour lesquels la déminéralisation de la micelle est nulle ou faible. Dans ces conditions, la structure de la micelle est stabilisée. (LENOIR *et al*, 1985).

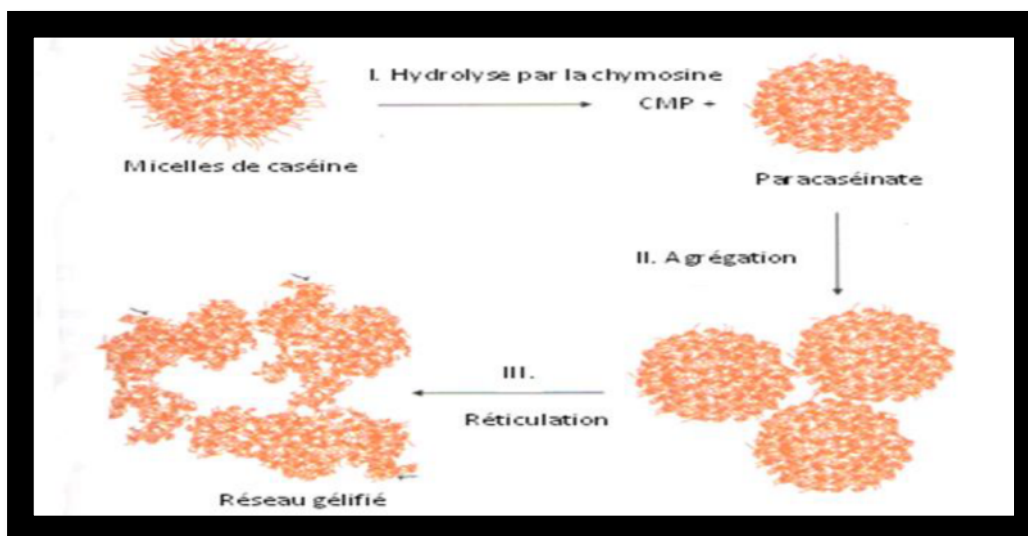


Figure 16 : Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation présure (JEANTET, 2007).

### **7.3. Aptitude du lait de chamelle à la coagulation**

Le lait de chamelle est réputé pour son inaptitude à la coagulation (MAHBOUB *et al*, 2010). Quelque soit la méthode utilisée, acide ou enzymatique, le coagulum formé ne représente pas les qualités requises pour subir d'autres traitements technologiques (FARAH, 1993).

Les techniques effectuées, en utilisant la présure, pour tester l'aptitude du lait de chamelle à la coagulation n'ont pas été concluantes (BOUDJENAH-H *et al*, 2012), il en résulte la formation d'un coagulum moins ferme et un rendement plus faible (BORNAZ *et al*, 2009). Cette difficulté de coagulation est due aux propriétés structurales et fonctionnelles uniques des composants du lait. Notamment, la faible teneur en Kappa caséine présente (5% contre 13,5% pour le lait de vache) et la plus grande taille des micelles du lait de chamelle qui est environ le double (380µm) de celle du lait de vache (150µm) ainsi que sa résistance aux micro-organismes (BORNAZ *et al*, 2009).

Afin de remédier à l'aptitude limitée du lait de chamelle à la coagulation, différentes adaptations technologiques ont été proposées. Dans ce cadre, les travaux menés par différents auteurs : RAMET (1994) sur la pepsine bovine, SIBOUKEUR *et al* (2005), BOUDJENAH-H *et al* (2011) et BOUDJENAH-H *et al* (2012) sur les extraits issus de caillettes de dromadaires adulte. Les corrections recommandées par ces auteurs reposent généralement sur l'amélioration de la teneur en matière sèche et l'équilibre salin du lait de chamelle.

### **8. La production fromagère par la chymosine cameline recombinante**

Le lait de chamelle n'est pas sensible à la coagulation avec la chymosine bovine, probablement en raison de fortes variations entre les structures primaires de *k*-caséine des deux espèces. La production de fromage à partir de lait de chameau serait souhaitable d'améliorer la sécurité alimentaire en Afrique de l'Est. Actuellement, la production de fromage à partir de lait de chamelle nécessite l'utilisation de préparations de présure contenant une plus grande quantité de pepsine ou de coagulants microbiens. Cela donne un fromage avec une altération du goût non acceptée par les consommateurs locaux.

Les préparations animales dérivées de chymosine de chameau ne sont pas réalisables puisque les chameaux sont rarement abattus en bas âge. Donc, ils ont décidé de produire l'enzyme par fermentation d'un gène génétique des souches modifiées : que *Escherichia coli* K-12 (EMTAGE *et al*, 1983 ; MOHANTY *et al*, 1999), *Kluyveromyces marxianus var. lactis*

(VAN DEN BERG *et al*, 1990), *Saccharomyces cerevisiae* (MELLOR *et al*, 1983 ; GOFF *et al*, 1984), *Aspergillus Niger var. awamori* (CULLEN *et al*, 1987 ; TSUCHIYA *et al*, 1993) et *Pichia (Komagataella) pastoris* (NOSEDA *et al*, 2013).

Ce système d'expression a été choisi car il produit de manière fiable des niveaux élevés de Protéine sécrétée, correctement repliée et bien caractérisée pour la production de chymosine bovine.

### 8.1. La chymosine produite par génie génétique (FPC)

Grâce aux progrès de la technologie de l'ADN recombinant, le gène chymosine de veau a été cloné dans des micro-organismes, permettant la production de chymosine par fermentation. Ces chymosines sont maintenant largement utilisées pour la fabrication du fromage dans de nombreux pays et donnent d'excellents résultats (Fox et McSweeney, 1997).

La séquence nucléotidique de la prochymosine de 1095 pb était clonée dans le vecteur pGAMpR en remplaçant le gène correspondant à la séquence bovine. L'expression est contrôlée par le promoteur glaA inducible par l'amidon de *A. niger*, La chymosine est produite dans l'*Aspergillus niger var awamori* par la fusion du gène de la prochymosine B avec celui de la glucoamylase A (figure 17). Le vecteur utilise le gène pyr4 de *Neurospora crassa* en tant que marqueur de sélection. La souche choisie pour la transformation était un dérivé pyrG d'une souche industrielle, qui avait été utilisé auparavant pour la surproduction de FPC. Environ 50 transformants ont été aléatoirement choisis et analysé pour la production de chymosine.

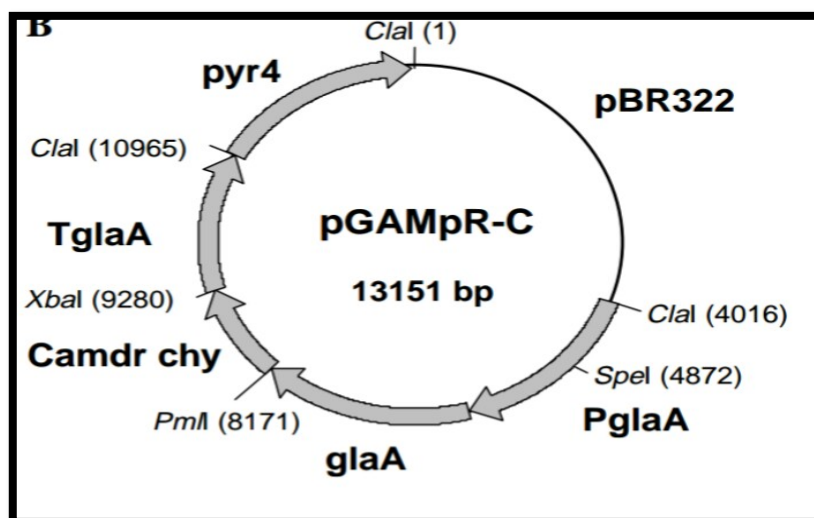


Figure 17 : Plasmide d'expression pGAMpR-C d'A. Niger (KAPPELER *et al*, 2006).

\* glaA, PglA et TglA : Glucoamylase A d'A. Niger et les régions promotrices et terminatrices correspondantes.

\*Camdr chy : séquence codant pour la prochymosine de *C. dromedarius*.

\*pyr4 : gène codant pour l'orotidine-50-phosphate décarboxylase de *N. crassa*.

La chymosine cameline recombinante (CCR) comporte 323 aa pour une MM de 40 kDa. (KAPPELER *et al*, 2006) ou 43 kDa (ATTALLAH, 2007) avec un pHi de 4,85; l'acide aminé N terminal étant la glycine (KAPPELER *et al*, 2006). Elle a des caractéristiques différentes de celles des bovins, elle a en particulier une stabilité thermique accrue entre 40 et 55°C (KAPPELER *et al*, 2006 ; JENSEN *et al*, 2013).

La chymosine cameline recombinante CCR est la seule présure connue à ce jour, qui combine un rapport C / P considérablement supérieur avec une valeur d'activité spécifique plus élevée et une stabilité de température plus élevée par rapport à la chymosine bovine recombinante (tableau VIII).

**Tableau VIII : la comparaison de la ration C/P des différents types de la chymosine avec une concentration en calcium supérieure à 2 mM et une température supérieure à 50°C (Kappeler et al, 2006).**

Type de chymosine	Activité coagulante	Activité protéolytique	La ration C/P
CCR	170	25	7
Chymosine porcine	25	12	2,1
Chymosine bovine	100	100	1

Kappeler *et al*, (2006) ont exprimé le gène de la chymosine cameline (*Camelus dromedarius*) chez *Aspergillus niger* donnant une chymosine cameline produite par fermentation. Les propriétés de la CCR ont été comparées à celles de la chymosine de veau; La chymosine de chameau a une activité de coagulation supérieure de 70% de chymosine de veau, mais seulement 20% de sa teneur générale, l'activité coagulante et a donc un rapport de 7 fois plus élevé que l'activité protéolytique (tableau IX). Par contre, la chymosine bovine recombinante CBR manifeste avec une faible activité coagulante envers le lait camelin. Dès lors, l'utilisation de la CCR pour les besoins de la coagulation du lait de vache a été rapidement perçue comme une solution appropriée au lieu et place de la CBR avec des avantages certains (rendements plus élevés, goût moins amer en raison de la baisse de l'activité protéolytique....).

**Tableau IX : La comparaison de l'activité coagulante du lait cru bovin et camelin par différentes chymosines recombinante (KAPPELER *et al* (2006).**

Enzymes	Type de lait (cru)	Activité coagulante (UP)
CBR	Bovin	12.3 ± 1.1
CCR	Bovin	12.2 ± 1.0
CBR	Camelin	59.5
CCR	Camelin	12.7 ± 0.9

VALLEJO *et al* (2012) ont réalisé une étude comparative de quatre chymosines recombinantes différentes (la chymosine de chèvre et du buffle sont exprimées dans *Pichia pastoris* et la chymosine bovine et de dromadaire sont exprimés dans *Aspergillus niger*). Ils ont trouvé que la chymosine recombinante de chèvre possède la meilleure efficacité catalytique par rapport aux trois autres enzymes. Ils ont conclue que la chymosine recombinante de chèvre représente une très bonne alternative à la CBR pour une utilisation dans la fabrication du fromage. Le tableau X résume les principales caractéristiques physico-chimiques de la chymosine fermentaire.

**Tableau X : caractéristiques physico-chimiques de la chymosine fermentaire.**

Espèces de la chymosine fermentaire	MM (KDa)	pHi	pH optimum	Température Optimale °C	Références
Bovin	36 et 40	4,8	4,5	37	VALLEJO <i>et al</i> , 2008
Camelin	40	5,5	5,8	40	KAPPELER <i>et al</i> , 2006
Caprin	46 et 49	-	-	-	VEGAHERLANDEZ <i>et al</i> , 2004
Ovin	40	4,8	6,6-6 ;8	40	ROGELJ <i>et al</i> , 2001

## 8.2. La production fromagère

L'étape clé de la réussite d'un fromage quel que soit son type est la coagulation. Elle consiste à la formation d'un gel suite à des modifications physico-chimique intervenant sur les micelles de caséines du lait. L'agent coagulant le plus anciennement utilisé en fromagerie est la présure. Cette enzyme est extraite à partir de la caillette de veau non sevré.

L'augmentation de la production et de la consommation du fromage d'une part, et l'impossibilité d'augmenter, en parallèle, la production de présure d'autre part, ont causé une pénurie mondiale en approvisionnement en cet agent coagulant ce qui a engendré des fluctuations très importantes dans son prix.

## Synthèse bibliographique

Des essais de fabrication de fromage type cheddar (BANSAL *et al*, 2009, GOVINDASAMY-LUCEY *et al*, 2010), pâte molle (ABDULSALAM et SHAKER, 2013) et Mozzarella (MOYNIHAN *et al*, 2014) avec la CCR et la CBR ont été réalisés (tableau XI). Les résultats obtenus montrent :

- qu'aucune différence significative n'a été observée dans la composition et le pH entre les fromages fabriqués avec ces deux enzymes ;
- que la protéolyse est significativement plus faible dans les fromages fabriqués avec la CCR qu'avec la CBR et ;
- que les fromages élaborés avec la CCR présentaient moins d'amertume avec une qualité microbiologique et sensorielle acceptable que la CBR.

**Tableau XI : la composition et le rendement du fromage Cheddar (stocké 60jour) fabriqué par la CCR et (0,04 IMCU/ 1 ml du lait) et CBR (0,06 IMCU / 1ml du lait) (BANSAL *et al*, 2009).**

Paramètres	CCR	CBR
pH	5.15 - 0.04	5.20 - 0.03
Humidité (%)	37.82 - 0.49	37.31 - 0.67
Graisse (%)	33.33 - 0.95	33.58 - 0.58
Protéine (%)	25.74 - 1.18	25.69 - 0.48
Sel(%)	1.26 - 0.01	1.24 - 0.05
Rendement (kg fromage 100 kg_ du lait)	9.76 - 0.18	9.83 - 0.26

### 8.3. Les étapes de fabrication du fromage

A l'origine, il y a le lait, base essentielle d'un bon fromage. Mais le chemin à parcourir est encore long avant d'arriver à votre table ! Connaître les procédés de fabrication du fromage permet non seulement d'apprécier l'ampleur du travail des fromagers, mais aussi de mieux comprendre ce qui rend chacun des fromages unique (anonyme 03). Pour obtenir un fromage, y'a plusieurs étapes à suivre :

#### 8.3.1. Caillage

Pendant cette étape, correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine du lait, ce dernier coagule et se transforme en un gel homogène et lisse : le caillé. Cette coagulation du lait se fait sous l'action d'un ferment (mélange de bactéries lactiques), de présure (coagulant naturel de source animale ou végétale) ou d'une combinaison des deux. Le caillé est ensuite tranché, rompu et fragmenté. Plus les fragments sont gros, plus ils contiennent d'eau. À l'inverse, plus ils sont petits, plus leur taux d'humidité est faible et plus

la pâte est ferme. Les grains ainsi obtenus sont par la suite transférés dans des moules pour favoriser l'égouttage.

Le traitement thermique du lait, qui peut être pratiqué avant coagulation pour améliorer la qualité microbienne du milieu, influence également les propriétés rhéologiques des gels formés (RAMET, 1987).

### **8.3.2. Égouttage**

Durant cette phase, c'est presque 80% de l'eau contenue dans le caillé qui est extraits. Lors de l'égouttage, deux types de facteurs interviennent:

- ✓ un facteur biologique : acidification ou « fermentation lactique », génératrice de porosité dans le caillé et ;
- ✓ un facteur mécanique : qui se déroule en plusieurs phases : le découpage, le brassage, le chauffage et enfin le pressage.

Cette étape est essentielle car c'est la conjugaison de ces facteurs qui va déterminer la dureté et l'onctuosité du fromage à venir.

Pour obtenir un fromage frais au goût acidulé, on favorise la fermentation lactique. Le lait est maintenu pendant quelques heures (de 12h à 48h) à une température avoisinant les 15°C. Pendant ce laps de temps, les ferments se développent et produisent de l'acidité (le lactose devient de l'acide lactique). L'acide lactique déminéralise alors le caillé en lui enlevant une grande partie de son calcium, et donc, de sa souplesse. On obtient alors un caillé « lactique », d'une grande porosité qui s'égoutte lentement et spontanément.

A l'opposé, pour obtenir des pâtes dures, on va fabriquer plus rapidement et à plus haute température (30° à 40°C). L'égouttage se fait ici de manière mécanique. On découpe alors le caillé afin d'accélérer l'écoulement du lactosérum « le petit lait », on brasse et on chauffe. Le caillé se contracte alors sous le double effet du remous et de la chaleur. Quand il est suffisamment égoutté, il est mis en moule. Intervient alors la phase de pressage, plus ou moins forte selon le degré souhaité de dureté de la pâte.

Les rendements fromagers sont faibles comparativement à ceux observés habituellement avec du lait de vache ou de chèvre (RAMET, 1985). Le faible niveau des rendements s'explique par la moindre teneur en matière sèche des laits de dromadaire utilisés, mais également par l'importance des pertes en matière sèche dans le lactosérum.

### **8.3.3. Affinage**

À la suite du démoulage, le fromage est placé en phase de maturation, dans une cave naturelle ou artificielle. Les conditions régnant dans la cave, dont le degré d'humidité et la température ambiante variant entre 8 °C et 16 °C, sont déterminantes pour la qualité du produit fini. C'est lors de cette étape que se développent et s'uniformisent la texture, la croûte, la couleur et le goût d'un fromage.

Dans le cas des fromages à croûte lavée, l'affineur (le responsable de l'affinage) traite la surface des meules en les lavant avec une saumure (eau salée). En ce qui concerne les autres fromages, l'affineur veille au développement régulier de leur surface et au besoin, retourne les meules.

### **8.3.4. Salage**

Le sel agit à titre d'agent de conservation et d'antiseptique. Il peut être ajouté au fromage lors du brossage avec une saumure (eau salée) ou encore à la toute fin du procédé de fabrication. Selon le type de fromage fabriqué, l'étape du salage peut prendre de 30 minutes à plusieurs jours.

