

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE Ministère de  
l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Université Mouloud  
Mammeri de Tizi-Ouzou



**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**  
**Département de Biochimie-Microbiologie**

## Mémoire de fin d'études

**En vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Spécialité : Biochimie appliquée**

### Thème

**Utilisation de l'extrait de caillettes de dromadaires  
adultes dans la fabrication d'un fromage à pâte molle  
type Camembert et suivi des paramètres physico-  
chimiques durant l'affinage.**

**Présenté par :**

**OUAZAR Lyna et OUMATOUK Lila.**

Devant le jury :

<b>M<sup>me</sup> ISSELNANE-TAMACHE S.</b>	Maître assistante A	Promotrice
<b>M<sup>me</sup> DERMECHE S.</b>	Maître de conférences B	Présidente
<b>M<sup>r</sup> SEBANE H.</b>	Maître de conférences B	Examineur

*Année universitaire : 2021/2022.*

## *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 ce travail dans de meilleurs conditions.*

*Nous tenons à remercier notre chère promotrice ; Mme : ISSELNANE –TAMACHE Souad pour toute l'aide qu'elle a pu nous apporter tout au long de cette épreuve ; pour sa bienveillance et pour ses prodigieux conseils qui ont menés à bien ce travail. Nous lui rendons hommage pour avoir lutté avec nous devant toutes les entraves afin que ce travail se fasse dans les meilleures conditions possibles.*

*Nous tenons aussi à remercier les responsables du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie de l'université, de MOULOUD MAMMARI de Tizi Ouzou pour nous avoir accompagnés tout au long de ce parcours.*

*Nos sincères remerciements vont également au sous-directeur de la laiterie de DBK ; Mr ILLOUL ; ainsi que « SAHNOUN SOUHILA » et « CHIKH AZIZ » de nous avoir permis d'effectuer notre travail au sein de leur laboratoire ainsi que les travailleurs de l'unité de DBK.*

*Nous tenons à remercier également les membres de jurys d'avoir accepté d'examiner ce travail :*

*Mme DERMECHE S. maître de conférences classe B à l'université MOULOUD MAMMARI, TIZI OUZOU*

*Mr SEBANE H. maître assistant classe A à l'université MOULOUD MAMMARI, TIZI OUZOU*

## DEDICACES

*Je dédie ce travail a toutes les personnes  
De mon entourage qui m'ont accompagné  
De près ou de loin dans cette épreuve ;  
Je dédie ce travail plus particulièrement*

*A :*

*Mes chers parents qui se sont dévoués  
Et qui ont fait du mieux qu'ils pouvaient  
Pour qu'aujourd'hui je parvienne à cette étape de ma vie.*

*Ainsi que mes chers petits frères **SAID ET NACIME.***

*Ma cousine **SARA** et sa mère **SOUHILA.***

*Et je tiens à remercier mes tantes et mes oncles pour  
m'avoir soutenu et avoir toujours cru en moi durant cette  
épreuve*

*Ainsi que mes amis et mon cher cousin **OUELHADJ** qui  
m'ont épaulé et aidé tout au long de mon parcours.*

*Lila*

## DEDICACES

*C'est avec un énorme plaisir et une immense joie que je dédie mon travail à mes très chers parents qui m'ont soutenu tout au long de ma vie.*

*Ainsi qu'à mon adorable et unique sœur « **Lydia** » et son mari « **Yacine** » pour avoir été toujours à mes côtés.*

*A mes petits neveux adorés « **Anaïs** » & « **Ilyane** », à qui je souhaite une réussite dans leur vie.*

*A « **Salim** » le secret de ma réussite, pour son amour et son soutien moral.*

*Et en particulier **Tonton Lhadj** que je ne remercierai jamais assez pour ses précieux conseils et sa disponibilité.*

**Lyna**

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

**Introduction générale..... 1**

## **I. Synthèse des données bibliographiques**

1.1. Les enzymes coagulantes .....	2
1.1.1. Les enzymes coagulantes d'origine animale .....	4
1.1.2. Les enzymes coagulantes d'origine végétale .....	5
1.1.3. Les enzymes coagulantes d'origine microbienne .....	6
1.1.4. Les enzymes coagulantes d'origine fermentaire .....	6
1.2.1. Le lait.....	7
1. 2.1. La production laitière dans le monde et en Algérie .....	8
1.2.2. Aperçu sur la composition du lait .....	8
1. 2.2.1. Eau.....	9
1.2.2.2. Glucides.....	9
1.2.2.3. Vitamines .....	9
1.2.2.4. Minéraux .....	9
1. 2.2.5. Matière grasse .....	10
1.2.2.6. Matière azotée .....	10
1.2.2.6.1. Les caséines .....	11
1.2.2.6.2. Les protéines du lactosérum.....	12
1.2.3. Les propriétés physiques .....	13
1.2.3.1. Le pH.....	13
1.2.3.2. La densité.....	13
1.2.3.3. L'acidité .....	13
1.2.3.4. Le point de congélation.....	14
1.3. Le fromage .....	14

1.3.1. Définition du fromage .....	14
1.3.2. Calcification des fromages.....	14
1.3.3. Le camembert.....	14
1.3.4. Les étapes de fabrication du fromage (camembert) .....	15
1.3.4.1. Préparation du lait .....	16
1.3.4.2. Ensemencements et maturation.....	16
1.3.4.3. Coagulation .....	17
1.3.4.4. Égouttage.....	17
1.3.4.5. Salage .....	18
1.3.4.6. Affinage.....	18

## **II. Matériel et Méthodes**

2.1. Matériel .....	22
2.1.1. Matériel biologique .....	22
2.1.2. Appareillage .....	22
2.1.3. Petit matériel .....	23
2.1.4. Produits chimiques et réactifs .....	23
2.2. Méthodes .....	23
2.2.1. Extraction des enzymes coagulantes .....	23
2.2.2. Caractérisation des extraits coagulants gastriques .....	23
2.2.2.1. Dosage des protéines.....	23
2.2.2.2. Mesure de l'activité coagulante.....	24
2.2.2.3. Mesure de l'activité protéolytique.....	27
2.2.3. Détermination des paramètres physicochimique du lait .....	28
2.2.3.1. Mesure du pH.....	28
2.2.3.2. Détermination de l'acidité en D°.....	28
2.2.3.3. Mesure de la densité du lait.....	28
2.2.3.4. Détermination de la teneur en matière grasse par la méthode de GERBER.....	28
2.2.4. Étapes de fabrication du camembert .....	29
2.2.5. Analyse du camembert.....	29
2.2.5.1. Méthodes d'analyse physico-chimiques du camembert durant l'affinage .....	29

2. 2.5.2. Analyse sensorielle .....	31
<b>III. Résultats et Discussions</b>	
3.1. Teneur en protéines de l'extrait de caillette de dromadaire adulte .....	32
3.2. Les facteurs affectant l'activité coagulante de l'extrait de caillette de dromadaire adulte ....	32
2.1. Effet de la température sur l'activité coagulante des extraits coagulants .....	32
2.2. Effet du pH sur l'activité coagulante des extraits coagulants .....	33
3.3. Mesure de l'activité protéolytique.....	35
3.4. Détermination des paramètres physico-chimiques du lait bovin destiné à la fabrication .....	36
3.5. Détermination des paramètres physico-chimiques des camemberts aux différents stades d'affinage .....	36
3.5.1. Évolution du pH au cours de l'affinage des camemberts .....	37
3.5.2. Évolution de l'humidité au cours de l'affinage des camemberts .....	38
3.5.3. Évolution de la matière grasse au cours de l'affinage des camemberts .....	39
3.5.4. Évolution de l'extrait sec total au cours de l'affinage des camemberts .....	40
3.5.5. Évolution de l'extrait sec dégraissé au cours de l'affinage des camemberts .....	40
3.6. Analyse sensorielle.....	40
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>43</b>

## Références bibliographiques

## Annexes

## Liste des abréviations

<b>Abréviations</b>	<b>désignation</b>
<b>AP</b>	Activité protéolytique
<b>BSA</b>	Sérum albumine bovine
<b>CBR</b>	Chymosine bovine recombinante
<b>CCR</b>	Chymosine cameline recombinante
<b>CPF</b>	Chymosine produite par fermentation
<b>D°</b>	Degré dornic
<b>DO</b>	Densité optique
<b>ECD A</b>	Extrait de caillettes de dromadaire jeune
<b>ESD</b>	Extrait sec dégraissé
<b>EST</b>	Extrait sec total
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>MG</b>	Matière grasse
<b>Met</b>	Méthionine
<b>PB</b>	Pepsine bovine
<b>Phe</b>	Phénylalanine
<b>TCA</b>	Trichloracétique
<b>Trp</b>	Tryptophane
<b>Tyr</b>	Tyrosine
<b>UP</b>	Unité présure