## **8.4. La mesure des propriétés sensorielles et texturale :**

La bonne activité de coagulation de la CCR, combinée avec sa très faible activité protéolytique, peut être utile dans la production de types de fromages, pour lesquels un goût amer est défavorable, car une valeur inférieure en activité protéolytique va de pair avec une formation réduite de peptides amers.

L'utilisation de la CCR pour la coagulation du lait de chamelle entier, cru et frais donne environ 36% de la résistance au caillé.

Pendant la période de stockage, les propriétés organoleptiques des fromages se sont améliorées pendant la période de maturation.

IBRAHIM *et al.*, (2018) ont étudié les propriétés sensorielles du fromage Domiati qui est fabriqué à partir du lait de chamelle avec de la CCR et la CBR, ils ont trouvé que l'apparence, la couleur, le goût et la saveur du fromage Domiati obtenu par la CCR est meilleur que celui obtenu par la CBR.

Pour la fabrication du fromage suivant la méthode traditionnelle, considérant que la supplémentation en calcium n'est pas susceptible d'améliorer la fermeté du caillé en raison de la sensibilité plus faible de l'activité de la chymosine de dromadaire envers les modifications de la concentration du calcium et le pH.

L'utilisation de cultures bactériennes adaptées au lait de chamelle pourrait encore augmenter la fermeté du caillé. Quelques paramètres d'analyse de la texture des fromages Domiati fabriqués à partir du lait de chamelle avec la CCR et la CBR ont été étudiés, ils ont obtenu une dureté meilleure avec la CCR qu'avec la CBR, ainsi qu'une bonne cohésion et de souplesse (IBRAHIM *et al*, 2018).

### 8.5. Le rendement fromager

Le rendement en fromage c'est le poids du fromage divisé par le poids du lait exprimé en un pourcentage (NELSON *et al*, 2004).

IBRAHIM *et al*, (2018) ont montré que le rendement en fromage frais fabriqué avec la CCR était nettement supérieur à 16,7% par rapport au fromage fabriqué avec la CBR qui est de 12 %. Plus l'étape de maturation progressé, le rendement des fromages CCR et CBR a diminué progressivement avec des différences significatives. Par contre, le rendement en fromage à base de CBR était comparable à celles trouvées par MEHAIA (1993) et KHAN *et al*, (2004).

Cependant, le rendement en fromages fabriqués avec CCR était plus élevé que ceux rapportés par SAIMA *et al*, (2003) et EL-ZUBEIR et JABREEL (2008) probablement du à la différence dans les coagulants utilisés. BARABANO et RASMUSSEN (1992) ont mentionné qu'il y avait des différences importantes dans la teneur en humidité du fromage fabriqué avec différents coagulants qui créent des différences dans le rendement du fromage.

### 8.6. Les avantages des enzymes fermentaire

Selon KUMAR *et al* (2010), la Chymosine recombinante a de nombreux avantages par rapport aux autres homologues :

- Elle a une faible activité protéolytique en raison de l'absence de la pepsine ;
- elle a une activité coagulante plus prévisible ;

## *Synthèse bibliographique*

- elle est adapté aux régimes végétariens et ;
- elle a acquis l'appui de certaines autorités religieuses (certifiée hallal et autres).

Mais ces produits restent cependant commercialisés a un prix élevé, qui rend difficile leur utilisation par des petites et moyennes entreprises surtout dans les pays en voie de développement (TEUBER, 1990).

## 1. Matériel et méthodes

La présente étude a été réalisée au laboratoire pédagogique de biochimie de l'université M. Mammeri de Tizi-Ouzou. Elle a été sous tendue par le matériel et les méthodes énumérés ci-dessous.

### 1.1. Matériel

#### 1.1.1. La source enzymatique

##### Caillettes de dromadaires

Les caillettes proviennent de dromadaires sélectionnés, d'une part, selon leur âge et, d'autre part, selon leur régime alimentaire (non sevrés et sevrés) (tableau XII). Après l'abattage au niveau de l'abattoir communal de Ouargla, le dernier tiers du troisième compartiment de leurs estomacs est prélevé. Les caillettes sont alors lavées à l'eau de robinet, dégraissées, hachées, mises dans des sacs en plastique puis congelées à - 18°C.

**Tableau XII :** Caillettes de dromadaires utilisées.

Dromadaire	Non sevré (NS)	Adulte (A)
Age	12 mois	8 ans
Régime alimentaire	Le chamelon tête encore sa mère	Alimentation variée

#### 1.1.2. Le matériel biologique

- **Poudre de lait écrémé type « low heat » :** Cette poudre de lait nous a été fournie gracieusement par la Laiterie de Drâa Ben Khedda (wilaya de Tizi- Ouzou) ;
- **Caséines bovines et camelines lyophilisées :** Elles sont obtenues selon le protocole décrit par SCHAMET *et al* (1992), à partir de lait préalablement écrémé ;
- **Enzymes coagulantes :**
  - pepsine (EC 3.4.23.1), extraite d'estomacs de porc ;
  - chymosine bovine recombinante Chy-Max (Christian. Hansen Lab. (DK) qui nous a été fournie gracieusement par la Laiterie de Drâa Ben Khedda (wilaya de TiziOuzou).
- **Serum albumine bovine (BSA), (SIGMA chemical Co., U.S.A) .**

### **1.1.3. L'appareillage**

- Agitateurs magnétique, balance électronique et balance de précision, bain-Marie, centrifugeuse, pH mètre, spectrophotomètre UV-visible, lyophilisateur à plateau...).

### **1.1.4. Le petit matériel**

Un certain nombre de petit matériel approprié a été également utilisé dans cette étude. Il s'agit de : micropipettes, membranes de dialyse, papier filtre, verre frité, ainsi que différents types de verrerie (béchers, fioles jaugées, fiole à vide, pipettes graduées, tubes à essais, burette...etc).

### **1.1.5. Produits chimiques et réactifs**

- produits et solvants : acide chlorhydrique, acide acétique, acide trichloracétique, &ethanol, glycérol.... ;

- sels et tampons : sulfate d'aluminium, sulfate de sodium, chlorure de sodium, phosphate dissodique....et

- Réactifs : réactif de Folin-Ciocalteu...

## **1.2. Méthodes**

### **1.2.1. Extraction des enzymes coagulantes**

L'extraction est effectuée selon la méthode de VALLES et FURET (1977) pour le bovin et adapté aux extraits issus de caillettes de dromadaires (Figure 18).

#### **1.2.1.1. Macération**

Des échantillons de caillette de poids P (g) sont décongelés et macérés dans un volume ( $1,25 \times PU$ ) d'une solution d'HCl 0,2M, à une température de 40°C pendant 60 minutes. Après filtration du mélange on obtient un extrait brut total.

#### **1.2.2.2. Clarification**

Après macération, les extraits obtenus sont clarifiés par l'ajout de 1% (V/V) d'une solution de sulfate d'aluminium  $Al_2(SO_4)_3$ , 1M et 5% (V/V) d'une solution de sulfate dissodique  $Na_2SO_4$ , 1M, chauffée quelques minutes à 40 C°.

Une filtration est ensuite réalisée permettant l'obtention d'un filtrat jaune.

#### **1.2.2.3. Concentration du filtrat**

Après filtration, le filtrat jaune obtenu va subir une concentration par addition d'une solution saturée de NaCl, additionnée à 1% (V/V) d'une solution d'HCl ( $d= 1.19$ ). Après un repos d'une heure suivie d'une centrifugation (2100xg / 20min), nous obtenons un précipité que l'on fait dissoudre dans un volume minimal d'eau distillée à raison de 10% (P/V).

#### **1.2.2.4. Ajustement du pH**

Le pH de ces extraits enzymatiques clarifiés est ajusté à 5,5 par une solution de phosphate dissodique, 1M.

#### **1.2.2.5. Dialyse**

Les extraits issus de caillettes de dromadaire non sevrés et adultes sont placés dans des boudins de dialyse dont le seuil de rétention est de 10000 Da, puis sont placés dans l'eau distillée pendant 48 heures à 4°C, sous agitation lente. La solution de contre dialyse est renouvelée toute les 4 heures.

Les extraits obtenus ont été dénommés ECD NS (extraits issus d'animaux non sevrés et ECD A (extraits issus d'animaux adultes). La conservation de ces ECD est réalisée à 4°C après addition d'azide de sodium.

#### **1.2.2. Calcul du rendement de l'extraction**

Le rendement d'extraction R pour les extraits de caillettes de dromadaire non sevrés et adultes exprimé en pourcentage (%) est défini étant le rapport de la masse de l'extrait obtenu (précipité) et la masse de la caillette employée. Il est déterminé selon la formule suivante :

$$R(\%) = M/M0 \times 100$$

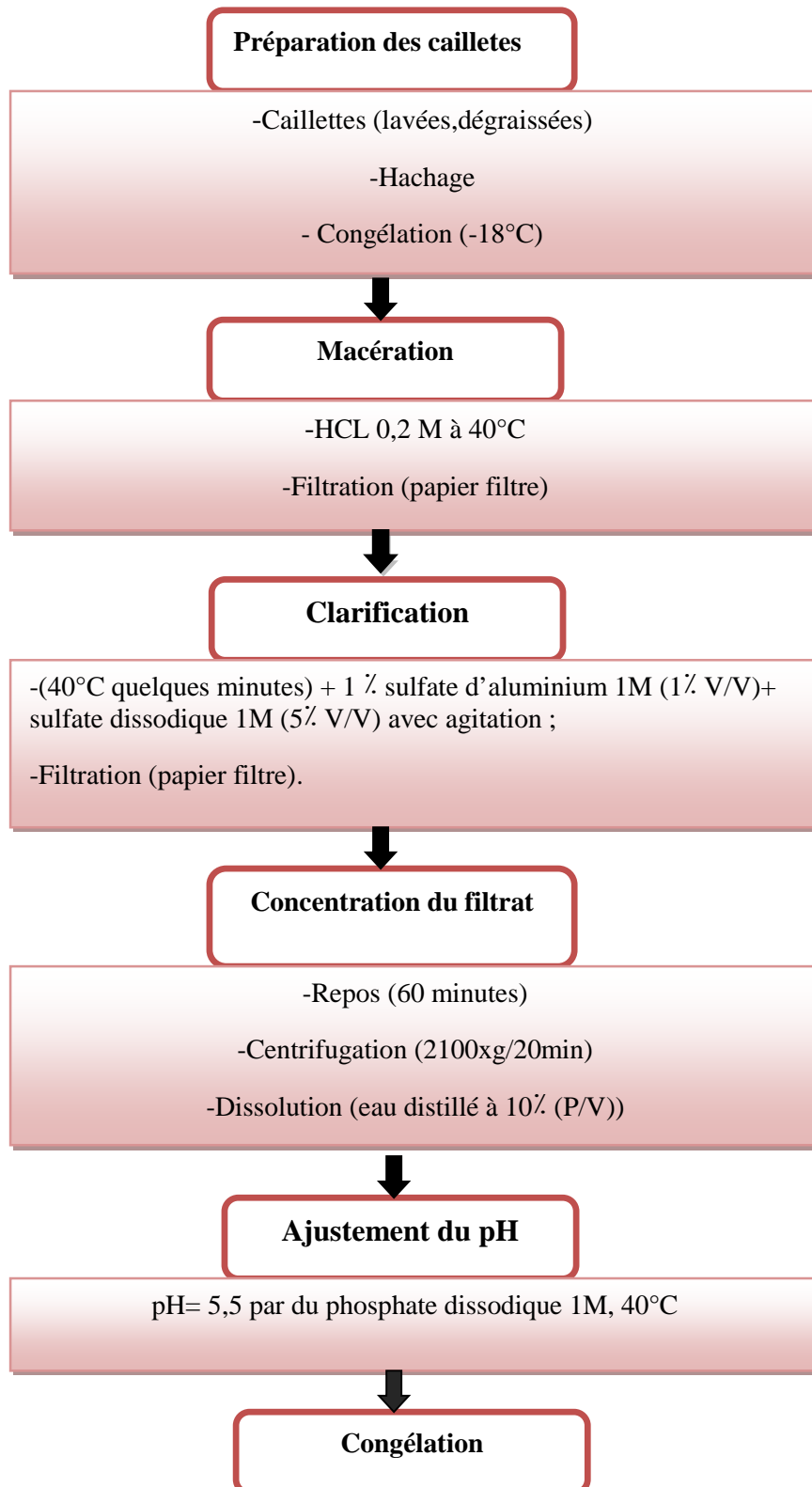
**R (%)** : rendement exprimé en pourcentage

**M** : masse en gramme de l'extrait résultant (précipité)

**M0** : masse en gramme de la caillette.

#### **1.2.3. Caractérisation des extraits coagulants gastriques**

La caractérisation des extraits enzymatiques consiste en la détermination de leur teneur en protéines, par la méthode LOWRY *et al*, 1951, et leurs activités coagulante et protéolytique.

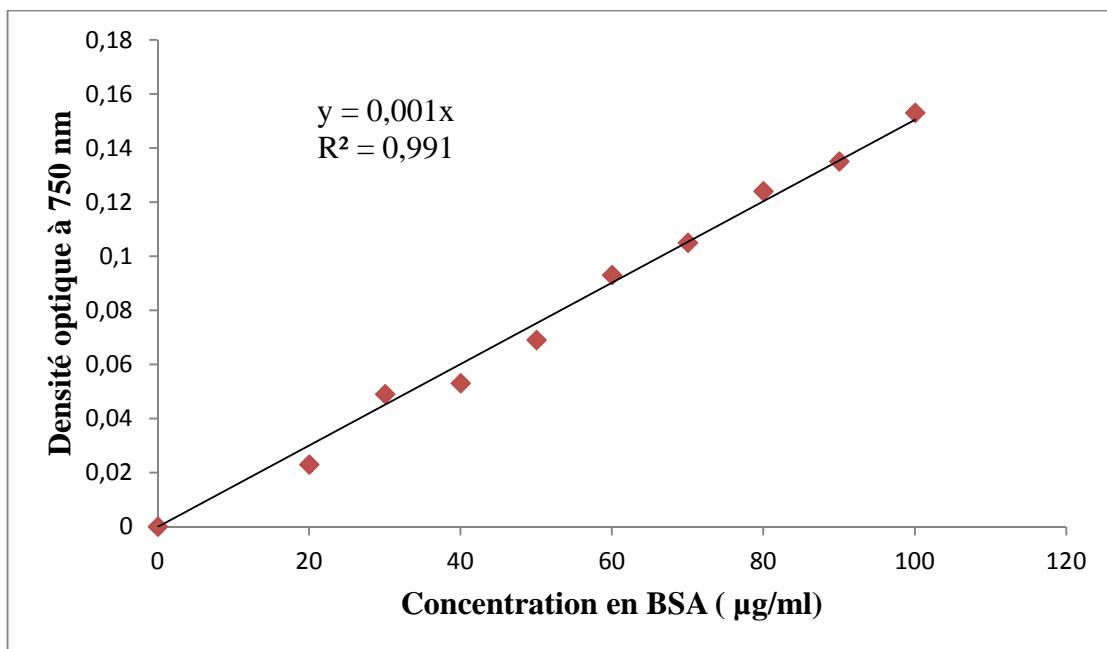


**Figure 18 : Protocole d'isolement des extraits enzymatiques gastriques préconisé par VALLES et FURET (1977) pour le bovin, et adapté aux extraits issus de caillettes de dromadaire.**

### 1.2.2.3.1. Dosage des protéines totales

Le dosage est réalisé selon la méthode spectrophotométrique de LOWRY *et al* (1951). Elle est facile à mettre en œuvre et assez reproductible. C'est une mesure colorimétrique où l'addition d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu à une solution protéique donne une coloration bleue foncée. Cette coloration résulte de la réaction de la solution cuivrique avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungstomolybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine en un complexe, le bleu de molybdène.

La densité optique (DO) lue au spectrophotomètre à 750 nm permet de déterminer la concentration en protéines des extraits analysés en se référant à une courbe d'étalonnage  $DO=f(C)$  établie avec des solutions en concentrations de BSA connues (figure 19). Le mode opératoire est présenté en annexe 01.



**Figure 19 : Courbe d'étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence ;  $R^2$ = coefficient de corrélation.**

### 1.2.3.2. Mesure de l'activité coagulante

L'activité coagulante des extraits enzymatiques est déterminée selon la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN *et al* (1977). Cette méthode consiste à déterminer visuellement dans des conditions standardisées, le temps d'apparition des flocons dû à la formation d'agrégats de caséine.

Cette transformation s'observe mieux sur un film fin de lait dans un tube en rotation, disposé sur un fond noir. Cette méthode donne des résultats fiables avec une bonne reproductibilité.

La méthode consiste à ajouter 1 ml d'extrait coagulant à 10 ml de substrat standard (poudre de lait reconstituée) à 30°C puis à noter le temps de coagulation.

La préparation du substrat standard consiste à la dissolution de la poudre de lait type (low heat) à 10% (P/V) dans une solution de CaCl<sub>2</sub> (0,01M) et ajustement du pH à 6,5 par l'ajout d'une solution de NaOH (0,1N).

Le substrat standard est ensuite reparti dans des tubes à essais, à raison de 2ml/tube, suivi d'une incubation dans un bain marie à 30 °C pendant 15 min. L'addition de l'extrait coagulant est réalisée à raison de 1ml/10ml du substrat standard. Une homogénéisation immédiate et rapide est nécessaire. Dans le bain marie, les trois retournements successifs du mélange après 30 secondes correspondent au temps zéro (Figure 20).

L'unité d'activité coagulante (U.A.C) ou "unité présure" (U.P) est définie comme étant la quantité d'enzyme par millilitre d'extrait enzymatique qui provoque la floculation de 10 ml de substrat en 100 sec à 30 °C. Elle est calculée comme suit :

$$UP=10 \times V / Tc \times Q$$

**UP** : unité présure ;

**V** : volume de substrat standard utilisé (ml) ;

**Q** : volume d'extrait coagulant (ml) ;

**Tc** : temps de coagulation (secondes).

#### **1.2.3.2.1. Détermination de la température optimale d'activité**

Pour la détermination de la température optimale de l'activité des extraits coagulants, le lait a été porté à différentes températures : 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C.

L'effet de la température sur la coagulation du lait est déterminé par la mesure du temps de floculation à des températures variant de 25 à 60 °C.

#### **1.2.3.2.2. Détermination de la stabilité thermique**

Pour la détermination de la stabilité thermique de l'activité des extraits coagulants, les extraits ont été portés à différentes températures : 55, 60, 65°C pendant 15min, 30min, 45min, 1 heure.

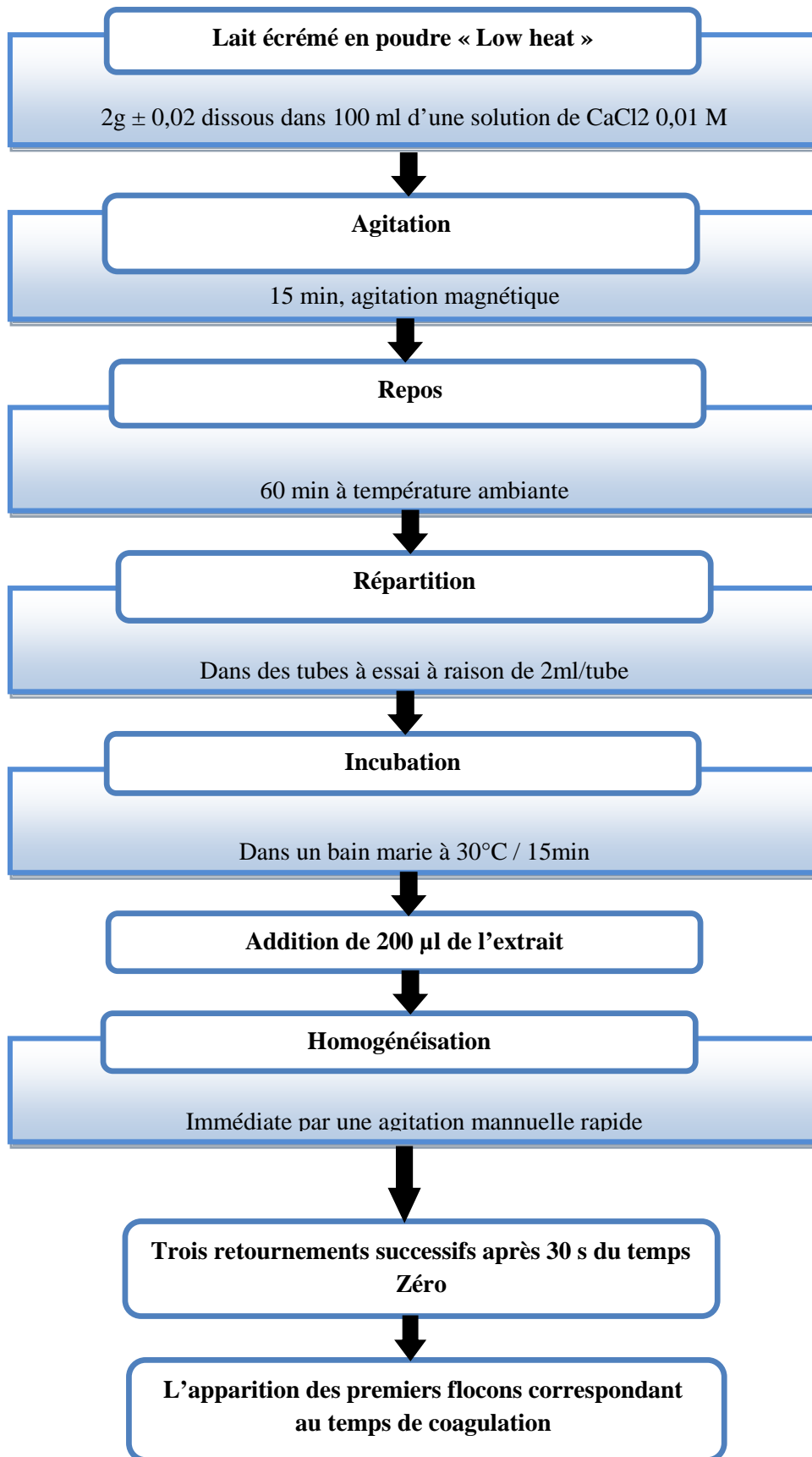


Figure 20 : Mesure du temps de floculation par la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLIN *et al* (1977).

#### **1.2.3.2.3. Détermination du pH optimal de l'activité**

Le pH a une forte influence sur l'activité enzymatique de ces préparations et par conséquent sur le temps de floculation du lait (RAMET, 1997).

#### **1.2.3.2.4. Détermination de la concentration optimale de CaCl<sub>2</sub>**

Le pH optimal de l'activité coagulante des extraits enzymatiques a été déterminée en faisant varier les pH des solutions de : 2,2 , 2,6 , 3 , 3,6 , 4 , 4,6 , 5 , 5,5 , 6 , 6,6 , 7 , 7,6.

L'influence de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante a été déterminée en utilisant des concentrations variées de CaCl<sub>2</sub> : 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 et 0,07 M.

#### **1.2.3.2.5. Détermination des paramètres cinétiques**

Les paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_M$ ) des protéases sont déterminés à partir de la représentation graphique de Lineweaver-Burk en utilisant des concentrations de substrat de 2 à 12 mg/ml avec un intervalle de variation de 2mg/ml, ces résultats sont obtenus en faisant appel à un logiciel qui est l'HEPER 32.

#### **1.2.3.3. Mesure de l'activité protéolytique**

La mesure de l'activité protéolytique des extraits coagulants est fondée sur l'intensité de la protéolyse des caséines camelines et bovines en solution sous l'action enzymatique de ces extraits, cette dernière est déterminée par la méthode de GREEN et STACKPOOLE (1975) (annexe 02).

Pour cela, on mesure la concentration en produits d'hydrolyse des caséines solubles dans de l'acide trichloracétique (TCA) à 12%. Le dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode préconisée par LOWRY *et al* (1951).

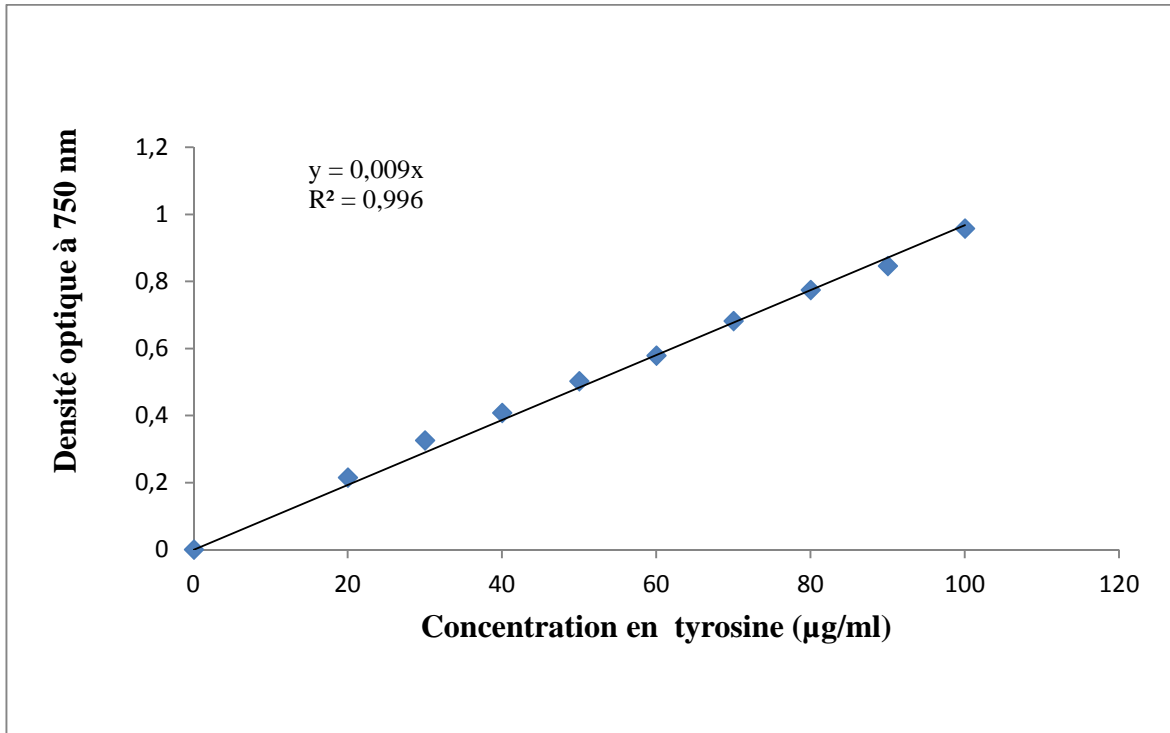
Les résultats s'expriment en termes de concentration de tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ ) d'extrait enzymatique (FEDERICI, 1982 cité par HAMRANI, 2008) par référence à une courbe étalon établi à partir de concentrations croissantes en tyrosine, variant de 10 à 100  $\mu\text{g/ml}$  et à 750nm (figure 21).

#### **1.2.3.3.1. Préparation du substrat caséinique**

Les caséines bovines et camelines sont préparées selon la méthode de SHAMET *et al* (1992) et WONGOH *et al* (1998) à partir du lait bovin et du lait camelin. Le lait est écrémé par centrifugation à 3500×g pendant 20 min à 4 °C. Le pH est ensuite ajusté à 4,6 et 4,3,

respectivement par ajout progressif d'HCl 4N. Après centrifugation à 3500xg pendant 15 min à 20°C, il y a formation d'un précipité de caséines.

Ce dernier est dissout dans l'eau distillée, puis dialysés contre l'eau distillée à 4°C pendant 48 à 72 heures, afin d'éliminer les composés azotés non protéiques (NPN), le lactose et les sels minéraux. Après la dialyse, les échantillons de protéines sont congelés à -20°C et lyophilisés (figure 22). Les caséines lyophilisées sont solubilisées à 1% (p/v) dans du tampon phosphate, pH 5,5.



**Figure 21 : Courbe d'étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al (1951). La tyrosine est utilisée comme protéine de référence ; R<sup>2</sup>= coefficient de corrélation.**

#### **1.2.4. Les statistiques**

L'analyse de la variance ANOVA au seuil de signification 5%, n'a révélée aucune différence significative entre les activités coagulantes de différentes enzymes étudiée (annexe 03) en utilisant le logiciel STATISTICA.

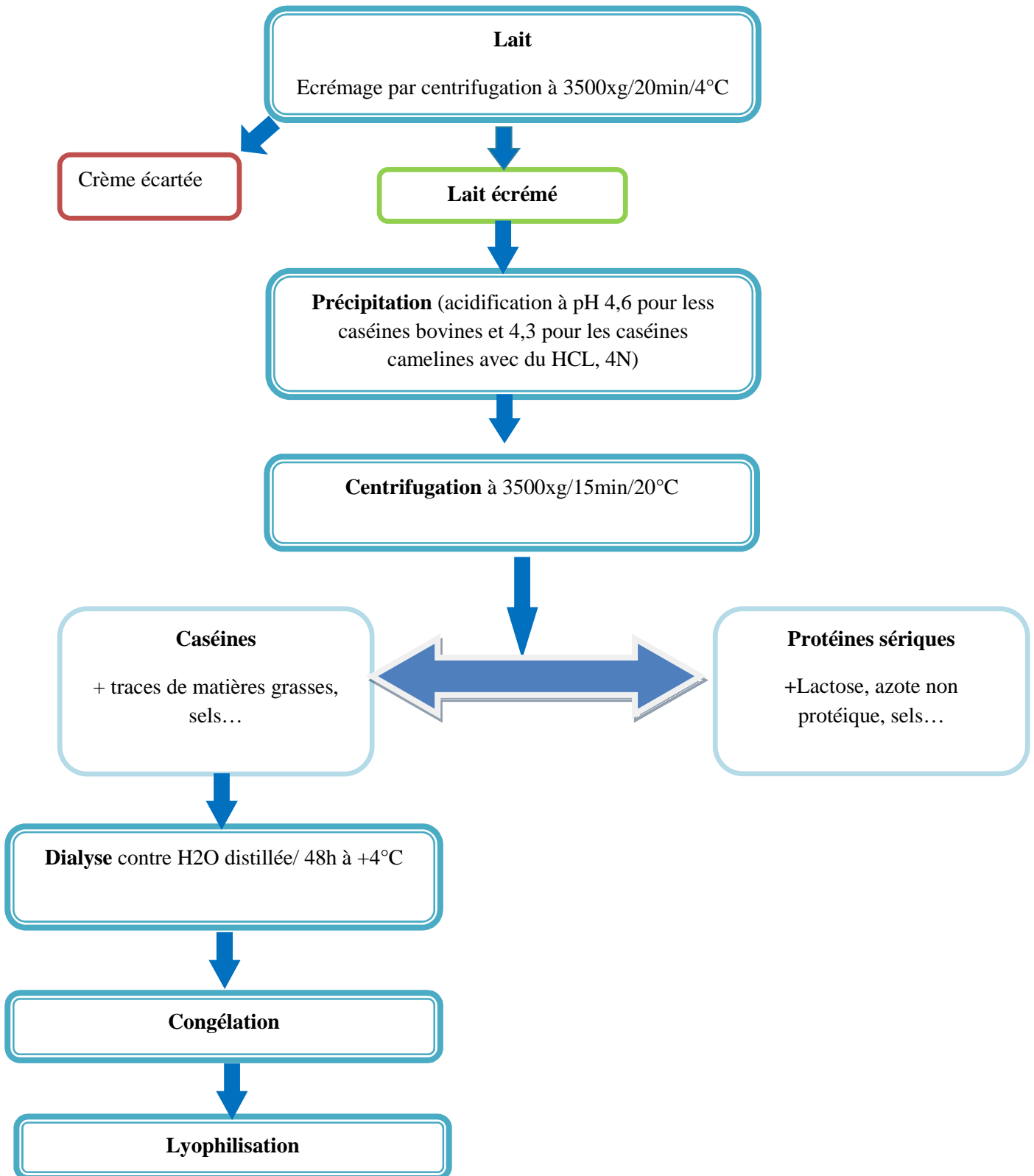


Figure 22 : Protocole d'isolement des caséines et des protéines du lactosérum à partir du lait bovin (SCHAMET *et al*, 1992) et du lait camelin (WONGOHO *et al*, 1998).

**2. Résultats et discussions****2.1. Rendement d'extraction des enzymes coagulantes**

La méthode d'extraction de VALLE et FURET (1977) Appliquée sur les caillottes de dromadaires non sevrés et adultes nous a permis d'obtenir un rendement d'extraction égale à 2,10% et 6,72% respectivement (tableau XII). Avec la même technique d'extraction, BOUDJENAH, (2012) a obtenu un rendement d'extraction égal à 30 % à une température de 42°C en travaillant sur le même type de caillotte de dromadaire que celui utilisé dans notre travail. Cette différence pourrait être due aux conditions expérimentales.

**Tableau XIII : Rendement d'extraction pour les deux extraits issus des caillottes de dromadaires (ECD) non sevrés (NS) et adulte (A).**

<b>Préparation enzymatique</b>	<b>ECD NS</b>	<b>ECD A</b>
<b>Poids de la caillotte (g)</b>	31,33	159,87
<b>Poids de l'extrait résultant (précipité) en (g)</b>	0,66	10,76
<b>Rendement (%)</b>	<b>2,10</b>	<b>6,72</b>

**2.2. Caractérisation des extraits de caillotte de dromadaire non sevrés (NS) et adultes (A)****2.2.1. Mesure de l'activité coagulante et protéolytique**

La mesure du temps de floculation selon la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN (1977) a permis de calculer l'activité coagulante exprimée par le nombre d'unité présure (UP) (tableau XIV).

Nous avons utilisé la pepsine porcine (PEP) et la chymosine bovine recombinante (CHY) comme témoin.

D'après ALAIS et MULTON (1963), la production d'enzyme par caillotte d'agneau est inversement proportionnelle à son poids.

**Tableau XIV : Concentration en protéines des extraits et leurs activité coagulante (UP) et protéolytique.**

	<b>ECD A</b>	<b>ECD NS</b>	<b>CHY</b>	<b>PEP</b>
Concentrations (mg/ml)	0,9	0,9	0,9	0,9
Activités coagulantes (UP)	1,26	0,95	5,40	5
Activités protéolytiques (CN bovine)	0,0298	0,0290	0,089	0,108
Activités protéolytiques (CN cameline)	0,058	0,049	0,088	0,173

\* La différence de moyenne est significative (p=0,00018).

Il ressort de ce tableau que l'activité coagulante (UP) varie d'un ECD à un autre. L'ECD NS montre une activité coagulante (UP) de 0,95 qui est légèrement inférieure à celle obtenue avec l'ECD A qui est de 1,26. La CHY présente une activité coagulante (UP) de 5,40 et la PEP montre une activité coagulante (UP) de 5. Nos résultats concordent bien avec ceux apportés par SIBOUKEUR *et al* (2005), BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2011) et BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2014) qui ont montré que les extraits provenant de caillottes de dromadaire âgés présentent une meilleure activité coagulante pour le lait camelin que ceux provenant de jeunes dromadaires.

Suivant la même méthode de mesure de l'activité coagulante, BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2012) ont trouvé une activité coagulante (AC) de 0,41 avec une concentration de 1,64 mg/ml pour une préparation enzymatique issue de caillotte d'un dromadaire adulte, alors qu'elle est de 0,135 pour l'extrait issue de caillotte de dromadaire non sevré qui a une concentration de 1,26 mg/ml.

D'après HESSAS (2001), le nombre d'unités présure contenues dans le même volume d'extraits varie selon leur origine. L'ECD NS et l'ECD A ont été préparés dans les mêmes conditions et ne diffèrent que par l'âge du dromadaire dont ils proviennent, ce qui peut expliquer l'écart obtenu dans leur activité coagulante.