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b>	Origines des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait.	<b>3</b>
<b>Tableau 2</b>	Principales caractéristiques de la chymosine et de la pepsine bovine.	<b>4</b>
<b>Tableau 3</b>	Préparations commerciales d'origine fongique.	<b>7</b>
<b>Tableau 4</b>	Les différentes chymosine produites par fermentation (CPF) à partir d'animaux autres que le veau	<b>8</b>
<b>Tableau 5</b>	Protéines du lactosérum.	<b>12</b>
<b>Tableau 6</b>	Les propriétés physico-chimiques du lait.	<b>13</b>
<b>Tableau 7</b>	Classification des fromages selon LENOIR <i>et al</i> (1985).	<b>15</b>
<b>Tableau 8</b>	Principaux groupes microbiens intervenants au cours de l'affinage du camembert.	<b>20</b>
<b>Tableau 9</b>	Résultats des analyses physico-chimiques du lait bovin destiné à la fabrication des camemberts.	<b>36</b>
<b>Tableau 10</b>	Résultats de l'analyse sensorielle des camemberts.	<b>42</b>

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1</b>	Production laitière mondiale de 2007 à 2020 (millions de tonnes).	<b>9</b>
<b>Figure 2</b>	Représentation schématique de la micelle de caséine (Modèle de SCHMIDT 1982).	<b>12</b>
<b>Figure 3</b>	Principaux mécanismes biochimiques de l'affinage : protéolyse, lipolyse, métabolisme de lactose, de lactate et de citrate.	<b>19</b>
<b>Figure 4</b>	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951).	<b>25</b>
<b>Figure 5</b>	Mesure du temps de floculation par la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN <i>et al</i> (1971)..	<b>26</b>
<b>Figure 6</b>	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951).	<b>27</b>
<b>Figure 7</b>	Diagramme de fabrication du Camembert « TASSILI » à l'unité de Draa Ben Khedda.	<b>30</b>
<b>Figure 8</b>	Le taux de peptides issus de la protéolyse des caséines bovines et camelines par la CCR, CBR, PB et ECD A.	<b>33</b>
<b>Figure 9</b>	Influence de la température sur l'activité coagulante de la PB, CBR, CCR et ECD A.	<b>34</b>
<b>Figure 10</b>	Influence du pH de la PB, CBR, CCR et ECD A sur l'activité coagulante.	<b>35</b>
<b>Figure 11</b>	Suivi de l'évolution du pH au cours de l'affinage pour les Camemberts.	<b>37</b>
<b>Figure 12</b>	Suivi de l'évolution de l'humidité au cours de l'affinage pour les Camemberts.	<b>38</b>
<b>Figure 13</b>	Suivi de l'évolution de la MG au cours de l'affinage pour les Camemberts.	<b>39</b>
<b>Figure 14</b>	Suivi de l'évolution de l'EST au cours de l'affinage pour les Camemberts.	<b>40</b>
<b>Figure 15</b>	Suivi de l'évolution de l'ESD au cours de l'affinage pour les Camemberts.	<b>41</b>

## **Résumé**

La présure est le coagulant le plus utilisé en fromagerie. Sa production connaît une pénurie mondiale croissante due à l'augmentation de la production et de la consommation du fromage. L'objectif de ce travail est d'étudier la possibilité de substituer la présure commerciale par un extrait enzymatique de caillette de dromadaire adulte. Cet extrait se caractérise par une activité protéolytique plus élevée sur les caséines bovines par rapport aux caséines camelines. Son activité coagulante maximale a été obtenue à une température de 45° et à un pH de 4. Le suivi des paramètres physico-chimiques a montré que les valeurs du pH et de la matière grasse augmentent respectivement de 4,92 à 5,65 et de 17 à 22g/l, tandis que l'humidité diminue de 62,45% jusqu'à 33,82%. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés pour le fromage à base de CHY-MAX R (TASSILI) et le fromage fabriqué à base de la CHY-MAX M qui ont été fabriqués comme témoins. Une analyse sensorielle a montré que le camembert fabriqué à base d'extrait de caillettes de dromadaire adulte est moyennement agréable.

Mots clé : Caillette, Dromadaire, Extrait coagulant, Présure, Coagulation, Camembert.

## **Abstract**

Rennet is the most used coagulant in cheese making. Its production is experiencing a growing worldwide shortage due to the increase in production and consumption of cheese. The objective of this work is to study the possibility of substituting commercial rennet by an enzymatic extract of adult dromedary rennet. This extract is characterized by a higher proteolytic activity on bovine caseins compared to camel caseins. Its maximum coagulant activity was obtained at a temperature of 45° and a pH of 4. The monitoring of physico-chemical parameters showed that the pH and MG values increased respectively from 4.92 to 5.65 and from 17 to 22g/l, while the moisture content decreased from 62.45% to 33.82%. These results are comparable to those found for cheese made with CHY-MAX R (TASSILI) and cheese made with CHY-MAX M which were produced as controls. A sensory evaluation showed that the Camembert cheese made with EDC is moderately pleasant.

Key words: Rennet, Dromedary, Coagulant extract, Rennet, Coagulation, Camembert.



# Introduction Générale

La domestication des ruminants et l'utilisation de leurs laits pour en faire du fromage remontent à plus de 10 000 ans avant Jésus-Christ. L'espèce bovine est élevée en Algérie et son lait est considéré comme un aliment complet car il renferme des concentrations suffisantes de tous les nutriments indispensables pour la croissance et la survie de l'homme. Pourtant, il est difficile à conserver si bien que sa transformation en fromages est l'un des moyens les plus utilisés.

La transformation du lait en fromage est un processus de différentes étapes, dont l'étape clé est la coagulation, qui consiste à la formation d'un gel suite à des modifications physicochimiques intervenant sur les micelles de caséines du lait. Plusieurs éléments essentiels sont responsables de ce phénomène parmi eux l'agent coagulant, qui est une enzyme protéolytique. Traditionnellement, la présure est l'enzyme la plus utilisée en fromagerie mais 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 suscité l'exploitation d'autres sources d'enzymes de différentes origines (microbienne, végétale, animale et fermentaire).

A l'échelle mondiale, la fabrication du fromage à partir de présure d'origine animale ne couvre qu'approximativement 30% de la production fromagère du fait du manque de la disponibilité des caillettes de veaux (FAO, 2012). Mais il existe encore des enzymes de remplacement d'origine animale sécrétées par l'estomac d'autres mammifères, parmi elle on peut citer celles extraites des caillettes de dromadaires.

L'objectif principal de ce travail est d'utiliser l'extrait de caillettes de dromadaires adultes dans la fabrication d'un fromage à pâte molle type Camembert et faire un suivi des paramètres physico-chimiques durant l'affinage.

Le manuscrit s'articule en trois parties :

- La première, consiste en une synthèse bibliographique sur les enzymes coagulantes, le lait ainsi que le camembert.
- La deuxième, partie expose tout le matériel et les méthodes utilisées dans la partie expérimentale.
- En dernier lieu, les résultats sont présentés et discutés.



*Synthèse des données  
bibliographiques*

### I. Synthèse des données bibliographiques

#### 1.1. Les enzymes coagulantes

Les enzymes sont des protéines qui jouent un rôle fondamental dans le mode de fonctionnement des systèmes vivants (WALLACH, 1997). Ce sont des biocatalyseurs très efficaces et sélectifs (NELSON, 2008).

Le processus de fabrication du fromage comprend de nombreuses étapes différentes notamment la coagulation (BENN et JOHNSTON, 2004). Elle est considérée comme étant l'étape la plus précoce et la plus cruciale qui permet la conversion du lait liquide en un gel semi-solide par agrégation des caséines. Cette coagulation peut être obtenue par des enzymes protéolytiques qu'on appelle les enzymes coagulantes.

Les enzymes coagulantes utilisées en fromagerie sont des enzymes protéolytiques retrouvées chez tous les organismes vivants. Ce sont des endopeptidases appartenant à la famille des protéinases aspartiques car elles possèdent deux résidus aspartyls dans le site actif impliqués de manière décisive dans la catalyse (RAWLINGS *et al*, 2004). Elles sont sélectionnées pour leur forte activité coagulante et leur faible activité protéolytique. Elles agissent ensuite au cours de l'affinage en influençant la texture et l'aromatisation des fromages (ALAIN GERMONVILLE, 2003).

De nombreuses protéases sont capables de provoquer la coagulation du lait, mais toutes ne sont pas pour autant aptes à la fabrication du fromage car elles ne présentent pas les propriétés biochimiques et technologiques requises (RAMET, 2006). Le choix de l'enzyme repose sur différentes conditions (AGUDELO *et al*, 2004), en effet l'enzyme doit :

- Avoir une faible activité protéolytique ;
- Avoir une bonne activité coagulante dans les conditions physiques et chimiques rencontrés dans le lait soumis à la transformation ;
- Donner au caillé des propriétés rhéologiques permettant de les travailler normalement, dans les délais habituels ;
- Donner un rendement fromager identique à celui de la présure.