D'une part, ECK et GILLIS (1997) et BROOME et HICKEY (1990) indiquent que la chymosine est l'enzyme majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale et la pepsine n'assure que 20%.

La mesure de l'activité protéolytique des extraits nous permet de caractériser le pouvoir protéolytique de chacun, par la mesure du taux de peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des caséines bovines et camelines par les deux préparations coagulantes (ECD NS, ECD A) obtenu par la mesure de l'absorbance à 750 nm.

D'après le tableau XIV, l'activité protéolytique de la PEP sur les caséines bovines et camelines est la plus importante, suivie par la CHY, ECD A et enfin l'ECD NS qui présente l'activité protéolytique la plus faible. Cependant, l'activité protéolytique semble plus importante sur les caséines camelines que sur les caséines bovines.

Il est à relever que l'ECD NS est caractérisé par une activité protéolytique relativement faible sur les caséines camelines. Les deux extraits réagissent presque d'une manière identique vis-à-vis des caséines bovines et camelines. En revanche, la présure bovine est très protéolytique envers le lait bovin.

Sur les caséines camelines, on a noté une plus grande activité protéolytique avec les quatre extraits, cela laisse supposer qu'il y'en a une plus grande hydrolyse des caséines avec libération des acides aminés ainsi que des peptides de faible poids moléculaire avec l'ECD A qu'avec l'ECD NS. Au cours de l'affinage du lait, en plus de l'attaque de la caséine k, d'autres sites comme la caséine  $\alpha$ 1et  $\beta$  sont susceptibles à la protéolyse.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux trouvés par HESSAS (2001), SIBOUKEUR *et al* (2005) et BOUDJNAH-HAROUN *et al* (2014), qui ont montré que l'extrait gastrique issu de caillette d'un dromadaire adulte est caractérisé par une activité moins importante qu'un extrait issu de caillette de dromadaire non sevré.

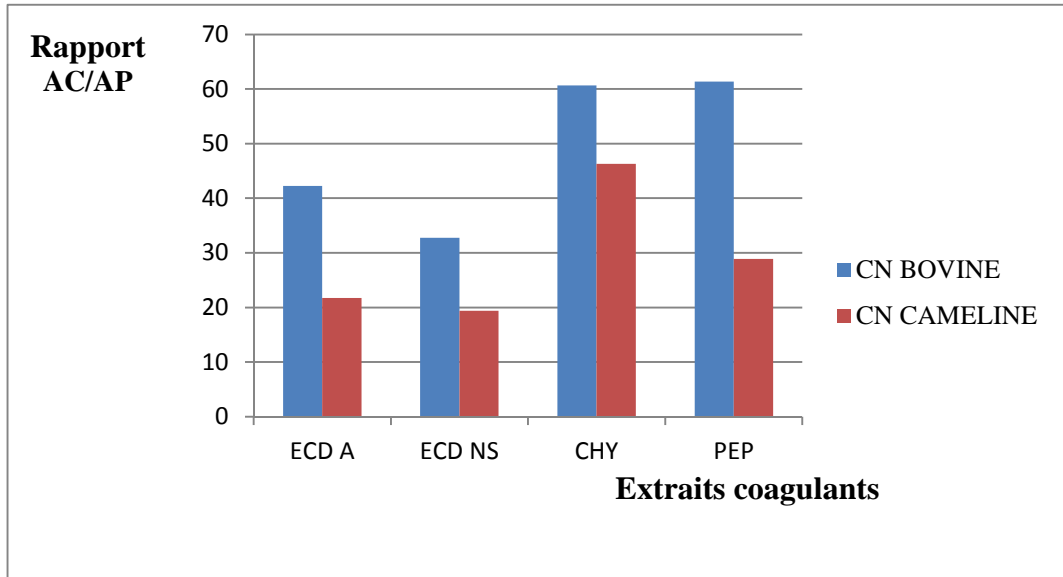
En industrie fromagère, on recherche toujours à ce que les enzymes coagulantes utilisées aient une activité coagulante élevée et une activité protéolytique faible (RAMET, 1997), parce que une forte activité protéolytique est généralement indésirable car, si la quantité de peptides libérés de cette hydrolyse enzymatique est élevée elle serait à l'origine du développement d'amertume dans les fromages.

### **2.2.2. Le rapport activité coagulante/ activité protéolytique (AC/AP)**

Le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique pour les préparations enzymatiques représente l'indice d'appréciation de la qualité des enzymes coagulantes. Sa

mesure permet de déterminer l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait et nous renseigne également sur la qualité du produit fini.

Le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique mesurée sur les caséines bovines et camelines est indiqué dans la figure 23.



**Figure 23 : Rapport AC/AP pour les extraits coagulants.**

Nous remarquons que le rapport AC/AP est plus important dans le cas des caséines bovines avec une valeur plus élevée pour l'ECD A, CHY et PEP qu'avec les caséines camelines.

On constate que l'ECD A présente un meilleur rapport AC/AP que l'ECD NS, contrairement à la CHY qui possède presque le même rapport AC/AP avec la PEP dans les deux types de caséines étudiées.

Le rapport AC/AP de la CHYM et la PEP pour les caséines bovines est plus élevé que celui des deux ECD.

D'après FOX *et al* (2000) cité par HATTEM *et al* (2017), des extraits de caillettes de dromadaire ont été utilisés pour coaguler le lait de vache avec succès. De plus, JENSEN *et al* (2013) indiquent que la chymosine cameline recombinante présente une activité de coagulation supérieure de 70% à celle de la chymosine bovine recombinante vis-à-vis du lait bovin.

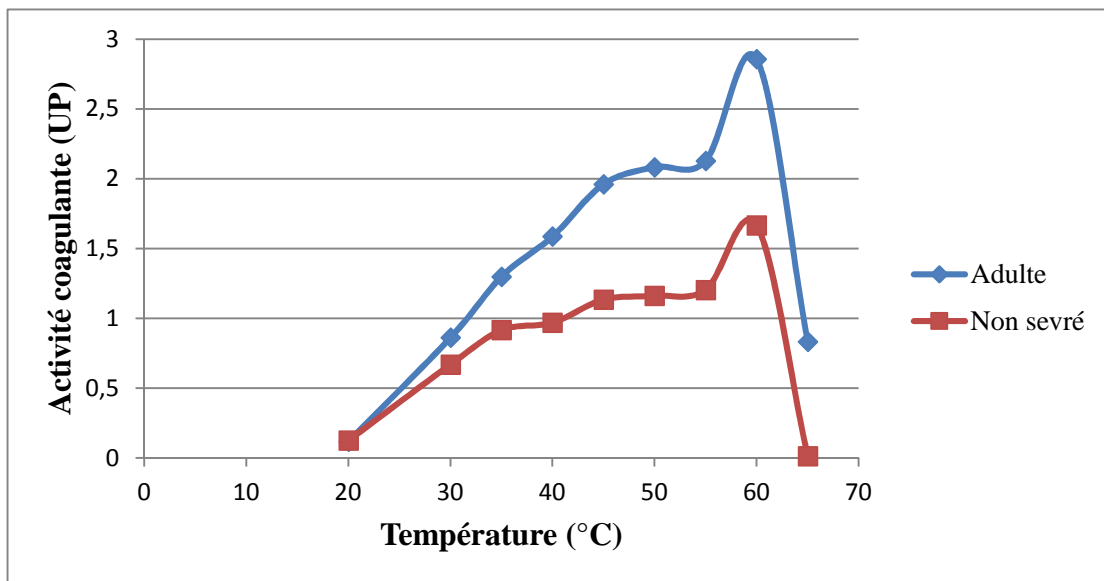
L'ECD adultes présente le rapport activité coagulante/activité protéolytique (AC/AP) le plus élevé. Cette caractéristique fourni le choix de cet extrait pour la coagulation du lait de chamelle car plus ce rapport est grand, plus l'enzyme est spécifique et les fromages obtenus sont de haute qualité avec une fermeté désirable et aucune libération d'arome amers et avec un bon rendement fromager ; tandis qu'un rapport AC/AP faible donne des rendements fromagers réduits avec des fromages ayant des saveurs désagréables.

### **2.3. Les facteurs affectant l'activité coagulante de l'ECD A et l'ECD NS**

#### **2.3. 1. Effet de la température sur l'activité coagulante des extraits coagulants**

La température affecte fortement la coagulation et le temps de coagulation du lait (DYBOWSKA et FUJIO, 1996 ; TROCH *et al*, 2017).

La détermination de la température optimale d'activité des ECD A, ECD NS, PEP et de la CHY a été réalisée en mesurant le temps de floculation à différentes températures du lait standard allant de 20 à 65°C (figure 24, 25).



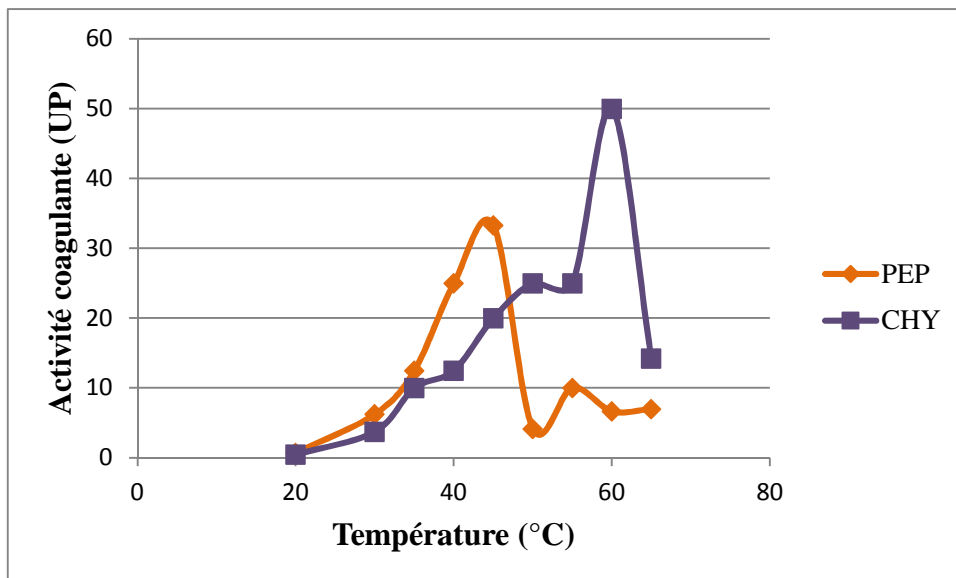
**Figure 24 : Influence de la température sur l'activité coagulante de l'ECD A et l'ECD NS.**

Il ressort de la figure que l'activité des ECD varie avec la température et que cette activité est à son optimum vers 60°C pour les deux extraits l'ECD A et l'ECD NS. En effet, quelque soit la température, l'ECD A donne la meilleure activité coagulante par rapport à l'ECD NS.

L'activité coagulante augmente progressivement à des températures allant de 20°C à 60°C pour les deux extraits enzymatiques ECD A, e ECD NS. A 20°C, on a l'activité coagulante est très faible.

La meilleure activité coagulante pour l'ECD A et l'ECD NS est obtenue à 60°C. Au delà de ces valeurs, l'activité baisse pour les deux extraits et fini par s'annuler à 65°C. A cette température, les enzymes coagulantes présentes dans les extraits sont dénaturées.

Des résultats similaires sont signalés par RAMET (1993) montrent l'existence d'une relation quasi linéaire entre la température et l'activité des préparations coagulantes, dans l'intervalle de température de 25-40°C. NAJERA *et al.* (2003) et CHAZARRA *et al.* (2007) rapportent le même résultat dans un intervalle de 20- 40°C.



**Figure 25 : Influence de la température sur l'activité coagulante de la PEP et la CHY.**

D'après la figure 26, le comportement de la PEP et de la CHY présente une différence. En effet quelque soit la température la CHY donne une meilleure activité coagulante par rapport à la PEP.

Pour la PEP, à des températures de 20°C à 45°C l'activité coagulante augmente progressivement. La meilleure activité coagulante est obtenue à la température de 45°C, au delà de cette valeur l'activité baisse.

Par contre pour la CHY, à des températures allant de 20°C à 60°C l'activité coagulante augmente progressivement. La meilleure activité est obtenue à 60°C, au delà de cette valeur y'aura une diminution de l'activité.

Comparativement à la présure bovine, les ECD A et NS semblent renfermer des enzymes coagulantes présentant une thermostabilité accrue. Celle-ci serait due à la structure de ces enzymes et les liaisons qui en existent.

Selon NOUANI *et al* (2011), la température optimale de la pepsine purifiée de poulet est de 40°C. L'enzyme est totalement inactive à une température du lait égale à 55°C. HAMIDI *et al* (2015) ont réalisé la coagulation du lait de chamelle par l'extrait enzymatique issu de la couche de kaolin du gésier de poulet. Cet extrait avait une température optimale de 42°C.

Le maximum de l'activité coagulante est enregistré à la température de 65°C pour les protéases acides de *Bacillus sphaericus* (EL BENDARY *et al.* 2007) et de *Thermomucor indicae-seudaticae* (MERHEB-DINI *et al.* 2010).

Une enzyme coagulante microbienne isolée à partir d'une culture de *Bacillus cereus* a été étudiée par MELACHOURIS et TUCKEY (1968). La vitesse maximale de coagulation de celle-ci a été obtenue à 75-80°C.

D'après ROGELI *et al* (2001), la présure bovine et la chymosine de veau recombinante ont un optimum d'activité coagulante à une température de 45°C contre 40°C pour la chymosine d'agneau recombinante.

Les enzymes coagulantes provenant de microorganismes ainsi que de végétaux semblent avoir la thermostabilité la plus importante par rapport à celles issus d'autres organismes.

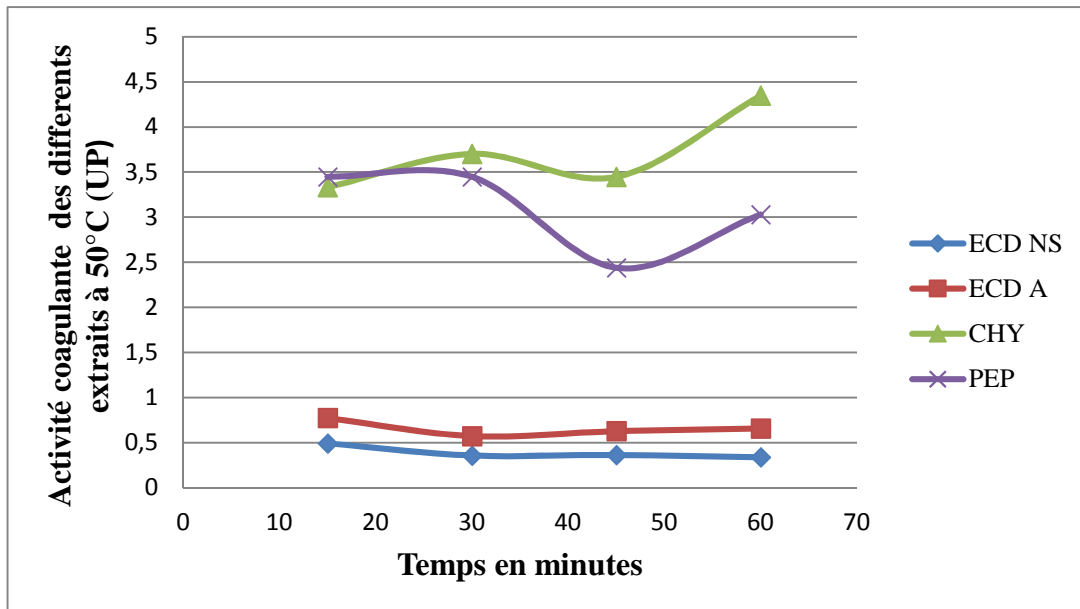
Toutefois, il faut noter que l'effet de la température résulte de la conjugaison de deux effets, l'un sur la réaction enzymatique, l'autre sur la phase secondaire de la coagulation et qui correspond à l'étape d'agrégation. En effet, la coagulation du lait ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures ou égales à 18 °C. Cela est due a l'importance des interactions hydrophobes dans l'agrégation des micelles hydrolysées (LUCEY, 2002).

En fromagerie, l'effet favorable de la température sur l'activité coagulante des enzymes peut être mis en profit lorsque les conditions de coagulation le permettent. Ce qui permet de réduire la quantité d'enzyme ajoutée et par conséquent de réduire toute activité protéolytique ultérieure.

### **2.3.2. Effet de la stabilité thermique sur l'activité coagulante des extraits coagulant**

L'étude de la stabilité thermique montre que toutes les enzymes sont très sensibles à la température. La perte de l'activité enzymatique est en fonction du temps d'incubation et de la température du milieu réactionnel.

La figure 26 met en évidence la stabilité thermique des ECD A, ECD NS, pepsine et de la chymosine à 50°C en fonction du temps.



**Figure 26 : Influence de la stabilité thermique sur les extraits coagulants ECD A, ECD NS, PEP et CHY à 50°C en fonction du temps.**

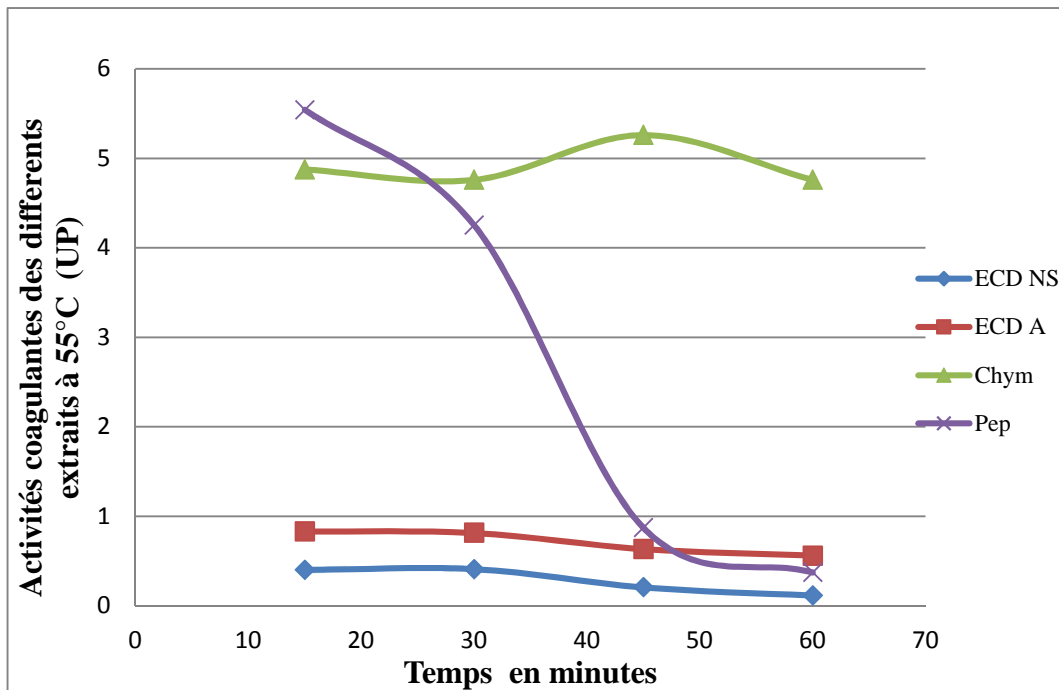
D'après la figure 27, à une température de 50°C, les deux extraits coagulants issus de dromadaire adulte et non sevré montrent une perte d'activité de 30 % après 30 min d'incubation. Après 60 min d'incubation l'activité coagulante est stable au alentour de 0,5 UP pour les deux extraits ECD A et ECD NS.

Pendant les premières 30 min, la pepsine a montré plus de stabilité où l'activité coagulante était d'environ 3,5 UP. Après 45 min d'incubation la pepsine montre une perte

d'activité de 28%. Par contre la CHY présente une augmentation de son activité après 60 min d'incubation, où l'activité coagulante est d'Environ 4,3 UP.

BENYOUCEF *et al.* 2016 ont montré que l'activité coagulante de la protéase de *Penicilium sp* est thermiquement stable jusqu'à une température de 40°C et 35°C pour la présure. Au-delà de cette température, une diminution de l'activité est notée jusqu'à l'inhibition totale à 50°C pour la présure et à 60°C pour l'extrait fongique, due probablement à la dénaturation de la structure moléculaire de la protéine.

La figure 27 met en évidence la stabilité thermique des ECD A, ECD NS, PEP et de la CHY à 55°C en fonction du temps.



**Figure 27 : Influence de la stabilité thermique sur les extraits coagulants ECD A, ECD NS, PEP et CHY à 55°C en fonction du temps.**

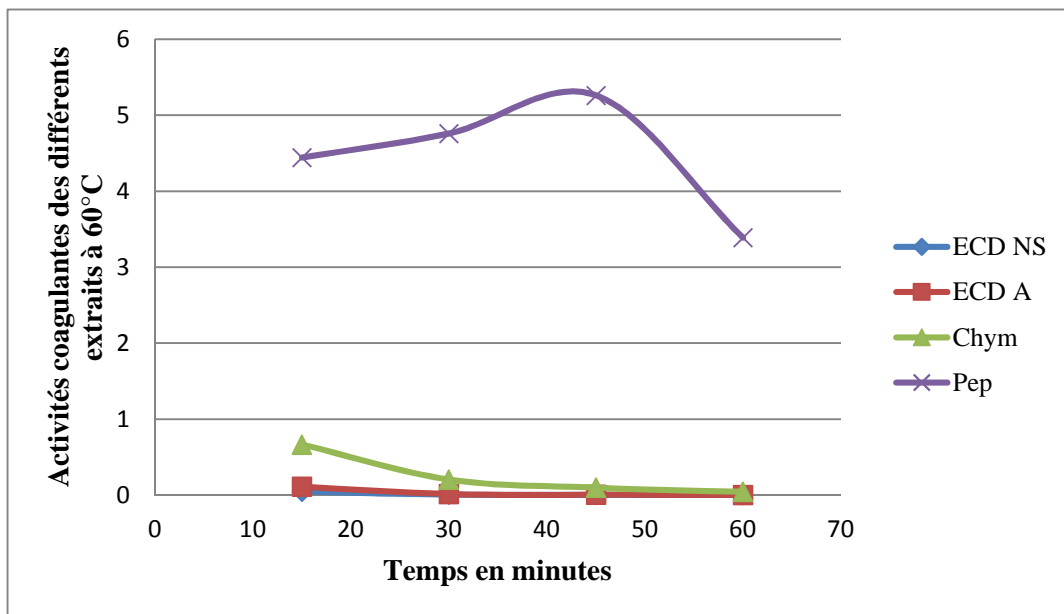
La figure 28 montre que l'activité coagulante des extraits coagulants ECD A et ECD NS à 50°C est thermiquement stable pendant les premières 30 min d'incubation, mais après 60 min d'incubation l'activité des deux extraits coagulants diminue.

La CHY présente une activité coagulante stable après 30 min d'incubation, mais après 60 min elle montre une perte d'activité d'environ 15%.

Après 30 min d'incubation, la pepsine montre une perte d'activité d'environ 23% et de 90% après 60 min. Des résultats différents ont été obtenus pour les protéases acides d'autres origines. KUMAR *et al.* (2005) signalent une perte d'activité de 62% à la même température au bout de 60 min pour la protéase acide de *Rhizopus oryzae*.

FERNANI, 2002 en étudiant l'extrait coagulant des graines de melon a noté une stabilité thermique entre 30 °C et 55°C après 30 minutes d'exposition. MATOUB (2000) et BELHAMICHE (2005) ont indiqué une stabilité thermique dans l'intervalle de température compris entre 30 °C et 50 °C, respectivement, pour la coagulase produite par une souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée et la coagulase produite à partir de la souche de *Mucor pusillus*.

La figure 28 met en évidence la stabilité thermique des ECD A, ECD NS, PEP et de la CHY à 60°C en fonction du temps.



**Figure 28 : Influence de la stabilité thermique sur les extraits coagulants ECD A, ECD NS, PEP et CHY à 60°C en fonction du temps.**

La figure 28 montre qu'une diminution de l'activité coagulante des extraits coagulants ECD A, ECD NS et de la CHY est notée jusqu'à l'inhibition totale à 60°C après 60 min d'incubation, due probablement à la dénaturation de la structure moléculaire de la protéine.

NOUANI, 2009 a constaté que la présure et la pepsine purifiée de limon sont complètement dénaturées à une température égale à 55 °C, par contre, la dénaturation de l'enzyme de poulet a lieu à 60°C.

Quand la température s'élève au-dessus de 50°C, la dénaturation de la présure devient sensible, les protéases fongiques sont plus résistants au chauffage ce qui explique que la température optimale de la coagulation soit plus élevée (ALAIS, 1984). Effectivement, les travaux de SOMKUTI et BABEL (1968) et ceux de PREETHA et BOOPATHY (1997), ont indiqué une température d'inactivation de 65°C pour la coagulation du genre *Mucor*. En revanche, l'inactivation thermique de la protéase de *Rhizopus Oryzae*, rapportée par (KUMAR *et al.* 2004) a lieu à 72°C.

Auparavant, GUÉRARD (1987), en caractérisant la pepsine de la roussette fait remarquer que la faible résistance thermique de la pepsine coagulante, comparativement à la Chymosine d'une part et à certaines protéases fongiques d'autre part, peut permettre d'envisager une inactivation thermique des enzymes après formation du coagulum et prévenir ainsi les défauts engendrés lors de l'affinage des fromages. Ces propriétés permettent donc d'envisager, sous certaines conditions, une utilisation de cette enzyme en industrie fromagère. L'étude de la stabilité au cours de la conservation a été réalisée.

### **2.3.3. Effet du pH des extraits coagulants et la pepsine sur l'activité coagulante**

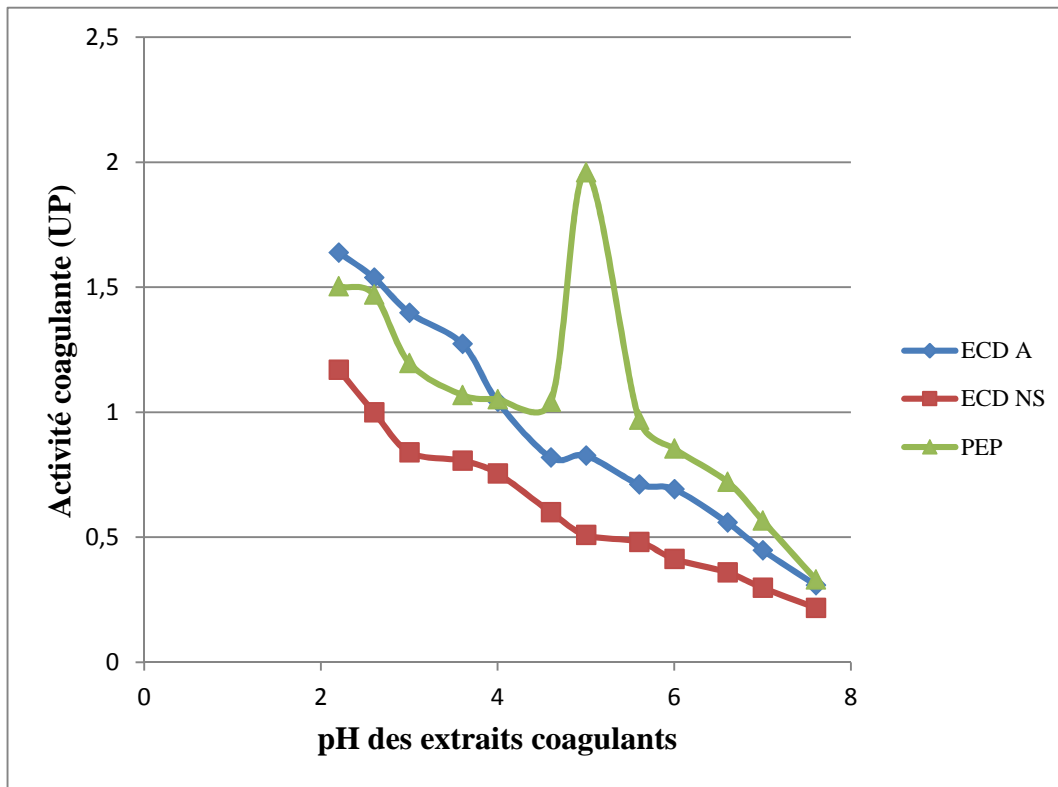
Les études montrent que l'activité enzymatique dépend du pH de la solution tampon utilisée. La solution tampon représente une situation idéale pour l'enzyme en général.

L'influence du pH des extraits coagulants (ECD A, ECD NS) et la PEP sur l'activité coagulante du lait est illustrée dans la figure 29.

D'après nos résultats, l'activité optimale est révélée à pH 2,2 (1,63 UP pour ECD A contre 1,16 UP pour ECD NS), au-delà de cette valeur, l'activité coagulante diminue jusqu'à atteindre, à pH 7,6, une activité de 0,30UP et 0,21 UP respectivement pour les ECDA et ECD NS.

On a constaté que la PEP une activité de 1,50 UP obtenue à pH 2,2, à partir de cette valeur y'a une légère diminution d'activité. A pH 5, on note une activité optimale de 1,96 UP comme celle rapporté par BELHAMICHE (2005) pour la protéase fongique *Mucor pusillus* au pH égal à 5. En éloignant de ce pH, l'activité baisse jusqu'à atteindre 0, 33UP à pH de 7,6.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux rapportés par BOUJENAH-HAROUN *et al* (2011) qui ont montré un optimum d'activité au pH égal à 5,8-6 pour les extraits coagulants issus de caillette de dromadaires adulte.



**Figure 29 : Influence du pH de l'ECD A, ECD NS et PEP sur l'activité coagulante.**

La pepsine porcine est très sensible à l'augmentation de pH et son activité diminue considérablement à partir du pH 6,5 comparée à celle de la présure (ERNSTROM et WONGGT, 1983) et c'est la raison pour laquelle la pepsine porcine est employée en mélange avec la présure.

MORSLI, (1997) a montré que la cynarase de l'artichaut et la ficine de latex de figuier présentent une bonne activité coagulante jusqu'à pH 6,6 par contre, MOUZALI (2001) indique un pH optimum d'action égal à 5,2 pour l'extrait brut de cardon.

L'influence de l'acidification sur le temps de floculation résulte d'une part d'un effet sur l'activité de l'enzyme et d'autre part sur la réaction d'agrégation par suite de la diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges négatives et la libération d'ions de calcium à partir de complexes dissous et colloïdaux (RAMET, 1997).

Selon LENOIR *et al* (2006), les enzymes coagulantes d'origine animale sont inactivées à pH supérieur à 7.

ROPOSO *et al*, (2008) ont trouvé une activité coagulante optimale à pH 5,5 pour la protéase *centaurea calciptrapa*. KUMAR *et al*, (2005) ont trouvé la même valeur pour la protéase *Rhizopus oryzae*.

Selon RAMET (1985), les enzymes coagulantes de fromagerie sont des protéases à caractère acide (pHi proche de 5,5) et que la caséine Kappa présente un maximum de stabilité dans l'intervalle de pH (5-6).

Un changement du pH affecte profondément les propriétés fonctionnelles de fromage (NOEL et LEFIER, 1991). Ces changements dans les propriétés des fromages se produisent quand le pH passe de 5.4 à 4.9. Cette baisse de pH résulte de plusieurs facteurs, y compris la solubilisation de la majeure partie du phosphate de calcium colloïdal (MEHMET AK, 2003).

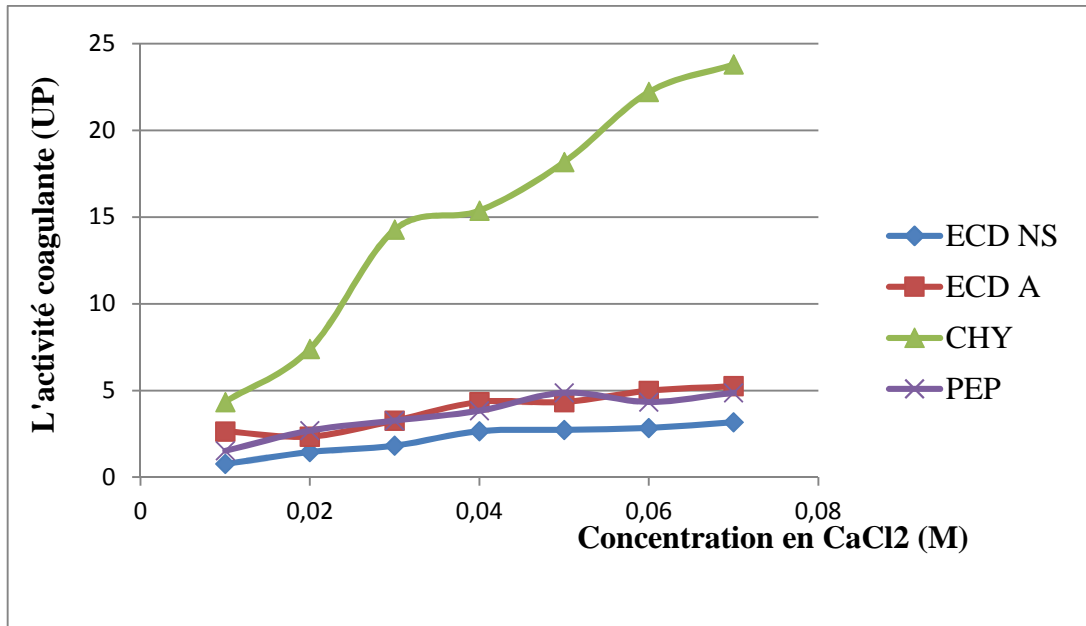
#### **2.3.4. Effet de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante des extraits coagulants**

D'après LENOIR, (1985), l'ion calcium est un activateur des protéases, il est donc indispensable pour la coagulation du lait en associant ainsi les micelles des caséines afin de former un gel plus ferme. Cette coagulation se produit par l'agrégation des molécules en présence du calcium après hydrolyse de la caséine k par la protéase coagulase.

L'évaluation de l'activité coagulante sur le substrat standard par les quatre extraits enzymatiques étudiés (ECD A, ECD NS, CHY et PEP) en fonction de la concentration en CaCl<sub>2</sub> est montrée par la figure 30.

La présure a un optimum d'activité, selon NOUANI *et al*, (2011), à 0,04M de CaCl<sub>2</sub>. Les mêmes auteurs indiquent que la protéase coagulante extraite à partir de proventricule de poulet (*GALLUS GALLUS*) possède une meilleure activité à 0,02M.

D'après GORDIN et ROSENTHAL (1977), l'activité coagulante enzymatique dépend de la concentration du CaCl<sub>2</sub>. Ce facteur, à des concentrations élevées, réduit le temps de coagulation et par conséquent augmente significativement l'activité coagulante.



**Figure 30 : Influence de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante de l'ECD A, ECD NS, CHYM et PEP.**

Nous remarquons que l'allure de la courbe est similaire pour les deux enzymes ECD A et ECD NS ainsi que pour la PEP. ECD A et la PEP représentent des activités coagulantes plus importantes par rapport à l'ECD NS pour les concentrations en allant de 0,02M à 0,07M. A 0,04M, l'activité coagulante est similaire entre les deux ECD. Pour la CHY, elle représente des activités coagulantes les plus importante par rapports à nos extraits étudiés pour les concentrations en CaCl<sub>2</sub> en allant de 0,01 à 0,07.

L'optimum d'activité pour les deux ECD est obtenu avec une concentration en CaCl<sub>2</sub> de 0,07M, avec une meilleure activité obtenue avec l'ECD A, alors que l'optimum d'activité pour la PEP est obtenu à une concentration en CaCl<sub>2</sub> de 0,07M. La CHY donne une meilleure activité coagulante à une concentration en CaCl<sub>2</sub> de 0,07M, donc cette concentration est considérée comme étant son optimum d'activité.