Traditionnellement, plusieurs variétés de fromage sont fabriquées à base présure de veau (HATTEM *et al*, 2017). Cette préparation coagulante est généralement extraite de la caillette de jeune veau non sevré âgé de 10 à 30 jours (GARG et JOHRI, 2009) et se compose principalement de chymosine (80 %) et de pepsine (20 %). Elle permet de coaguler le lait rapidement à son pH naturel (GARG et JOHRI, 2009).

De nos jours, la production du fromage a augmenté d'un facteur d'environ 3,5 depuis 1961, mais l'offre de présure a diminué en raison de la disponibilité limitée d'estomacs de ruminants (JACOB *et al*, 2011), le prix élevé de la présure, les préoccupations religieuses (par exemple l'islam et le judaïsme), l'alimentation (végétarisme) ou l'interdiction de la présure de veau recombinante en France, Allemagne et pays bas (ROSEIRO *et al*, 2003).

Aujourd'hui, seul 20 à 30% de la demande mondiale en préparation pour la coagulation du lait peuvent être couverts par la présure de veau (JACOB *et al*, 2011) entraînant une large utilisation d'autres types de préparations pour la coagulation du lait (préparations d'origine végétale, microbienne et fermentaire (YEGIN et DEKER, 2013 ; ROSET, 2019) (Tableau1).

Chaque coagulant possède ses caractéristiques propres de sensibilité au pH, à la température et aux ions calcium. Si certains peuvent être utilisés pour tous types de fromages, d'autres sont plus spécialement réservés à certains types de fabrication (ALAIN GERMONVILLE, 2003).

**Tableau 1 : Origine des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait (COLLIN, 2015).**

Origine		Enzymes	
Animale	Ruminants	Chymosine + pepsine	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Veaux</li> <li>- Chevaux</li> <li>- Agneaux</li> <li>- Bovins adultes</li> </ul>	Pepsine + chymosine	
	Monogastriques	Pepsine	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Porc Oiseaux</li> <li>- Poulets</li> </ul>	Pepsine	
Végétale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Figuier (suc)</li> <li>- Ananas (tige)</li> <li>- Chardon, artichaut</li> </ul>	Ficine	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gaillet</li> <li>- Courge</li> </ul>	Bromélaïne	
Microbienne	Moisissures	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Endothélia parasitica</i></li> <li>- <i>Mucor pusillus</i></li> <li>- <i>Mucor miehei</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Protéase</li> <li>Protéase</li> <li>Protéase</li> </ul>
	Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Bacillus</i></li> <li>- <i>Pseudomonas</i></li> </ul>	Enzymes protéolytiques
Fermentaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Aspergillus awamori</i></li> <li>- <i>Kluyveromyces lactis</i></li> <li>- <i>E. Coli</i></li> </ul>	Chymosine bovine issu d'OGM	

**1.1.1. Enzymes coagulantes d'origine animale (protéases gastriques)**

Les enzymes coagulantes d'origine animale sont des protéases gastriques présentes dans les caillottes des mammifères. Elles sont responsables de la digestion des protéines alimentaires. Elles sont classées en 4 groupes : la pepsine A (EC 3.4.23.1), la pepsine B (EC 3.4.23.2), la pepsine C ou gastricine (EC 3.4.23.3) et la chymosine (EC 3.4.23.4) (FOLTMANN et AXELSEN, 1980 ; RICHTER *et al*, 1998 ; POLAINA et MACCABE, 2007). Ces dernières possèdent des caractéristiques bien définies qui sont illustrées dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Principales caractéristiques de la chymosine et de la pepsine bovine.**

<b>Paramètres</b>		<b>Chymosine</b>	<b>Pepsine</b>	<b>Référence</b>
<b>Localisation</b>		Caillottes d'animaux non sevrés et adulte	Caillottes d'animaux non sevrés et adulte	(FOLTMAN <i>et al</i> , 1979 ; TANG, 2013)
<b>Variantes génétiques</b>		A, B et C	A, B et C	(BANGA-MBOKO, 2002 ; FOX <i>et al</i> , 2004)
<b>PM</b>	Enzyme mature	31	35	(FOLTMAN <i>et al</i> , 1969 ; BANGA-MBOKO, 2002)
<b>Activité</b>	Coagulante	Élevée	Faible	(BROOME et HICKEY, 1990 ; KAGEYAMA, 2002)
	Protéolytique	Faible	Élevée	
<b>pH optimum d'activation</b>		5,5	1,6 à 2,5	(RAMET, 1997 ; HORNBUCKLE <i>et al</i> , 2008)
<b>Température d'activation</b>		42 °C	40 °C	(RAMET, 1997 ; TANG <i>et al</i> , 1973)
<b>pH d'inactivation</b>		> 7	>7	(FOLTMAN, 1969 ; HORNBUCKLE <i>et al</i> , 2008)
<b>Température d'inactivation</b>		50 à 61 °C	>55 °C	(SCRIBAN, 1999)
<b>Sites préférentiels de clivage</b>		Phe105-Met106	Phe-Trp, Phe-Tyr et Phe-Phe	(TANG <i>et al</i> , 1973)

La chymosine est l'enzyme fœtale, la plus dominante chez les mammifères (FOX *et al*, 2004 ; RAMPILLI *et al*, 2005). Elle représente plus de 80 % de l'activité coagulante de la présure (ANDREN, 2002). La pepsine A et pepsine B sont dominantes dans l'estomac des mammifères adultes, alors que la gastricine ne représente que 5 % des enzymes totales chez l'adulte, mais elle se trouve dans toutes les parties de l'estomac des mammifères (SAMLOFF, 1989).

Ces protéases sont synthétisées par les cellules principales de la glande fundique de la caillette (SIDIKOU *et al*, 2005) sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes : pepsinogène, progastricsine et prochymosine (KHAN et JAMES, 1998). Comparé à l'enzyme actif, le zymogène possède un segment peptidique supplémentaire lié à la partie N-terminal de l'enzyme actif nommé « pro-segment » (JENSEN *et al*, 2013). Ces zymogènes sont stables à pH neutre mais sont convertis en enzymes actives à des pH acides (RICHTER *et al*, 1998).

### 1.1.2. Les enzymes coagulantes d'origine végétale

Dans beaucoup de régions, des préparations coagulantes d'origine végétale ont été utilisées très longtemps avant que la présure ne soit largement commercialisée. Leur utilisation a augmenté largement, ceci est dû à la pénurie chronique de la présure de veau.

Ces enzymes d'origine végétale sont de la famille (EC.3.4.23. n) dans la nomenclature officielle. Elles sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures et utilisées dans la fabrication du fromage (SAHAH *et al*, 2013). Elles peuvent être obtenues à partir de leurs sources naturelles ou par cultures *in vitro*, sous forme d'extrait brut ou purifié. Parmi les espèces connues on peut citer le gaillet, l'artichaut et le chardon qui ont été utilisés dans le passé dans des fabrications locales, familiales ou artisanales (fromages fermiers) au Portugal et en Espagne (RAO *et al*, 1998 ; SOUSA et MALCATA, 2002 ; SILVA et MALKATA, 2005). D'autres extraits coagulants ont été obtenus à partir de plantes tropicales comme la ficine (extraite du latex de figuier), la papaine (extraite des feuilles de papayer), la bromélaïne (extraite de l'ananas) (HASHIM *et al*, 2011 ; ABOU EL-YAZID ABD EL-SALAM *et al*, 2017).

Les fromages fabriqués avec un coagulant végétal se trouvent principalement dans les pays méditerranéens, d'Afrique de l'ouest et de l'Europe du sud. Ces diverses préparations végétales ont donné des résultats assez décevants en fromagerie comparés à ceux obtenus avec la présure. En effet, certaines études ont démontré que l'utilisation des coagulants végétaux dans la fabrication du fromage, aboutit à un produit ayant certains défauts de texture et de qualité sensorielle (LOPIERO *et al*, 2002). Cela est dû au fait que ces enzymes possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée par rapport à l'activité coagulante (CAVALCANTIM *et al*, 2004 ; CHAZARRA *et al*, 2007).

Cependant, les protéases du cardon *cynara cardunculus* semblent être une exception (SOUSA et MALCATA, 2002 ; ROSEIRO *et al*, 2003 ; AMIRA *et al*, 2017). En effet, il a été démontré que l'extrait aqueux de fleurs de cardon est un bon substitut de la présure animal (ROSEIRO *et al*, 2003).

### 1.1.3. Les enzymes coagulantes d'origine microbienne

Le marché mondial de la production d'enzymes microbiennes utilisées dans la transformation des produits laitiers connaît une croissance impressionnante. De nombreuses protéases d'origine microbienne agissent de manière similaire à la chymosine (TUBESHA et AL-DELAÏMY, 2003 ; BEKA, 2011). Toutefois, ces enzymes montrent une activité protéolytique plus élevée pendant la fabrication du fromage. De tels coagulants peuvent être facilement produits par fermentation et par conséquent sont disponibles de manière illimitée (JACOB *et al*, 2011).