On observe également que l'élévation de la concentration en CaCl<sub>2</sub> est accompagnée de l'augmentation de l'activité coagulante sauf aux concentrations de 0,01 et 0,02 pour tous les extraits. En effet, de nombreux travaux montrent qu'un enrichissement en calcium ionique entraine un raccourcissement du temps de floculation et donc une élévation de l'activité coagulante (RAMET ET WEBER, 1980).

Selon NAJERA *et al*, (2003), l'addition du CaCl<sub>2</sub> réduit le pH du lait et donc accélère la réaction de l'hydrolyse. La phase secondaire semble également être influencée par la teneur

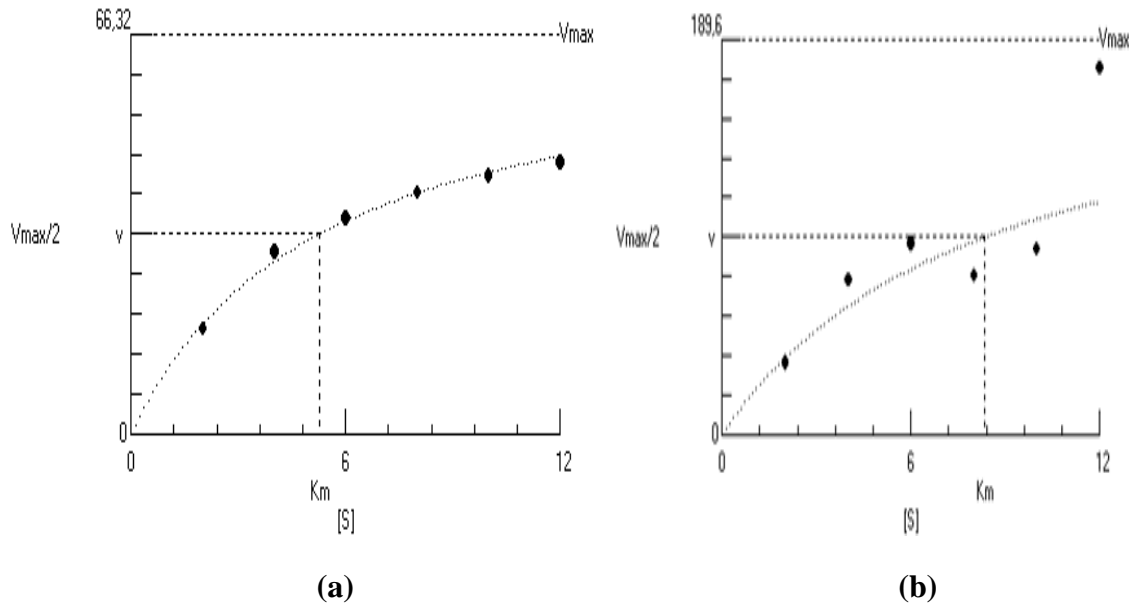
en calcium du milieu. Cet ion pourrait induire une diminution du potentiel de surface micellaire, accélérant de ce fait, la vitesse d'agrégation des particules en entraînant une augmentation de la fermeté du coagulum. L'addition du calcium (<50mM) réduit le temps de coagulation même à des valeurs de pH constantes du lait et la floculation apparaît pour une très basse hydrolyse de la caséine Kappa. Aussi, l'addition du calcium augmente la fermeté du gel présure, et ce principalement par la neutralisation de la charge négative de la surface des micelles et probablement par la formation de ponts calciques.

L'addition de forte concentration de  $\text{CaCl}_2$  (>0,1M) réduit la fermeté du gel présure probablement par l'augmentation du taux de la charge positive sur la surface des micelles. La réduction de la teneur du calcium phosphate colloïdal des micelles de caséines d'environ 30%, empêche la coagulation sauf si la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  augmente. Il apparaît que le déplacement du calcium phosphate colloïdal conduit à la rupture de la structure micellaire et d'où son incapacité à la formation du gel.

Les concentrations habituellement utilisées en technologie fromagère se situent dans l'intervalle de 0,01 à 0,02M de  $\text{CaCl}_2$ , l'extrait purifié de *Bacillus mojavensis* a une meilleure activité à cette concentration, ce qui permet leur utilisation dans ces conditions. L'influence de calcium sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été étudiée en faisant varier sa concentration dans le lait de 0,005 à 0,1 M.

#### **2.4. Les paramètres cinétiques des extraits coagulants**

Les représentations graphiques (figure 31, 32) des vitesses d'hydrolyses des ECD A et ECD NS en fonction des concentrations de caséine bovine et cameline ainsi que les vitesses de la CHY et PEP qu'on a utilisé comme témoin (annexe 04) présentent une allure michaélienne indiquant qu'il s'agit d'enzymes monomériques. Ces résultats sont similaires à ceux décrits par KUMAR *et al* (2005) qui ont obtenu une cinétique hyperbolique pour la protéase acide de *R. oryzae*.

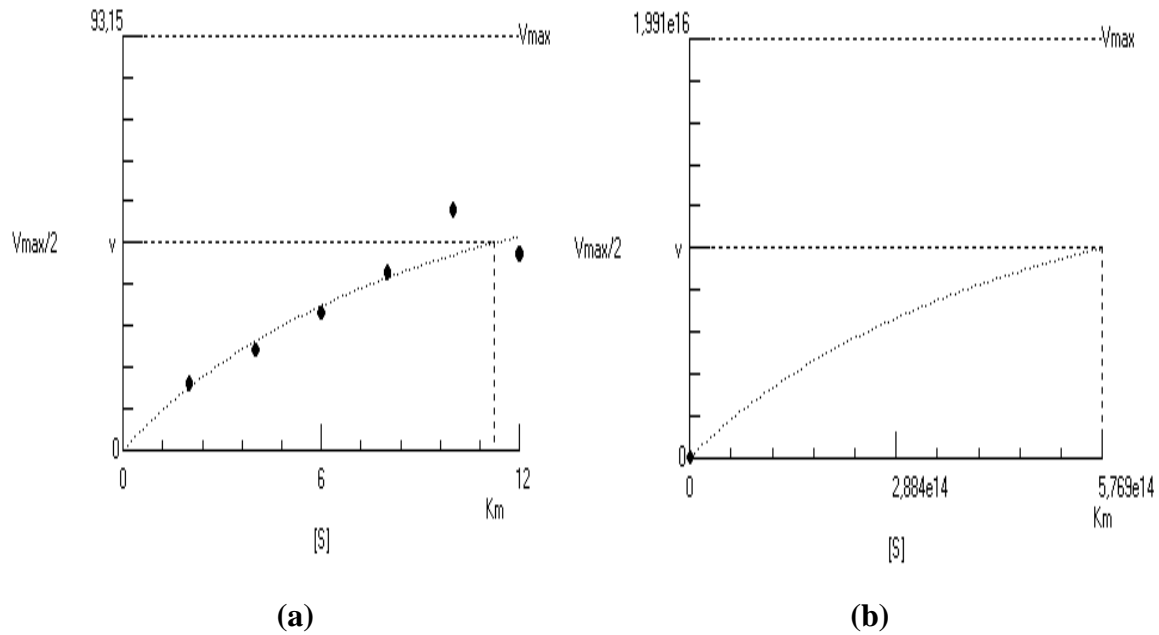


**Figure 31 : Effet de la concentration des caséines camelines (a) et des caséines bovines (b) sur l'ECD A.**

La représentation de Lineweaver et Burk (figure 33, 34) a permis d'obtenir des constantes de Michaelis ( $K_m$ ) de 5,816  $\mu\text{M}$  et 9,539  $\mu\text{M}$  et des vitesses maximales ( $V_{\text{max}}$ ) de 69,76  $\mu\text{M}/\text{min}$  et 84,34  $\mu\text{M}/\text{min}$  pour l'ECD A et l'ECD NS respectivement dans le cas où le substrat est les caséines camelines. Dans le cas où notre substrat est les caséines bovines, on a obtenue des constantes de Michaelis ( $K_m$ ) de 11,86  $\mu\text{M}$  et 23,8  $\mu\text{M}$  et des vitesses maximales ( $V_{\text{max}}$ ) de 246,7  $\mu\text{M}/\text{min}$  et 749,9  $\mu\text{M}/\text{min}$  pour l'ECD A et l'ECD NS respectivement.

D'après nos résultats, on constate que la  $K_m$  de l'ECD A et l'ECD NS dans le cas des caséines bovines est 2 fois plus grande que celle obtenue avec les caséines camelines.

On observe également que la  $K_m$  de l'ECD NS est supérieure à celle de l'ECD A dans les deux cas (bovine et cameline).



**Figure 32 : Effet de la concentration des caséines camelines (a) et des caséines bovines (b) sur l'ECD NS.**

Il est connu que  $K_m$  est une mesure de l'affinité de l'enzyme envers le substrat, où elle est inversement proportionnelle à l'affinité, plus  $K_m$  est petite plus l'enzyme a une grande affinité pour le substrat, donc la faible valeur de  $K_m$  indique une grande affinité de l'ECD A pour la caséine bovine ainsi que la caséine cameline par rapport aux résultats obtenus par d'autres auteurs pour la protéase aspartique de *R. oryzae* en utilisant le lait écrémé comme substrat (KUMAR *et al*, 2005).

Nous remarquons que la  $V_{max}$  de l'ECD A pour la caséine bovine est trois fois plus grandes que celle de l'ECD A pour les caséines cameline, et la  $V_{max}$  de l'ECD NS pour les caséines bovine est huit fois plus élevée que celle de l'ECD NS dans le cas des caséines cameline.

Par ailleurs, ces valeurs élevées de  $V_{max}$  des deux protéases indiquent leur efficacité catalytique. Un résultat similaire est aussi noté par VISHWANATHA *et al* (2009) concernant la protéase acide d'*A. oryzae*

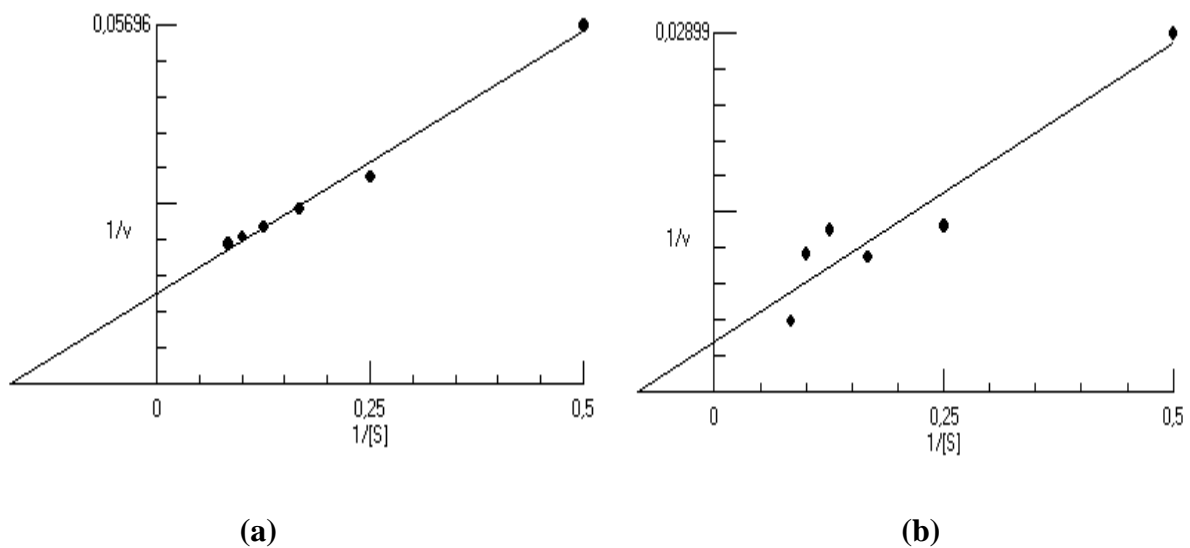
Concernant l'étude des paramètres cinétiques de la CHY et PEP, la représentation de Lineweaver et Burk (annexe 05) nous a donner des  $K_m$  de 17,76  $\mu\text{M}$  et 109,1  $\mu\text{M}$  et des  $V_{max}$  de 302,7  $\mu\text{M}/\text{min}$  et 1,437e03  $\mu\text{M}/\text{min}$  respectivement en utilisant les caséine cameline comme substrat. On a également employé les caséines bovines, on a obtenue des

Km de 0,5668  $\mu\text{M}$  et 25,82  $\mu\text{M}$  et des Vmax de 386,3  $\mu\text{M}/\text{min}$  et 787,7  $\mu\text{M}/\text{min}$  pour la CHY et PEP respectivement.

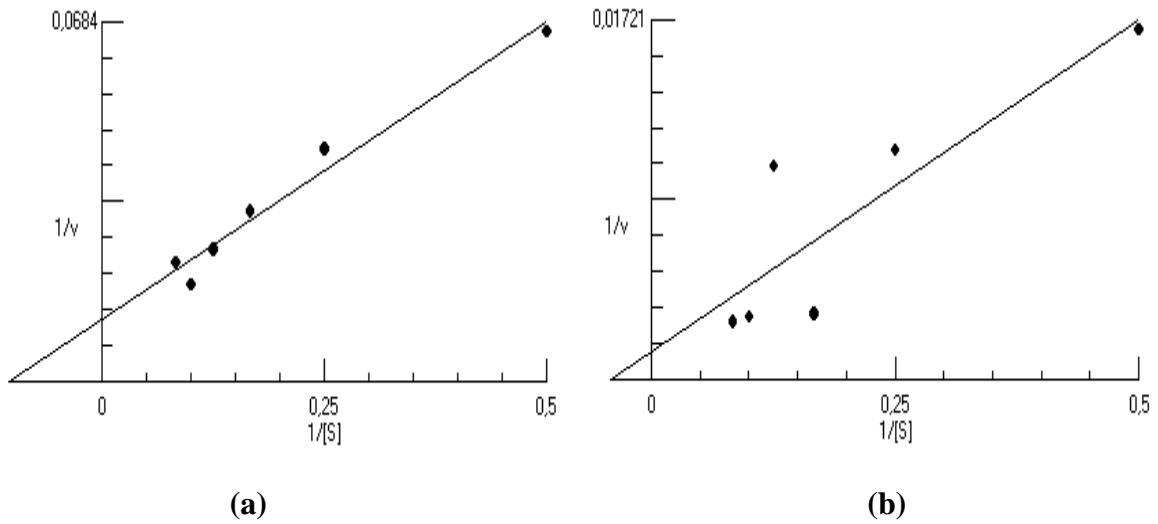
Les Km de la CHY et PEP pour les caséines bovines sont négligeables par rapport à celles obtenues avec les caséines camelines, cela indique que ces protéases représentent une grande affinité aux caséines bovines que les caséines camelines. Les Vmax de la PEP sont supérieurs à celles de la CHY pour les deux substrats différents.

La cardosine A (protéase aspartique de *Cynara cardunculus* L) s'est avérée similaire à la chymosine, en termes de paramètres cinétiques et de spécificité, par clivage de la même liaison peptidique (Phe105-Met106) de la k-caséine (CAVALLI *et al*, 2013).

La chymosine cameline recombinante possède une double affinité à la k caséines et une efficacité catalytique trois fois supérieure à celle de la chymosine bovine recombinante (KAPPELER *et al*, 2006).



**Figure 33 : La Cinétique de l'ECD A sur les caséines camelines (a) et sur les caséines bovines (b) selon la représentation de Lineweaver-Burk.**



**Figure 34 : la Cinétique de l'ECD NS sur les caséines camelines (a) et sur les caséines bovines (b) selon la représentation de Lineweaver-Burk.**

En industrie fromagère, l'utilisation des enzymes coagulante est une étape prépondérante qui conditionne pour une grande part l'obtention d'un produit dérivé répondant aux caractéristiques recherchées.

En premier lieu, nous avons effectué l'extraction des enzymes coagulantes à partir de caillettes d'un dromadaire non sevré (12mois) et d'un autre adulte (8ans) en adoptant un protocole d'isolement approprié.

On a obtenue deux préparations coagulantes brutes (ECD NS et ECD A). Ces deux derniers avaient une teneur en protéines égale à 0,9 mg/ml.

Ces préparations enzymatiques ainsi que nos témoins (PEP et CHY) ont été caractérisées par la suite par la mesure de leur activité coagulante ainsi que protéolytique, les résultats ont montrés que ont tous un bon pouvoir coagulant avec une meilleure aptitude à coaguler le lait standard pour l'ECD A et la CHY. L'activité protéolytique évaluée sur les caséines bovines et cameline était plus faible avec l'ECD NS que L'ECD A, notant un niveau de protéolyse plus élevé sur les caséines camelines.

La détermination du rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique a révélé que les ECD sont meilleurs sur les caséines bovines que les caséines cameline et que l'ECD A présente le rapport activité coagulante/activité protéolytique plus élevé pour une macération réalisée à 40°C avec ajout d'acide chlorhydrique à 0,2M.

La mesure de l'activité coagulante aux différentes conditions de température, de stabilité thermique, de pH et de concentration en CaCl<sub>2</sub>, affirme que l'activité optimale est atteinte en utilisant ces extraits à une température de 60°C, Par ailleurs, ces deux enzymes EDC A et ECD NS sont caractérisés par une activité coagulante relativement stable à 50°C et à 55°C, d'un pH optimal de 2,2 et d'une concentration de CaCl<sub>2</sub> égale à 0,07M.

Parmi les deux substrats testés sur les extraits : les caséines bovines et les caséines camelines. L'étude cinétique enzymatique selon Lineweaver et Burk a donné des vitesses maximales (V<sub>max</sub>) de 246,7 μM /min et 749,9 μM /min et des constantes michaeliennes (K<sub>m</sub>) de 11,86 μM et 23,8 μM pour l'ECD A et l'ECD NS respectivement. La forme hyperbolique des deux courbes de cinétiques indique que ces enzymes sont de nature michaelienne et donc monomérique.