Actuellement, la recherche sur les présures microbiennes est toujours dirigée vers la découverte d'enzymes qui sont plus thermolabiles et ayant un meilleur rapport de coagulation sur l'activité protéolytique générale. La thermolabilité est un critère important, en particulier pour les protéases ayant une activité protéolytique générale élevée (YEGIN et DEKKER, 2013).

De multiples souches de bactéries, de moisissures et de levures ont été étudiées en vue de la production de protéases coagulantes : protéases d'origine bactérienne et protéases d'origine fongiques (RAMET, 1997 ; MANDY *et al*, 2011).

Parmi ces bactéries, c'est les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* qui ont été le plus exploités (EL-BENDARY *et al*, 2007). Des applications ponctuelles pour coaguler le lait se sont révélées assez décevantes en raison d'une activité protéolytique élevée et peu spécifique. Ces enzymes ont une aptitude à coaguler meilleure que celle des enzymes d'origine végétale mais moins intéressantes que celle des enzymes d'origine fongique (COLLIN, 2015).

Les enzymes coagulantes d'origine fongique ont été développées surtout chez des moisissures banales du sol (*Mucor pusillus*, *Mucor miehei*) et chez une moisissure parasite du châtaignier (*Endothélia parasitica*) (GOURSAUD, 1999, TUBESHA et AL-DELAÏMY, 2003 ; NOUANI, 2011). Ces coagulants donnent des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure contrairement aux coagulants d'origines bactériens.

### 1.1.4. Les enzymes coagulantes d'origine fermentaire

La chymosine recombinante appelée aussi chymosine produite par fermentation (FPC) a été pour la première fois induite sur le marché en 1990 et depuis elle est principalement utilisée aux États-Unis. JOHNSON et LUCEY (2003) ont estimé que le FPC représente 70 à 80 % du marché mondial des coagulants.

Les levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* (MELLOR *et al*, 1983), *Kluyveromyces lactis* (FENG *et al*, 2011) et des champignons filamenteux tels que *Trichoderma reesei* (VEGA-HERNANDEZ *et al*, 2004) ou *Aspergillus oryzae* (USITALO *et al*, 1991) ont été utilisées pour produire la chymosine. Actuellement, plusieurs préparations commerciales sont disponibles sur le marché (tableau 3).

Tableau 3 : Préparations commerciales d'origine fongique.

Microorganismes recombinés	Société productrice	Nom de la préparation
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Gist Brocades n.v (NL)	Maxiren
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Pfizer Inc. (USA)	Chymax
<i>Aspergillus awamori</i>	Ch. Hansen Lab. (DK)	Chymogen

La chymosine du veau est la première chymosine produite par fermentation en transférant le gène de la chymosine à *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces lactis* (KAPPELER *et al*, 2006). Cependant d'autres chymosines recombinantes sont actuellement disponibles à partir d'autres ruminants (tableau 4), tels que la chèvre (*Capra hircus*) (KUMAR *et al*, 2007), le chameau (*camelus dromedarius*) (KAPPELER *et al*, 2006) et le buffle (*Bos taurus*) (Vallejo *et al*, 2008). Parmi celles-ci, la chymosine de buffle s'est avérée plus stable sur le plan physicochimique que les autres homologues (Mohanty *et al*, 2003). De plus, le buffle est considéré comme le principal animal producteur de lait en Inde. La compatibilité de la chymosine de bufflonne dans la coagulation du lait de bufflonne pourrait être meilleure par rapport aux autres coagulants du lait.

Plusieurs variétés de fromages ont été fabriqués à partir de la chymosine recombinante bovine tels que le fromage Feta (MACEDO *et al*, 1993), Gouda (ROSEIRO *et al*, 2003), la Mozzarella (FUSTE-FOEME, 2020) et le Cheddar (MURTAZA, 2021). Aucune différence significative des propriétés du fromage (texture, goût, couleur, odeur et maturation) n'a été signalée, comparé à la chymosine naturelle. (O'SULLIVAN *et FOX*, 1991 ; BARBANO *et RASMUSSEN*, 1992).

KAPPELER *et al* (2006) ont exprimé le gène de la chymosine du dromadaire (*Camelus dromedarius*) dans *Aspergillus niger*. Cette enzyme suscite un grand intérêt dans les industries fromagères car elle produit du fromage avec une bonne saveur et une durée de conservation prolongée (LANGHOLM *et al*, 2013). En effet, un fromage de type cheddar produit à partir de la CCR s'est avéré avoir une durée de conservation plus élevée avec moins d'amertume que celui fabriqué à partir de chymosine de veau (BANSAL *et al*, 2009 ; MOLLER *et al*, 2012).

La CCR a la capacité de coaguler le lait de chamelle et de vache. De plus, elle a une activité de coagulation 70% plus élevée, présente un niveau de thermo stabilité plus élevé et un rapport activité de coagulation / activité protéolytique sept fois plus élevée que la chymosine bovine (BANSAL *et al*, 2009 *et SORENSEN* COLL, 2011).

**Tableau 4 : Les différentes chymosines produites par fermentation (CPF) à partir d'animaux autres que le veau.**

CPF	Hôtes	Température optimal	pH optimal	Références
Prochymosine d'agneau	<i>Escherichia coli</i>	40°C	6,6	ROGELJ et coll. (2001)
Chymosine de chèvre	<i>Pichia pastoris</i>	45°C	6,5	TYAGI <i>et al.</i> ( 2016)
Chymosine de buffle	<i>Pichia pastoris</i>	37°C	5,5	VALLEJO. (2012)
Chymosine de chameau	<i>Pichia pastoris</i>	45°C	5,04	WANG <i>et al.</i> ( 2015)

## 1.2. Le lait

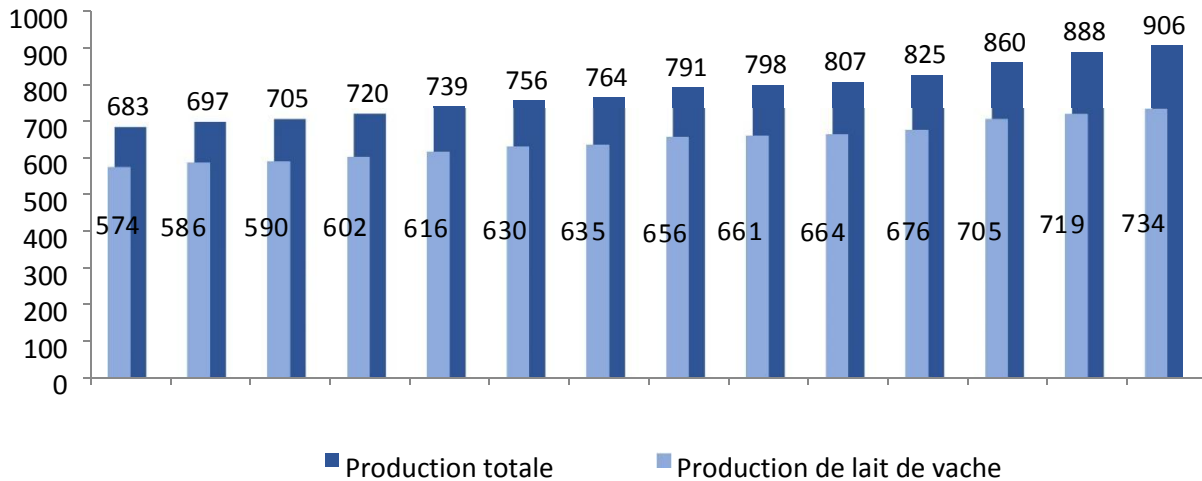
Le lait a été défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne contenir de colostrum » (POUGHEON et GOURSAUD, 2001).

Des millions de personnes dans le monde consomment quotidiennement du lait en raison de ses énormes avantages nutritionnels tels que la croissance et le développement des os chez les jeunes enfants, car le lait est une bonne source de calcium et de vitamine D. (EL-HATMI *et al*, 2015). Selon FAO (2012), le lait n'est pas seulement une source de nutrition, mais sa production contribue également à la sécurité alimentaire et aux revenus de la plupart des habitants des pays en développement. Environ 150 millions de ménages sont engagés dans la production de lait à travers le monde.

### 1.2.1. Productions laitières dans le monde et en Algérie

Le lait occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des humains. Le lait le plus produit c'est le lait de vache. Il représente 81% de la production mondiale du lait, puis le lait de bufflonne (15%) et les autres types de laits (chèvre, brebis et chamelle) qui représentent 4%. (FAO, 2020).

Durant la période 1992-1999, la production laitière annuelle moyenne dans le monde a été de 549 millions de tonnes et depuis elle n'a cessé d'augmenter pour atteindre 906 millions de tonnes (734 millions de tonnes pour le lait de vache) en 2020 (figure 1) (FAO, 2020).



**Figure 1 : Production laitière mondiale de 2007 à 2020 (millions de tonnes) (FAO, 2020).**

La production laitière en Algérie est estimée en totalité à 3,6 milliards de litres de lait de toutes les espèces (bovins, ovins, caprines et camelins) dont 2,7 milliards de litres proviennent d'un effectif de 1 millions de têtes de vaches laitières (BNDRA, 2016). Selon MAKHLOUF (2015), l'Algérie ne permet pas l'autosuffisance alimentaire, le groupe « lait et produits laitiers » occupe la deuxième place parmi les produits alimentaires importés.

### 1.2.2. Aperçu sur la composition du lait

Le lait comme étant un système colloïdal naturel complexe, composé d'une dizaine de composants différents, commençant par de simples composés inorganiques, tels que le phosphate de calcium, le chlorure de sodium et d'autres sels, et se terminant par des composés organiques complexes : protéines, lipides, glucides, vitamines et bien d'autres (YANG *et al*, 2018).

La composition du lait peut varier à cause de différents facteurs. Ces principaux facteurs de variation sont bien connus. Ils sont soit intrinsèques liés à l'animal (facteurs génétiques, stade de lactation, état sanitaire, etc.), soit extrinsèques liés au milieu et à la conduite d'élevage (saison, climat, alimentation) (WOLTER, 1988).

### 1. 2.2.1. Eau

C'est l'élément le plus important du point de vue pondéral (en quantité). Elle représente environ 81 à 87% du volume du lait selon la race. Elle se trouve sous deux formes : l'eau libre (96% de la totalité) et liée à la matière sèche (4% de la totalité) (AMIOT *et al*, 2002).

### 1.2.2.2. Glucides

Le sucre principal du lait est le lactose, disaccharide constitué par l'association d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose. On ne relève que 70 mg/l de glucose et 20 mg/l de galactose ainsi que des traces d'autres glucides. Le lactose est un sucre fermentescible. Il est dégradé en acide lactique par des bactéries lactiques (lactobacilles et streptocoques), ce qui provoque un abaissement du pH du lait entraînant sa coagulation. Cette dernière est indispensable pour la fabrication de fromages et de laits fermentés (FREDOTE, 2005).

### 1.2.2.3. Vitamines

Les vitamines sont des substances biologiquement indispensables à la vie, puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires. L'organisme humain n'est pas capable de les synthétiser (VIGNOLA, 2002). Le lait et ses dérivés sont des sources assez riches en vitamine A, B12 et B2 ; un peu moins en vitamine B1 et B6, par contre, ils ne contiennent que peu de vitamines E, et d'acide folique (vitamine C) (ROMAIN, 2008).

### 1.2.2.4. Minéraux

Les minéraux sont présents dans le lait à environ 7 g/l. Ils sont importants d'un point de vue nutritionnel et technologique. En effet, le lait contient tous les éléments minéraux indispensables à l'organisme : le calcium, le phosphore, le magnésium, le potassium, le sodium et le chlore (GAUCHERON, 2004). La matière minérale n'est pas exclusivement sous forme de sels solubles (molécules et ions) ; une partie importante se trouve dans la phase colloïdale insoluble (micelles de caséines). On constate que la composition minérale est variable selon les espèces, les races et le moment de lactation. Le lait contient également les oligo-éléments indispensables pour l'organisme humain tels que le zinc, le fer, le cuivre, le fluor et l'iode (COURT *et al*, 2010).

### 1.2.2.5. Matière grasse

Le lait contient environ 25 à 45 g de matières grasses par litre de lait, le taux varie de 2,5- 5 % en fonction des conditions d'élevage (LUQUET, 1985). La matière grasse est présente dans le lait sous forme de globules gras, de 1 à 8 µm de diamètre, en émulsion ; avec un taux variable (environ 10 milliards de globules par millilitre de lait). Cette matière grasse est constituée principalement de composés lipidiques. Le trait commun aux lipides est la présence d'acides gras qui représentent 90 % de la masse des glycérides ; ils sont donc les composés fondamentaux de la matière grasse (FREDOE, 2005).

### 1.2.2.6. Matière azotée

La teneur moyenne en protéines d'un lait normal est d'environ 3,2%, ce qui représente 95% de l'azote total de ce lait. Les autres 5% sont formés par la matière azotée non protéique (urée, créatine, créatinine, acides aminés, petits peptides, ammoniac) (MAHAUT *et al*, 2000). Environ 80% des protéines du lait sont constituées de caséines qui précipitent à pH 4,6 et forment la matrice fromagère, les 20% restants forment les protéines du lactosérum qui sont solubles à toutes les valeurs de pH si elles ne sont pas dénaturées (VISSER *et al*, 1980).

#### 1.2.2.6.1. Caséines

Les caséines (CN) constituent la fraction majeure des protéines du lait. Cette fraction est la plus déterminante en matière de technologie fromagère. Elles sont des polypeptides complexes, résultat de la polycondensation de différents aminoacides, dont les principaux sont la leucine, la proline, l'acide glutamique et la sérine. Elles se trouvent sous forme de micelles. Ces micelles précipitent sous l'action de la présure ou lors d'une acidification à un pH d'environ 4,6 (A.J. ILBOUDO *et al*, 2012).

Une micelle de CN est formée par l'association de quatre protéines individuelles, qui se trouvent en des pourcentages différents :

- La caséine  $\alpha$ 1 (36%) (KAPPELER *et al*, 1998) et la caséine  $\alpha$ 2 (10%) (ALALAWI et LALEYE, 2011) ;
- La caséine  $\beta$  (34%) (AL HAJ et AL KANHAL, 2010) ;
- La caséine  $\kappa$  (13%) (DEVENDRA *et al*, 2016). C'est la caséine la plus étudiée, en raison de son rôle dans la coagulation du lait par la présure, de son importance dans la stabilité de la micelle et de son intérêt en transformation laitière.

Jusqu'à maintenant, il existe différents modèles structuraux de micelles et qui affirment clairement que les micelles sont formées de sous-micelles reliées ensemble par des ponts phosphate de calcium. Les sous-micelles périphériques sont plus hydrophiles et contiennent une plus grande proportion de  $\kappa$ -caséine. La figure 2 schématise clairement la structure micellaire et sous micellaire de caséine.

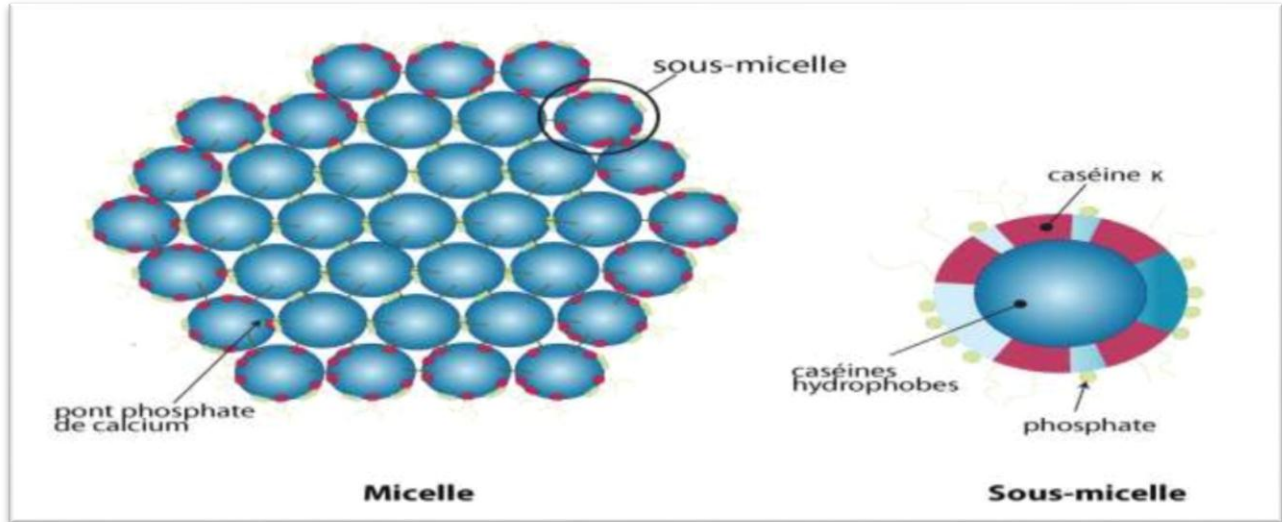


Figure 2 : Représentation schématique de la micelle de caséine (Modèle de SCHMIDT) (1982).

#### 1.2.2.6.2. Les protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum représentent 15 à 28 % des protéines du lait et 17 % des matières azotées (DEBRY, 2001). Elles sont définies comme protéines d'excellente valeur nutritionnelle, riches en acides aminés soufrés, en lysine et tryptophane. Elles ont de remarquables propriétés fonctionnelles mais sont sensibles à la dénaturation thermique (THAPON, 2005). Les différentes protéines du lactosérum sont représentées dans le tableau suivant.