L'amélioration des aptitudes à la coagulation du lait camelin permettent d'entrevoir des perspectives intéressantes :

\*L'incorporation de ces extraits dans la fabrication du fromage en utilisant le lait camelin, bovin et le mélange des deux à différentes proportions. Les fromages obtenus seront évalués selon le plan de leurs rendements et leurs qualités organoleptiques.

\*La purification de l'enzyme.

\*Un contrôle électro-phorétique.

\*Utilisation d'un lait camelin pour effectuer la même étude, et les résultats seront comparés à ceux obtenus avec le lait bovin.

**ABDELLAOUI R. (2007).** Obtention et caractérisation d'une Enzyme Coagulant le lait D'aspergillus Niger Isole au Sol de la région de Boumerdès. Thèse de Magister en génie Alimentaires. Faculté des Sciences de l'Ingénieur. Université de Boumerdès. 96 p.

**ABDULSALAM M.N. and SHAKER K. A. (2013).** Using of recombinant camel chymosin in producing soft cheese from camel milk. *Euphrates Journal of Agriculture Science*, 5 (2), 176-183.

**ABUHARFEEL N.M. and ABUEREISH G.M. (1984).** Isolation and characterization of Camel Pepsins. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 77(11), 175-182.

**AL JASSIM R. and HOGAN J. (2013).** Camel Nutrition for Meat Production; in: "Camel Meat and Meat Products" ed CABI, India.

**ALAIS C. (1984).** Science du lait ; Principe des Techniques Laitières. SEPAIC, Paris.

**ALAIS C. et MULTON C. (1963).** Etude de la sécrétion d'enzyme coagulant dans la caillette de l'agneau. *Annales de biologie animale, Biochimie, Biophysique*, 3 (1), 65-70.

**AL-MZAIEN K.A. (2007).** Extraction, purification and characterization of camel pepsin (Camelus dromedarius). *Iraqi. J. Biotech.*, 6(2), 64-76.

**AMIOT J., FOURNIER F., LEBEUF Y., PAQUIN P et SIMPSON R. (2002).** Composition, Propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique . du lait Dans : Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses Polytechnique, Montréal, p.1-73.

**ANDREEVA N.S. and RUMSH L.D. (2001).** Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein. Sci.*, 10, 2439–2450.

**ANDREN A. (2002).** Production of prochymosin, pepsinogen and progastricsin and their cellular and intracellular localization in bovine abomasal mucosa. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 54 (Suppl. 210), 59–64.

.

**ANONYME 01** : [http://www.fao.org/dairy-production-products/products/la-composition-du-lait/fr/Dairy Sci.](http://www.fao.org/dairy-production-products/products/la-composition-du-lait/fr/Dairy%20Sci.,%2084(5),%201020-1026), 84(5), 1020–1026.

**ANONYME 02** : [fromages-xavier.com](http://fromages-xavier.com)

**ATTALLAH A.G. (2007)**. Characters of chymosine gene isolated from different animal sources at molecular level. *J. Appl. Sci. Res.*, 3 (9), 904-907.

**BAH S, PAULSEN B.S., DIALLO D., JOHANSEN H. T., (2006)**. Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*; 107:189–198.

**BANSAL N., DRAKE M.A., PIRAINO P., BROE M.L., HARBOE M., FOX P.F. and MCSWEENEY P.L.H. (2009)**. Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*, 19, 510–517.

**BARABANO D.M. and RASMUSSEN R.R. (1992)**. Cheese yield performance of fermentation produced chymosin and other milk coagulants. *J. Dairy Sci.*, 75 :1.

**BAUDYŠ M., ERDENE T.G., KOSTKA V., PAVLÍK M. and FOLTMANN B. (1988)**. Comparison between prochymosin and pepsinogen from lamb and calf. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89, 385-391.

**BECHIR D. (1983)**. L'élevage du dromadaire au Maghreb ; Thèse de Doctorat vétérinaire *Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort* ; n°101 :98p.

**BELHAMICHE N. (2005)**. Extraction, purification et caractérisation de la coagulase de *Mucor pusillus*. Mémoire Mag. Sces. agro., Inst. Nat. Agro., El-Harrach, 57 p.

**BENGOUMI M., FAYE B. et TRESSOL J-C. (1994)**. Composition minérale du lait de chamelle du sud marocain. Actes du colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26- octobre, Nouakchott, Mauritanie.

**BENYOUCEF Y. et TAOUZINET A. (2016)**. Obtention et caractérisation d'une protéase coagulante de *Penicillium sp.* Mémoire de fin de cycle en vue d'obtention du diplôme de master en Sciences biologiques, Université de A. Mira- Bejaia, Algérie.

**BERRIDGE N. J. (1945)**. The purification and crystallization of rennin. *Biochemic Journal*, 39, 179-186.

**BERRY A.C., HUMPHREYSA M.J., MATHARUA P., GRANGERA R., HORROCKSB P., MOONC R.P., CERTAC U., RIDLEYC R.G., BURC D. et KAYA J. (1999).** A distinct member of the aspartic proteinase gene family from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *FEBS Letters*, 447 (2-3), 149-154.

**BOTHAM K.M., WEIL A., RODWELL V.W., KENNELLY P.J. et BENDER D.A. (2017).** *Biochimie de Harper*. De Boeck Supérieur, 6ème éd., NOTO, Paris et Bruxelles, p 64.

**BOUDJENAH H.S. (2012).** Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : Effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires. Thèse de doctorat en sciences biologiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou (Algérie).

**BOUDJENAH-HAROUN S., LALEYE C.L., MOULTI-MATI F., SI AHMED S., MAHBOUB N., SIBOUKEUR O. and MATI A. (2011).** Comparative study of milk clotting activity of crude gastric enzymes extrated from camels' abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk. *Emir. J. Food Agric.*, 23 (4), 301-310.

**BOUDJENAH-HAROUN S., SOUID W., BALLA A., SENOUSSI C., ALMI D ., SI AHMED S. et MATI A. (2014).** Coagulating bovine milk with enzymes extarcted from camel milk. *Livestock Research or Rural development*, 26 (3).

**BRUNO MA., TREJO SA., AVILES XF., CAFFINI NO., LOPEZ LMI., (2006).** Isolation and characterization of hyeronymain II, another peptidase isolated from fruits of *BromeliahieronymiMez* (Bromeliaceae). *Prot J.* 25: 224–231.

**CAVALLI SV., LUFRANO D., COLOMBO M.L et PRIOLO N. (2013).** Propriétés et applications des phytepsines des fleurs de chardon. *Phytochemistry*, 92, 16–32.

**CHAÏBOU M., (2005)** : Productivité zootechnique du désert : le cas du bassin laitier d'Agadez au Niger. Thèse Doc. Montpellier II : CIRAD-EMVT. 301 pages.

**CHAOUI-KHEROUATOUI N. et ATTIA H. (2008).** Etude comparative des caséines camelines (*camelus dromedarius*) et bovines. *Sciences et Technologie*, 28, 73-79.

**CHAZARRA S., SIDRACH L., LOPEZ-MOLINA D. and RODRIGUEZ-LOPEZ J.N. (2007).** Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, **17**, 1393–1400.

**CHEN H., ZHANG G., ZHANG Y., DONG Y. and YANG K. (2000).** Functional implications of disulfide bond, Cys206- Cys210, in recombinant prochymosin (chymosin). *Biochem.*, **39**, 12140–12148.

**CHITPINITYOL S. and CRABBE M.J.C. (1998).** Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem.*, **61** (4), 395-418.

**COLLIN J.C., GRAPPIN R. et LEGREAT Y. (1977).** Etude de la méthode de mesure, selon BERRIDGE, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Revue Laitière Française*, **355**, 389-394.

**CORRERA A. (2006).** Thèse de doctorat en écologie et gestion de la biodiversité. Muséum national d'histoire naturelle Paris.

**CULLEN D., GRAY G.L., WILSON L.J., HAYENGA K.J., LAMSA M.H., REY M.W., NORTON S. and BERKA R.M. (1987).** Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus Nidulans*. *BioTechnology*, **5**, 369–376.

**DAIRY GATEWAY, FAO (2017),** site internet : « faostat »- site officiel des statistiques agricoles de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/la-composition-du-lait/fr/>.

**DALGLEISH D.G. (1997).** The enzymatic coagulation of milk In: «Advanced in Dairy Chemistry proteins» ed., P.F.Fox, Blackie and Son Ltd, Scotland.

**DAVIES D.R. (1990).** The structure and function of aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **19**, 189-215.

**DYBOWSKA E. et FUJIO Y. (1996).** Effect of temperature and gluconod-lactose (GDL) concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical methode. *Milchwissenschaft*, **51**, 557-560.

**ECK A. et GILLIS J.C. (1997).** Les Enzymes D'origine Animale : Le Fromage De La Science A L'assurance Qualité, 3ème Edition, Lavoisier Tec & Doc. Paris.

**EIGEL W.N., BUTTER J.E., ERNSTROM C.A., FARRELL J.R., HARWALKAR V.R., JENNESS R. et MC WHITNEY L.R. (1984).** Nomenclature of proteins of cow's milk ; fifty revision. *J. Dairy Sci.*, 67, 1599-1631.

**ELAGAMY E.I. (2000).** Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: a comparison with buffalo rennet. *J. Dairy Res.*, 67, 73-81.

**EL-BENDARY, M., MOHARAM, M., & ALI, T. (2007).** Purification and characterization of milk clotting enzyme produced by *Bacillus sphaericus*. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(8), 695–699.

**EL-ZUBEIR, L.E.M. AND JABREEL. M.S.O. (2008).** Fresh cheese from camel milk coagulated with Camioc. *Int. J. Dairy Technol.*. 61 :90.

**EMA A.N. and TULPULE S. S. (1980).** Some observations on the gross anatomy and histology of the one-humped camel (*camelus dromedarius*). *Gastrointestinal studies. Anatomy Histology and Embryology*, 9, p. 180.

**EMTAGE J. S., ANGAL S., DOEL, M. T., HARRIS T. J.R., JENKINS, B., LILLEY G. and LOWE P. A. (1983).** Synthesis of calf prochymosin (prorennin). *Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci.*, 80, 3671–3675.

**ERNSTROM C.A. and WONGT N.P. (1983).** Milk clotting enzymes and cheese chemistry; In : “Fundamentals on dairy chemistry” ed. B.H. Webb, A.H.Johnson and J.A. Alfold, 2ndéd., the Avi publishing Company Incorporated, New York.

**ESKANDARI M. H., HOSSEINI A., ALASVAND ZAVASVAND S. et AMINLARI M. (2012).** Cloning, Expression, Purification and Refolding of Caprine Prochymosin. *Food Biotechnology*, 26(2), 143-153.

**FAO,** site internet : « faostat »- site officiel des statistiques agricoles de L'ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULT.

**FARAH Z. (1993).** Composition and Characteristics of Camel Milk ; review. *J. Dairy Res.*, 60, 603-626.

**FARRELL H.M. JR. JIMENEZ-FLORES R., BLECK G.T., BROWN E.M., BUTLER J.E., CREAMER L.K., HICKS C.L., HOLLAR C.M., NG-KWAI-HANG K .F. and SWAISGOOD H.E. (2004).** Nomenclature of the proteins of cows' milk sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 87, 1641–1674.

**FAYE B. (1997).** Guide de l'élevage du dromadaire. Edition CIRADEMVT, Montpellier, 126 p.

**FAYE B. (2008).** Performances et productivité laitière de la chamelle : les données de la littérature Actes de l'Atelier International sur : lait de chamelle pour l'Afrique, 5-8 novembre Niamey, Niger.

**FAYE B. (2014).** The camel today : asserts and potentiels. *Anthropozoologica*, 49(2), 167-176.

**FERNANI L. (2002).** Obtention et caractérisation d'une protease coagulant le lait à partir de gain de melon *cucumis melon* .Thèse magister .univ.Boumerdes (Algérie).

**FOLTMANN B., PEDERSEN V.B., JACOBSEN H., KAUFFMANT D. and WYBRANDTF G. (1977).** The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74, 2321-2324.

**FOX P.F. and MCSWEENEY P.L.H. (1997).** Rennets: Their Role In Milk Coagulation And Cheese Ripening; In *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2nd edn., Law B A, ed. London: Chapman & Hall. 1–49.

**FOX P.F., GUINEE T.P., COGAN T.M., and MCSWEENEY P.L.H. (2000).** Chemistry Of Milk Constituents; In *Fundamentals of Cheese Science*, Aspen Publishers, Gaithersburg, MD. 19-44.

**GALLOUIN F.M. and FOCANT (1980).** Bases physiologiques du comportement alimentaire chez les ruminants. *reprod. nutr. Develop.*, 20 (5B), 1563-1614..

**GILLILAND G.L., WINBORNE E.L., NACHMAN J., WLODAWER A. (1990).** The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, 8, 82-101.

**GOFF C.G., MOIR D.T., KOHNO T., GRAVIUS T.C., SMITH R.S., YAMASAKI E. and TAUNTON-RIGBY A. (1984).** Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 27, 35–46.

**GORDIN S. et ROSENTHAL I. (1977).** Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *Journal of food protection* September Vol. 41 N° 9. 684-688.

**GOURSEAUD J. (1999).** Réacteurs enzymatiques à enzymes libres et à enzymes immobilisées, cas de l'industrie laitière : coagulation enzymatique du lait ; in : « Biotechnologie » ed. Scriban R, Technique et Documentation, 5ème éd., Lavoisier, Paris.

**GOVINDASAMY-LUCEY S., LU Y., JAEGGI J.J., JOHNSON M.E. and LUCEY J.A. (2010).** Impact of camel chymosin on the texture and sensory properties of low-fat cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Tech.*, 65(3), 139-142.

**GREEN M.L. ET STACKPOOLE A. (1975).** 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.

**GUERARD F. (1987).** Une utilisation des enzymes protéolytiques extraites des viscères de poissons : La coagulation du lait. *Rev. Trav. Inst.Pêches marit.*, 49 ,p. 199-203.

**HAMBRAEUS L. ( 1982).** Nutritional aspects of milk proteins. Chapitre 9. In P. F. FOX, *Developments in dairy chemistry*, 289-313, Applied Sci. Publ., London and New-York.

**HAMIDI M. (2015).** Etudes des propriétés fonctionnelles et des aptitudes à la coagulation du lait de dromadaire par la couche de kaolin du gésier des poules. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques, Université Mohamed Khider - Biskra, Algérie.

**HATTEM H. E., HASSABO R. M., SALEH A. E. et MOUSSA M. A. (2017).** A study of milk clotting activity of crude gastric rennet extracted from camel's abomasum at different ages. *Journal of Agricultural Research*, 95 (3), 1299-1309.

**HESSAS I. (2001).** Contribution à l'amélioration de l'aptitude technologique de lait camelin : Effet de l'utilisation d'un extrait stomacale de dromadaire sur le temps de floculation. Thèse d'Ingénieur, Institut d'Agronomie Sahararienne, Université de Ouargla, Algérie.

**HILL R.J. et WAKE R.G. (1969).** Amphiphile nature of k-casein as the basis for its micelle stabilizing property. *Nature*, 221, 635-639.

**IBRAHIM. A. H. , Khalifa. S. A and Samah M.S. El-Shafeiii, (2018).** Effect of recombinant camel chymosin on the physiochemical, rheological and sensory characteristics of soft cheese (DOMIATI TYPE) made from camel's milk : *Food Science ; 120*, 97-101.  
*International Journal of Dairy Technology*. 56: 76-85.

**JAMES M.N.G. and SIELECKI A.R. (1986).** Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature*, 319, 33-38.

**JEANTET R. (2007).** Science des aliments : biochimie, microbiologie, procédés, produits. Paris, Lavoisier, 456 p.

**JENSEN L.J., MØLGAARD A., POULSEN J.C.N., HARBOE M.K., SIMONSEN J.B., LORENTZEN A.M., HJERNØ K., VAN DEN BRINK J.M., QVIST K.B. and LARSEN S. (2013).** Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Cryst.*, 69, 901–913.

**KADIM I.T., MAKGOUB O. et PURCHAS R.W. (2008).** A review of the growth, and of the carcass and meat quality characteristics of the one-humped camel (*Camelus dromedaries*). *Meat Science*, 80(3), 555-569.

**KAGEYAMA T. (2002).** Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: Structure, function, evolution, and development. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59, 288-306.

**KAPPELER S., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998).** Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *J. Dairy Res.*, 65, 206-222.

**KAPPELER S.R., VAN DEN BRINK H.M., RAHBECK-NIELSEN H., FARAH Z., PUHAN Z., BECH HANSEN E. and JOHANSEN E. (2006).** Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, 647–654.

**KHAN H., HUSSAIN ATHAR I. AND ASLAM M. (2004).** Evaluation of cheese prepared by processing camel milk. *Pakistan J. Zool.*, 36: 323.

**KUMAR A., GROVER S., SHARMA J. and BATISH V.K. (2010).** Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 30(4), 243-58.

**KUMAR S., SHARMA N. S., SAHARAN M. R., & SINGH R. (2005).** Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40(5), 1701–1705.

**LENOIR J., REMEUF, ET SCHNEID N. (1985).** Le lait de fromagerie. In : « le fromage » éd. Eck A. Et Gillis J.C. Le fromage de la science à l'assurance- qualité. Tec. Et Doc, 3eme éd. Lavoisier, Paris.

**LENOIR J., REMEUF, ET SCHNEID N. (2006).** Le lait de fromagerie. In : « le fromage » éd. Eck. Et Gillis... Tec. Et Doc, 3ème éd. Lavoisier, Paris.

**LOWRY O H ROSENBROUGH N.J., FARR A.I. et RANDALL R.J. (1951).** Protein measurement with the Follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, N°193 : 265- 275.