Tableau 5 : Protéines du lactosérum (VIERLING, 2008)

Protéines	Pourcentages respectifs (%)	Propriétés
<b><math>\beta</math>-lactoglobuline</b>	50	Dénaturation thermique à partir de 60°C. Formation de la peau du lait sur l'interface.
<b><math>\alpha</math>-lactalbumine</b>	23	
<b>Immunoglobulines</b>	10	
<b>Protéines-peptones</b>	17	Thermostables à 100°C.
<b>métalloprotéines</b>	< 1	

### 1.2.3. Propriétés physiques du lait

Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la masse volumique ou la densité, le point de congélation et l'acidité. Cette dernière est mesurée en degré dornic (D°), 1D° correspond à 1mg d'acide lactique dans 10ml de lait. Comme le montre le tableau ci-dessous.

**Tableau 6 : Les propriétés physico-chimiques du lait (DJOUADI, 2014).**

Caractéristique	Valeurs
pH (20°)	6,5 à 6,7
Densité (g/ml)	1,028 à 1,032
Acidité titrable (D°),	15 à 17
Point de congélation (°C)	-0.51 à -0.55

#### 1.2.3.1. Le pH

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action de bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) et une diminution du pH (CIPC lait, 2011).

#### 1.2.3.2. La densité

La densité moyenne du lait mesurée à 20°C est entre 1,028 et 1,030. Cette propriété physique varie selon la teneur en matière sèche, en matière grasse, de l'augmentation de la température et des disponibilités alimentaires (CHAROL et VIGNOLA, 2002).

#### 1.2.3.3. L'Acidité

Dès sa sortie du pis de la vache, le lait démontre une certaine acidité. Cette acidité naturelle est due principalement à la présence des protéines, surtout les caséines et aux substances minérales telles que : les groupes phosphate, les dioxydes de carbone et les acides organiques. L'acidité développée est due à l'acide lactique formé au cours de la fermentation lactique, elle est de 15 à 17° Dornic dans les conditions normales. Elle permet de juger l'état de conservation de lait (JEAN C et DIJON C, 1993).

#### 1.2.3.4. Le Point de congélation

Cette propriété physique est mesurée pour déterminer s'il y a addition d'eau au lait. Sa valeur moyenne se situe entre  $-0,54$  et  $-0,55^{\circ}\text{C}$ . De légères fluctuations dues aux saisons, à la race de la vache, à la région de production sont observées. D'une manière générale, tous les traitements du lait ou les modifications de sa composition qui font varier leurs quantités entraînent un changement du point de congélation (GOURSAUD, 1985).

### 1.3. Le fromage

Non seulement le lait se consomme à l'état nature, il peut également subir différentes biotransformations qui contribuent à élargir considérablement ses qualités sensorielles et nutritionnelles. L'un des dérivés de ces transformations est le fromage (HENRI *et al*, 2008).

#### 1.3.1. Définition du fromage

La dénomination "fromage" est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir de matières d'origine exclusivement laitière : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse (JORF, 2007).

#### 1.3.2. Classification des fromages

Il existe une grande variété de fromages qui diffèrent par le goût, l'odeur, la texture ou la forme. Cette variété dépend de plusieurs paramètres liés à l'origine du lait, la matière dont le lait est transformé et de son traitement thermique. LENOIR *et al* (1985) ont proposé une classification de fromages basés sur les différences rencontrées lors de leurs fabrications : la coagulation, l'égouttage et la maturation (tableau 6).

#### 1.3.3. Le Camembert

Le Camembert est un fromage à pâte molle à caillé non divisé, affiné en surface, principalement par des moisissures, conformément à la norme générale pour le fromage (CODEX STAN283-1973) et qui se présente sous la forme d'un cylindre plat, d'un diamètre de 10 à 11 cm et d'une épaisseur de 3 cm. Il renferme au moins 40 % de matière grasse et le poids total de matière sèche ne doit pas être inférieur à 110g.

Selon la conduite de l'affinage, deux types de croûte peuvent se développer permettant de diviser les fromages à pâte molle en deux groupes : les pâtes molles à croûte fleurie comme les Brie et le Camembert et les pâtes molles à croûte lavée ou croûte morguée comme les Époisses et le Munster (MAHAUT *et al*, 2000). Quatre ingrédients principaux interviennent dans la fabrication des fromages à pâte molle : le lait, la présure, les micro-organismes et le sel. La composition du fromage varie donc en fonction de type de lait utilisé et des paramètres technologiques appliqués.

**Tableau 7 : Classification des fromages selon LENOIR *et al* (1985).**

Type de pâte	Type de fromage	Coagulation	Égouttage	Affinage
<b>Pâte fraîche</b>	-Petit suisse -Demi sel -Fromage à la pie -Fontainebleau	Acidification lactique (avec ou sans légère action de la présure)	Par centrifugation ou par filtration	Sans affinage
<b>Pâte molle</b>	-Camembert	Mixte	Lent avec simple découpage	croûte fleurie
	-Brie			Moisis interne
	-Roquefort			croûte lavée
<b>Pâte pressé</b>	-Saint Nectaire -Tome de Savoie	Action de la présure	Accélééré par : -Découpage -Brassage -Pressage	croûte moisie
	-Saint Paulin -Reblochon			croûte lavée
<b>Pâte ferme non cuite</b>	-Cantal -Cheddar -Laguiole	Action de la présure	Accélééré par : -Découpage -Brassage -Pressage -Broyage	croûte lavée
<b>Pâte ferme cuite</b>	-Gruyère	Action de la présure	Accélééré par : -Découpage -Brassage -cuisson -pressage	croûte morgée avec ouverture(trous)
	-Emmental			croûte sèche avec ouverture
	-Beaufort			croûte morgée sans ouverture

### **1.3.4. Etapes de fabrication du fromage( camembert)**

#### **1.3.4.1. Préparation du lait**

Cette étape consiste à donner au lait la composition correspondant à celle du fromage et à créer les conditions bactériologiques nécessaires à la coagulation du lait (BERTRAND, 1988).

##### **1.3.4.1.1. Standardisation**

La teneur en matière grasse du lait varie selon les races et l'alimentation des animaux (MAUBOIS, 2018). Afin de satisfaire le rapport gras/sec et de maîtriser la structuration de l'eau dans le fromage, les industriels ajustent la teneur en matière grasse par l'ajout de la matière grasse laitière anhydre (MGLA) (MAHAUT *et al*, 2000).

Pour corriger les variations des teneurs en calcium du lait, le chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) est rajouté à une dose variant entre 50 et 200 mg/l de lait, améliorant ainsi l'aptitude à la coagulation (JEANTET *et al*, 2008).

##### **1.3.4.1.2. Homogénéisation**

C'est une action mécanique réalisée à une température supérieure à 60°C dans un homogénéisateur. Elle a pour but de stabiliser l'émulsion de la matière grasse du lait par la réduction du diamètre des globules gras à environ 1 micron et ce grâce à une pression exercée sur le lait de 100 à 200 bars (BOURDIER et LUQUET, 1991).

##### **1.3.4.1.3. Traitements thermiques**

Deux couples températures-temps sont utilisés en fromagerie pour le traitement thermique du lait : la thermisation (62°-65°C pendant 15 à 20 s) et la pasteurisation (72°C pendant 15s). Ces deux traitements ont pour but la destruction significative des microorganismes pathogènes. (HERMIER et CERF, 2006).

##### **1.3.4.2. Ensemencement et maturation**

C'est l'étape d'introduction de la flore lactique sélectionnée qui va participer, d'une part, à la coagulation du lait et d'autre part, à l'affinage du fromage (rôle dans l'activité protéolytique). Le lait (un petit volume) estensemencé par des ferments lactiques mésophiles à une dose de 1,5 à 2%. Un temps de maturation suffisant est laissé dans le but de permettre la multiplication et le développement des souches de bactéries lactiques inoculées. Une fois ces souches revivifiées, le levain servira à ensemenecer les grandes cuves de coagulation. (RANDAZO *et al*, 2009).

On introduit également des levains fongiques qui jouent un rôle important dans le phénomène de l'affinage. Il s'agit de spores de *Penicillium camemberti*, *Penicillium caseicolum* ainsi que *Géotrichum candidum* (MAHAUT *et al*, 2000).

### 1.3.4.3. Coagulation

La coagulation se traduit par la formation d'un gel (ou coagulum) qui résulte dans le cas du Camembert, des modifications physico-chimiques qui interviennent autour des micelles de caséines et qui concourent à leur déstabilisation extrême. Dans le caillé du Camembert, la coagulation est de type mixte (CODEX ALIMENTARIUS, 2010), c'est-à-dire qu'elle fait appel à l'action conjuguée des deux types de coagulation : acide et enzymatique (CHOLET, 2006).

#### 1.3.4.3.1. La coagulation enzymatique

Cette coagulation est réalisée à l'aide d'enzymes coagulantes qui sont soit d'origine animale, végétale ou microbienne (VALLEJO, 2008). Mais la plus ancienne et toujours employée est la présure. Elle comprend deux phases : une phase enzymatique au cours de laquelle la chymosine dégrade la caséine k de façon spécifique et une phase de coagulation qui correspond à la formation du gel par agrégation des micelles modifiées (ST-GELAIS et TIRARD -COLLET, 2002).

#### 1.3.4.3.2. La coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ( $pH_i=4,6$ ) par acidification biologique à l'aide de ferments qui transforment le lactose en acide lactique ou par acidification chimiques ou encore par ajout de protéines sériques à pH acide (MAHAUT *et al*, 2000). L'acidification brutale, par addition d'un acide minéral ou organique entraîne une floculation des caséines à  $pH=4,6$  sous la forme d'un précipité plus ou moins granuleux qui se sépare du lactosérum. En revanche, une acidification progressive obtenue soit par fermentation lactique soit par hydrolyse de la gluconolactone, conduit à la formation d'un coagulum lisse, homogène qui occupe entièrement le volume initial du lait (ECK et GILLIS, 2006).

#### 1.3.4.3.3. La coagulation mixte

Cette coagulation résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. La multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibre spécifiques est à l'origine de la grande diversité des fromages à pâte molle (MAHAUT *et al*, 2003 ; ROMAIN *et al*, 2008).

#### 1.3.4.4. Égouttage

L'égouttage, ou déshydratation du caillé, permet la concentration des éléments du lait. À ce stade, le caillé se sépare du lactosérum, par le phénomène de synérèse (KONGO *et al*, 2016a). Grâce à la présence de présure, à l'acidité et à la température, le coagulum se contracte en éjectant le lactosérum (GUETOUACHE *et al*, 2014 ; GASSI *et al*, 2017).

#### 1.3.4.5. Salage

Le salage des fromages permet dans un premier temps de compléter l'égouttage. Il contribue également à la formation de la croûte. Par la régulation de l'activité de l'eau ( $A_w$ ), le sel module le développement des micro-organismes et favorise les activités enzymatiques au cours de l'affinage (HARDY, 1997).

Deux procédés de salage peuvent être utilisés : le salage à sec (manuel ou mécanique) ou le salage par saumurage (cas des Camemberts) pour lequel les fromages sont immergés dans une solution habituellement saturée en chlorure de sodium. La plupart des fromages à pâte molle ont une teneur en sel de 1,5 à 2,0 % (CHOLET, 2006).

### 1.3.4.6. Affinage

Le processus d'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique du caillé. Lors de la coagulation et de l'égouttage, le substrat préparé est constitué essentiellement de caséine, de matière grasse et d'une fraction des composants du lait. Ces constituants seront transformés sous l'action enzymatique au cours de l'affinage d'où l'apparition de matières sapides et odorantes (ECK, 1987). Cette étape permet la maturation du fromage dans des hâloirs où s'effectue le développement de la croûte fleurie de pénicillium pendant une durée s'étalant de 12 à 14 jours à une température de 12 à 13°C (CHOLET, 2006). Plusieurs variétés de microorganismes (bactéries, levures, moisissures) interviennent dans ce processus (tableau 8).

C'est au cours de l'affinage que se développent la saveur et la texture caractéristiques de la variété fromagère (P.F. FOX *et al*, 2017). Cependant, il peut être influencé par plusieurs facteurs tels que la température, pH, humidité et la composition de l'atmosphère (MIETTON, 1994).

#### 1.3.4.6.1. Les voies métaboliques mises en jeu au cours de l'affinage des fromages (type pâte molle)

Le processus de maturation des Camemberts est dominé par trois grands phénomènes biochimiques : la fermentation du lactose, l'hydrolyse de la matière grasse et la dégradation des protéines. Ce dernier phénomène modifie l'aspect, la texture et la consistance de la pâte ; simultanément, il est à l'origine du développement de la saveur du fromage (MAHAUT *et al*, 2000 ; NANA et FARKYE, 2004) (figure 3).

##### 1.3.4.6.1.1. Glycolyse

La glycolyse permet la transformation du lactose en acide lactique grâce aux bactéries lactiques, coliformes, levures et aux moisissures. L'acide lactique peut subir d'autres fermentations en acides organiques plus simples (Acide propionique Acétique et butyrique), qui peuvent eux-mêmes être transformés en composants de la flaveur des fromages comme les aldéhydes et les cétones (RAMET, 1985). La seconde source de carbone et d'énergie du lait qu'utilisent les microorganismes est le citrate, qui est métabolisé par certaines souches de bactéries lactiques conduisant à la formation de composés tel que le diacétyl (Romain *et al*, 2008).

##### 1.3.4.6.1.2. Protéolyse

Les enzymes protéolytiques se subdivisent en endopeptidases qui hydrolysent les protéines en peptides et en exopeptidases qui scindent les peptides en acides aminés libres. Au cours de la maturation du Camembert dans les hâloirs, il y'a une hydrolyse enzymatique progressive des caséines en peptides (de tailles variables) et en acides aminés libres, qui sont l'origine de

l'assouplissement de la pâte et le développement de la saveur (MAHAUT *et al*, 2000 ; NANA et FARKYE, 2004 ; FOX *et al*, 2017).

### 1.3.4.6.1.3. Lipolyse

La dégradation de la matière grasse ou la lipolyse peut être due à l'action de la lipase naturelle du lait et à celle des lipases d'origines microbiennes. Les micro-organismes des fromages les plus lipolytiques sont les moisissures. En effet, *Penicillium Camemberti* constitue l'agent principal de la lipolyse du Camembert. Cependant *Géotricum candidum* (levure) est probablement responsable de la modification du profil des acides gras libres en faveur des acides insaturés, via la production de lipases (CHOISY *et al*, 1997).

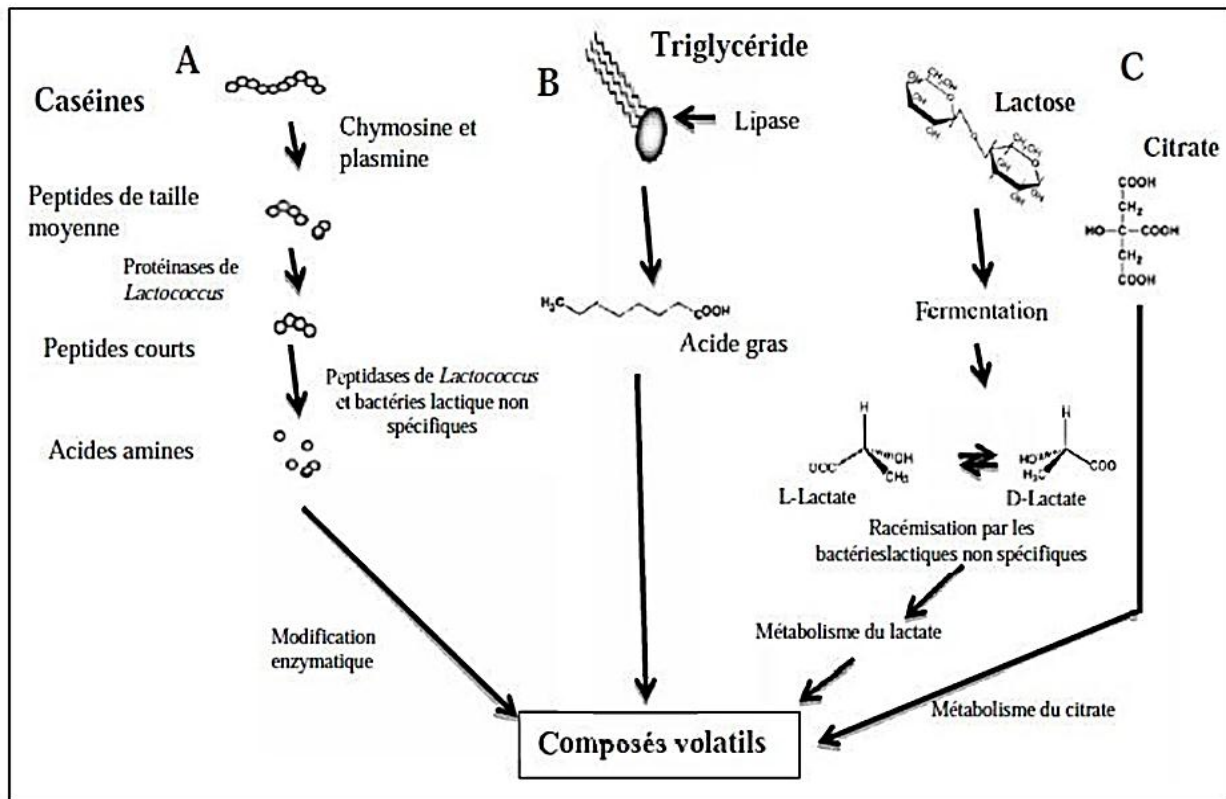


Figure 3 : Principaux mécanismes biochimiques de l'affinage : (a) protéolyse, (b) lipolyse, (c) métabolisme de lactose, de lactate et de citrate (MCSWEENEY et SOUSA, 2000).