**LUCEY J. K. (2002).** Rennet coagulation of milk. In *Encyclopedia of Dairy Science* (Elsevier). New York.

**MACHALINSKI C., PIRPIGNANI M.L, MARINO C., MANTEGAZZA A. et DE JIMENEZ BONINO M.B. (2006).** Structural aspect of *Mucor bacilliformis* proteinase, a new member of the aspartyl-proteinase family. *Journal of biotechnology*, 123, 443-452.

**MADR, (2007).** Ministère d'Agriculture et Développement Rural. Statistiques agricoles. Série B 2006 -2007.

**MAHAUT M., JEANTER R. ET BRULE G. (2005).** Initiation a la technologie fromagère. Tec & Doc, Paris, France. 1-21.

**MAHAUT M., JEANTET R., BRULE G. and SCHUCK P. (2000).** Les produits industriels laitiers. Tec and Doc, Paris, France, p 41.

**MARTIN P. (1984).** Hydrolysis of the synthetic chromophoric hexapeptide Leu-Ser Phe(NO<sub>2</sub>)-Nle-Ala-Leu-Ome catalyzed by bovine pepsin A. *Biochim. Biophys. Acta*, 791, 28-36.

**MATOUB L. (2000).** Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Mémoire de Magister. Science alimentaire. I.N.A.El-Harach.

**MEHAIA M.A. and ALKANHAL M.A. (1992).** Taurine and free amino acids in milk camel, goat, cow and man. *Milchwissenschaft*, 47, 351-353.

**MEHAIA. M.A. (1993).** Fresh soft cheese (Domiaty type) from camel milk: composition, yield and sensory evaluation. *J. Dairy Sci.*, 76: 2845.

**MELLOR J., DOBSON M.J., ROBERTS N.A., TUIE M.F., EMTAGE J.S., WHITE S., LOWE P.A., PATEL T., KINGSMAN A.J. and KINGSMAN S.M. (1983).** Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene*, 24, 1–14.

**MERHEB-DINI, C., GOMES, E., BOSCOLO, M., & DA SILVA, R. (2010).** Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chemistry*, 120(1), 87–93.

**MOHANTY A.K., MUKHOPADHYAY U.K., GROVER S. and BATISH V.K. (1999).** Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol. Adv.* 17 205–217.

**MORSLI A. (1997).** Recherche sur les activités protéiques des extraits de cynara scolymus , du latex de ficus caricae et du proventricule de Gallus gallus en vue de leur utilisation en technologie fromagère .Thèse magister.I.N.A. El Harrach:Alger (Algérie).

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

**MOYNIHAN A.C., GOVINDASAMY-LUCEY S., JAEGGI J.J., JOHNSON M.E., LUCEY J.A. AND MCSWEENEY P.L.H. (2014).** Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 97, 85–96.

**NÁJERA DE RENOBALLES M. and BARRONA L.J.R. (2003).** Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk : a multifactorial study. *Food Chem.*, 80, 345–352.

**NEWMAN M., SAFRO M., FRAZAO C., KHAN G., ZDANOV A., TICKLE I.J., BLUNDELL T.L. and ANDREEVA N. (1991).** X-ray analysis of aspartic proteinases IV. Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. *J. Mol. Biol.*, 221, 1295-1309.

**NOSEDA D.G., RECUPERO M.N., BLASCO M., ORTIZ G.O. and GALVAGNO M.A. (2013).** Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter. *Protein Express. Purif.*, 92, 235–244.

**NOUANI A. (2009).** Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait. Diplôme de doctorat en sciences agronomiques, ECOLE NATIONAL SUPERIEURE AGRONOMIQUE – EL- HARRACH, Algérie.

**NOUANI A., MOULTI-MATI F., BELBRAOUT S. and BELLAL M.M. (2011).** Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor pusillus* : method comparison. *African Journal of Biotechnology*, 10 (9), 1655-1665.

**OCHIRKHUYAG B., CHOBERT J.M., DALGALARRONDO M., CHOISET Y. et HAERTLE T. (1997).** Characterization of casein from mongolian Yak, khainak and bactrian camel. *Lait*, 77, 601-613.

**PARRIS K.D., HOOVER D.J., DAMON D.B. and DAVIES D.R. (1992).** Synthesis and crystallographic analysis of two rhizopuspepsin inhibitor complexes. *Biochemistry*, 31, 8125–8141.

**PEARL L. and BLUNDELL T.L. (1984).** The active site of aspartic proteinases. *FEBS Letts.*, 174, 96-101.

**PELMONT J. (1993).** Les enzymes. Presses Universitaires de Grenoble, Collection Grenoble Sciences, p 605.

**POLAINA J. et MACCABE A.P. (2007).** Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications. Springer. Netherlands.

**PRETHA S. ET BOOPATHY R. (1997).** Purification and characterisation of milk clotting proteases from *Rhizomucor miehei*. *W.J.Microb. Bio.* 13, 5,573-578.

**RAMET J.P. (1985).** Study of Enzymatic Coagulation of Camel Milk in Saudia-Arabia. Mission Report, FAO.

**RAMET J.P. (1993).** La Technologie des Fromages au Lait de Dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude FAO, production et santé animale, 113, Rome.

**RAMET J.P. (1997).** Les agents de la transformation du lait ; in : « Le fromage » éd. Eck et Gillis. Technique et Documentation, 3ème éd., Lavoisier, Paris.

**RAMET J.P. et WEBER F. (1980).** Contribution à l'étude de l'influence des facteurs du milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué, 60, 1-13.

**RAMET, J.P. (1987).** Production de fromages à partir de lait de chamelle en Tunisie. FAO, Rome. p. 1-33.

**RAMPILLI M., LARSEN R. and HARBOE M. (2005).** Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *Int. Dairy J.*, 15, 1130-1137.

**RICHTER C., TANAKA T. and YADA R.Y. (1998).** Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases : pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem. J.*, 335, 481-490.

**ROGELI I., PERKO B., FRANCKY A., PENCA V. and PUNGERCAR J. (2001).** Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. *J. Dairy Sci.*, 84(5), 1020-1026.

**ROPOSO S., DOMINGOS A. (2008).** Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *centaurea calcitrapacelsuspension* cultures .*Process Biochemistry*.43:139-144.

**ROSEIRO L.B., BARBOSA M., M AMES J. et WILBEY R.A., (2003).** Cheesemaking with vegetable coagulants the use of *CynaraL.* for the production of ovine milk cheeses.

**SAIMA 1., ARAIN, M. A., KHASKHELI M. AND MALIK A.H. (2003).** Study on the effect of processing on the chemical quality of soft unripened cheese made from camel milk. *Pakistan J. Nutr.*, 2 : 102.

**SAWAYA W. H., KHALIL J.K, AL-SHALHAT A. et AL-MOHAMMAD H. (1989).** Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *J.Food Sci.*, 49, 744-747.

**SCHMIDT D.G. (1982).** Association of caseins and casein micelle structure. In *Developments of Dairy Chemistry-1. Proteins.* Applied Science Publishers, London and New York.

**SCHMIDT, D.G. (1980).** Colloïdal aspects of casein. *Neth. Milk Dairy J.* 34 : 42.

SIBOUKEUR O. (2007). Etude du lait camelin collecté localement : Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques, aptitude à la coagulation ., thèse de doctorat en science agronomique., INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE EL-HARACH –ALGER.

**SIBOUKEUR O., MATI A. et HESSAS B. (2005).** Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camelin (*Camelus dromedarius* ) : utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. *Cahiers agricultures*, 5, 473-478.

**SOMKUTI G.A ET BABEL F.J. (1968).** Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. *J. Bact.*, 95 (4): 1407 – 1414.

**SUGUNA K., PADLAN E.A., SMITH K.W., CARLSON W.D. and DAVIES D.R. (1987).** Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: Implications for a mechanism of action. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84, 7009–7013.

**TAHA N.M. and KIELWEIN G. (1990).** Pattern of peptide-bound and free amino-acids in camel, buffalo and ass milk. *Milchwissenschaft*, 45, 22-25.

**TANG G., JAMES M.N.G., HSU I.H., JENKINS J.A. and BLUNDEL L. (1978).** Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteinases. *Nature*, 271, 618–621.

**TANG J., SEPULVEDA P., MARCINISZYN J., CHEN K.C.S., HUANG W-Y., TAO N., LIU D. and LANIER J.P. (1973).** Amino-acid sequence of porcine pepsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70, 3437-3439.

**TROCHE T., LEFEBURE R., BEATEN V., COLINET F., GENGLER N. et SINDIC M. (2017).** Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 21 (4), 276-287.

**TSUCHIYA K., GOMI K., KITAMOTO K., KUMAGAI C. and TAMURA G. (1993).** Secretion of calf chymosine from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 327–332.

**TUBESHA Z .A. and AL-DELAIMY K.S. (2003).** Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolated of *Mucor*. *International Journal of Dairy Technology*, 56(4), 237-241.

**VALLEJO J.A., AGEITOS J.M., POZA M. and VILLA T.G. (2012).** A comparative analysis of recombinant chymosins. *J. Dairy Sci.*, 95, 609–613.

**VALLES E. et FURET J.P. (1977).** Etudes des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine ; methods d'extraction. *Lait*, 601-617.

**VEERAPANDIAN B., COOPER J.B., SALI A., BLUNDELL T.L., ROSATI R.L., VEGA-HERNÁNDEZ M.C., GÓMEZ-COELLO A., VILLAR J. and CLAVERIEMARTÍN F. (2004).** Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. *J. Biotechnol.*, 114, 69-79.

**VISHWANATHA, K. S., APPU RAO, A. G., & SINGH, S. A. (2009).** Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114(2), 402–407.

**VOET D. et VOET J.G. (2016).** *Biochimie. De Boeck Superieur*, 3éme éd., NOTO, Paris et Bruxelles, p 546-549.

**WILSON, R.T. (1998).** *The Tropical Agriculturalist: Camels*. Macmilan Education Ltd. London and Basingstoke.

## Annexe 1 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951).

### 1. Solutions

#### Solution alcaline A

- Soude 0,1N..... 100 mL
- Carbonate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)..... 2 g

#### Solution cuivrique B

- CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O (0,1 g/20 ml).....2 ml
- Tartrate double de Na et K (0,2 g/20 ml).....2 ml

#### Solution C

- Solution A.....100 ml
- Solution B.....2 ml

#### Solution mère de BSA

- BSA.....5 mg
- Eau distillée.....50 ml

#### Gamme étalon

A partir de la solution mère de BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

<b>Concentration en BSA (µg/ml)</b>	0	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<b>Solution mère de BSA (µl)</b>	0	100	150	200	250	300	350	400	450	500
<b>Eau distillée (µl)</b>	500	400	350	300	250	200	150	100	50	0

## 2. Méthode

-1ml d'échantillon contenant 50  $\mu$ g de protéine maximum ;

-ajouter 2,5 ml de la solution C et mélanger ;

-laisser 10 min à température ambiante ;

-ajouter 250  $\mu$ l ml de réactif de Folin-Ciocalteu ;

-laisser 30 min à l'obscurité et ;

-lire la DO à 750nm.

## 3. Expression des résultats

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentrations en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparées et sur l'axe des ordonnées, les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration en protéine inconnue X, est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

## Annexe 2 : Mesure de l'activité protéolytique par la méthode de GREEN et STACKPOOLE (1975).

### 1. Préparation de la solution tampon phosphate

**Solution A** : phosphate mono potassique

9,07 g/l ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

**Solution B** : phosphate dissodique

11,86 g/l ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ).

Pour avoir une solution tampon à pH= 5,5 mélanger :

97,3 ml de A + (100-97,3) de B.

## **2. Condition d'hydrolyse**

1,250 ml de la solution de caséine à 2% dans 0,125 ml du tampon phosphate (pH= 5,5) est additionné à 0,5 ml d'extrait enzymatique dilué. Le mélange réactionnel ainsi préparé est incubé pendant 1h à 40°C.

Après incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 2,5 ml de solution trichloacétique (TCA) à 12% (P/V). Après 20 minutes de repos dans de l'eau froide, il se forme un précipité blanc que l'on sépare par centrifugation à 3500g pendant 8 minutes à 4°C.

## **3. Préparation de l'échantillon**

A 0,5 ml de filtrat (surnageant obtenu) sont additionnés 2,5 ml de la solution C et bien mélangé à l'aide d'un vortex bien pendant 10 minutes. Dans chaque tube, on ajoute 250 µl de réactif Folin-ciocalteu et on agite immédiatement. On laisse à l'obscurité pendant 30minutes.

## **4. Préparation du témoin**

A 1,250 ml de la solution caséinique à 2% sont additionnés 2,5 ml de TCA à 12% (pour arrêter la réaction enzymatique) puis 0,5 ml de l'extrait enzymatique dilué. Le mélange ainsi préparé est traité de la même façon que précédemment.

## **5. Courbe étalon de tyrosine**

**Solution étalon :** tyrosine à raison de 100µg/ml dans une solution tampon phosphate.

**Gamme étalon :** des solutions diluées de concentrations croissantes : 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/ml sont préparées à partir de la solution étalon.

**Dosage :** méthode de LOWRY (annexe).

**Annexe 3 : Etude statistique appliquant l'ANOVA pour la révélation d'une différence significative de l'activité coagulante entre les différents échantillons en utilisant le logiciel STATISTICA.**

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	P
ord. origine	74,38224	1	74,38224	60720,20	0,000016
extrait	33,83715	5	6,76743	5524,43	0,000181
Erreur	0,00245	2	0,00122		

Pour mettre en évidence la présence d'une différence significative de l'activité coagulante entre les échantillons étudiés, on suit quelques étapes qui sont les suivantes :

-détermination des variables (qualitative : les quatre échantillons, quantitative : AC) ;

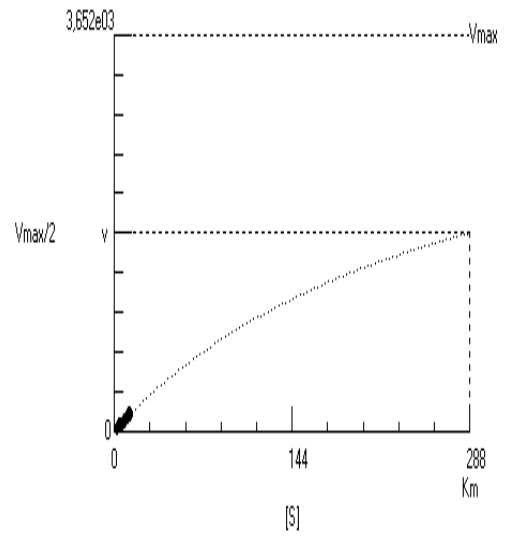
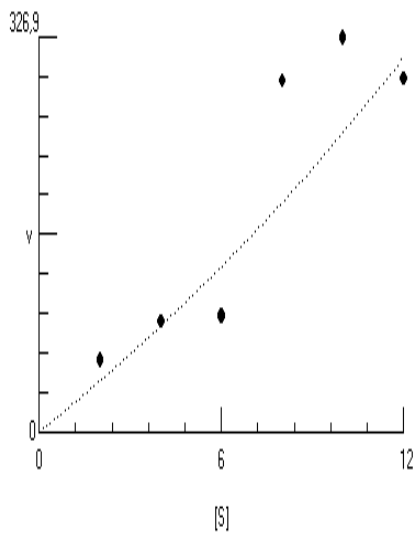
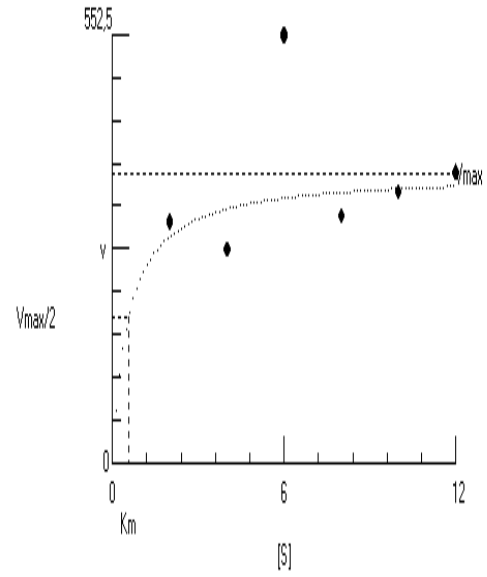
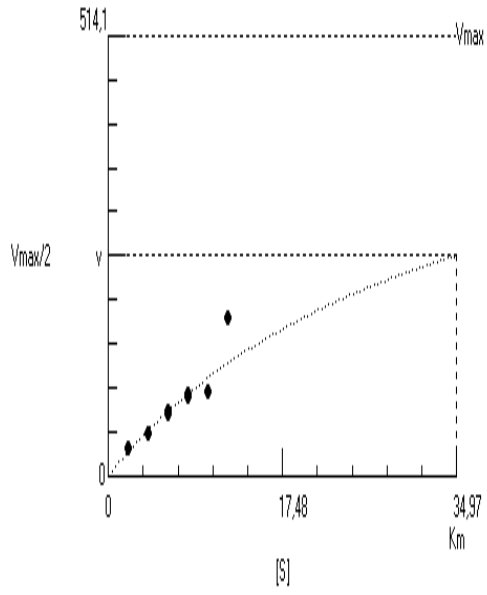
-un test de normalité est appliqué, en utilisant Ks ou Shapiro où la Pvalue (valeur de probabilité) doit être  $>5\%$  ;

-Pvalue  $> 5\%$ , donc on applique les tests paramétriques : ANOVA à un seul facteur (vu que on possède plusieurs échantillons pour une seule variable qualitative) ;

-deux hypothèses sont supposées  $H_0$  où l'activité est la même pour tous les échantillons et une  $H_1$  où ces dernières sont différentes de l'échantillon à un autre.

- $H_0$  est rejetée, donc les activités sont différentes, ce qui confirme qu'y a une différence significative.

**Annexe 4 : Effet de la concentration des caséines bovines et les caséines camelines sur la CHY et PEP respectivement.**



**Annexe 5 : Détermination des paramètres cinétiques de la CHY et la PEP pour les caséines bovines et camelines respectivement selon la représentation de Lineweaver-Burk.**