**Tableau 8 : Principaux groupes microbiens intervenant au cours de l'affinage du camembert (HENRI GOUDEDRANCHE *et al*, 2001).**

<b>Groupes microbiens</b>	<b>Principales origines</b>	<b>Principales fonctions</b>
Lactocoques : <i>L.lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>diacetylactis</i> , <i>L.lactis subsp</i>	Levains lactiques	acidification
Leuconostocs	Lait, éventuellement levains	Production de composants d'arome
Lactobacilles : <i>Lb. Plantarum</i> <i>Lb. Casei</i>	Lait	Production de composants d'arome
Microcoques	Lait, sel	Protéolyse, dégradation des acides aminés
Bactéries corynéformes	Lait, éventuellement levains	Protéolyse, dégradation des acides aminés
Levures : <i>Kluyveromyces</i> <i>Debaromyces</i> <i>Saccharomyces</i>	Lait, atmosphère des locaux, matériel de fromagerie, levains	Production de composants d'arome
Moisissures : <i>Penicillium camemberti</i>	Levain fongique	Désacidification, protéolyse, lipolyse, production de composants d'arôme.
<i>Geotrichum candidum</i>	Lait, atmosphère des locaux, matériel de fromagerie, levains	Protéolyse, lipolyse, production de composants d'arôme



## **Matériel et méthodes**

Le présent travail a été effectué au niveau de la fromagerie « Le Tassili » localisée à Drâa-Ben-Khedda wilaya de Tizi-Ouzou et du laboratoire pédagogique de biochimie, à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

## II. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. 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** : la Pepsine (EC 3.4.23.1) bovine ; la chymosine bovine recombinante (CHY-MAX R 1400 IMCU, Christian Hansen. Lab, Danemark) (qui nous a été fournie gracieusement par la Laiterie de Drâa Ben Khedda, wilaya de Tizi Ouzou). La chymosine cameline recombinante (CHY-MAX M 200 IMCU) et la présure cameline extraite de caillettes de dromadaires adultes ont été utilisées.
- **Serum albumine bovine (BSA)**, (SIGMA chemical Co., U.S.A).
- **Le lait bovin** : le lait utilisé dans cette étude a été fournie gracieusement par la Laiterie de Drâa Ben Khedda, wilaya de Tizi Ouzou.
- **Les ferments** : les ferments ont été utilisé dans le processus de fabrication du fromage. Ils nous ont été fournies gracieusement par la Laiterie de Drâa Ben Khedda, wilaya de Tizi Ouzou :
  - Ferment de pré-maturation :  $\text{CaCl}_2$ , *Penicillium camemberti*, *Penicillium candidum* ;
  - Ferment de maturation : Deux sorte bactéries lactiques sont utilisées dans l'acidification du lait :
    - Bactéries mésophiles : *lactococcus lactis leuconostoc mesenteroides* ;
    - Bactéries thermophiles : *streptococcus thermophilus*.

#### 2.1.2. Appareillages

Agitateur magnétique, balance électronique et balance de précision, pH-mètre, bain-marie, spectrophotomètre-visible, lyophilisateur, centrifugeuse, dessiccateur à infra-rouge, lactodensimètre.

#### 2.1.3. Petits matériel

Un certain nombre de petit matériel approprié a été également utilisé dans cette étude. Il s'agit de : micropipettes, membranes de dialyse, ainsi que différents types de verrerie (bêchers, fioles

jaugées, fiole à vide, pipettes graduées, tubes à essais, burettes, butyromètre de GERBER et VAN GULINK).

### 2.1.4. Produits chimiques et réactifs

- **Produits et solvants usuels** : acide acétique, acide chlorhydrique, acide trichloracétique (TCA), acide sulfurique, soude d'origine, alcool.
- **Colorants et réactifs spécifiques** : phénolphthaléine, réactif de Folin-Ciocalteu.
- **Sels et tampons** : chlorure de sodium, sulfates d'aluminium, tartrate de Sodium et potassium, sulfate dissodique.

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Extraction des enzymes coagulantes

L'extraction est effectuée selon la méthode de VALLES et FURET (1977) pour le bovin et adaptée par nos soins aux extraits issus de caillettes de dromadaires.

Des échantillons de caillette de poids P (g) sont décongelés et macérés dans un volume d'une solution de HCl, à une température de 40°C pendant 60 minutes. Après filtration du mélange on obtient un extrait brut total. Après macération, les extraits obtenus sont clarifiés par l'ajout d'une solution de sulfate d'aluminium et d'une solution de sulfate dissodique chauffée quelques minutes à 40°C. Après filtration, le filtrat jaune obtenu va subir une concentration par addition d'une solution saturée de NaCl, additionnée de 1% (V/V) d'une solution de HCl. Après un repos d'une heure suivie d'une centrifugation (2100xg / 20min), nous obtenons un précipité humide que l'on fait dissoudre dans un volume minimal d'eau distillée. Le pH des extraits enzymatiques clarifiés est ajusté à 5,5 par une solution de phosphate dissodique.

### 2.2.2. Caractérisation des extraits coagulants gastriques

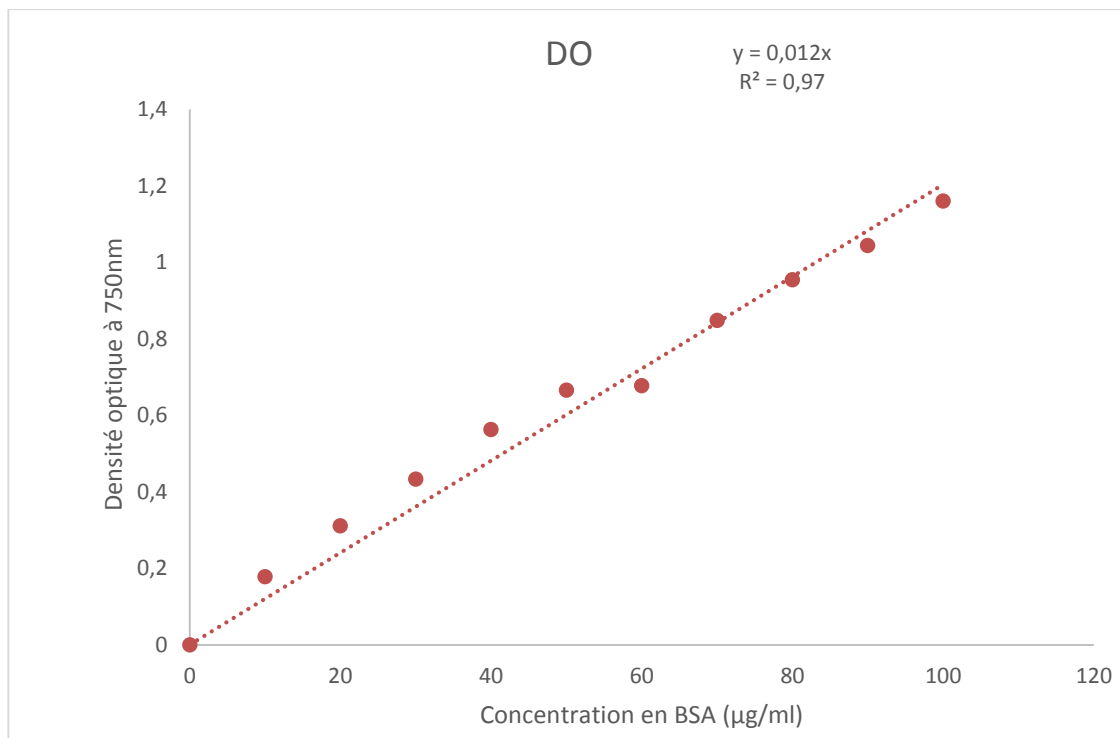
La caractérisation des extraits enzymatiques consiste en la détermination de leur teneur en protéines, par la méthode LOWRY *et al* (1951), et leurs activités coagulantes et protéolytiques.

#### 2.2.2.1. 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 Follin-Ciocalteu à une solution protéique donne une coloration bleue foncée. Cette coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique 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 4). Le mode opératoire est présenté en (annexe 1).



**Figure 4 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al*, (1951).**

#### 2.2.2.2. 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 10%) 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  $\text{CaCl}_2$  (0,01M) et ajustement du pH à 6,5 par l'ajout d'une solution de NaOH (0,1N). (Figure 5).

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.

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).

### **.2.2.2.2.1. Détermination de la température optimale de l'extrait de caillette de dromadaire**

Pour la détermination de la température optimale de notre extrait coagulant, l'extrait enzymatique a été porté à différentes températures allant 25 à 65°C pendant 1h. L'effet de la température est déterminé par la mesure du temps de coagulation.

### **2.2.2.2.2. Détermination du pH optimal de l'extrait de caillette de dromadaire**

Le pH optimal de notre extrait a été déterminé en le faisant incubé pendant 1h dans des solutions de pH varier allant de pH 2,2 à 9 L'effet du pH est déterminé par la mesure du temps de coagulation.

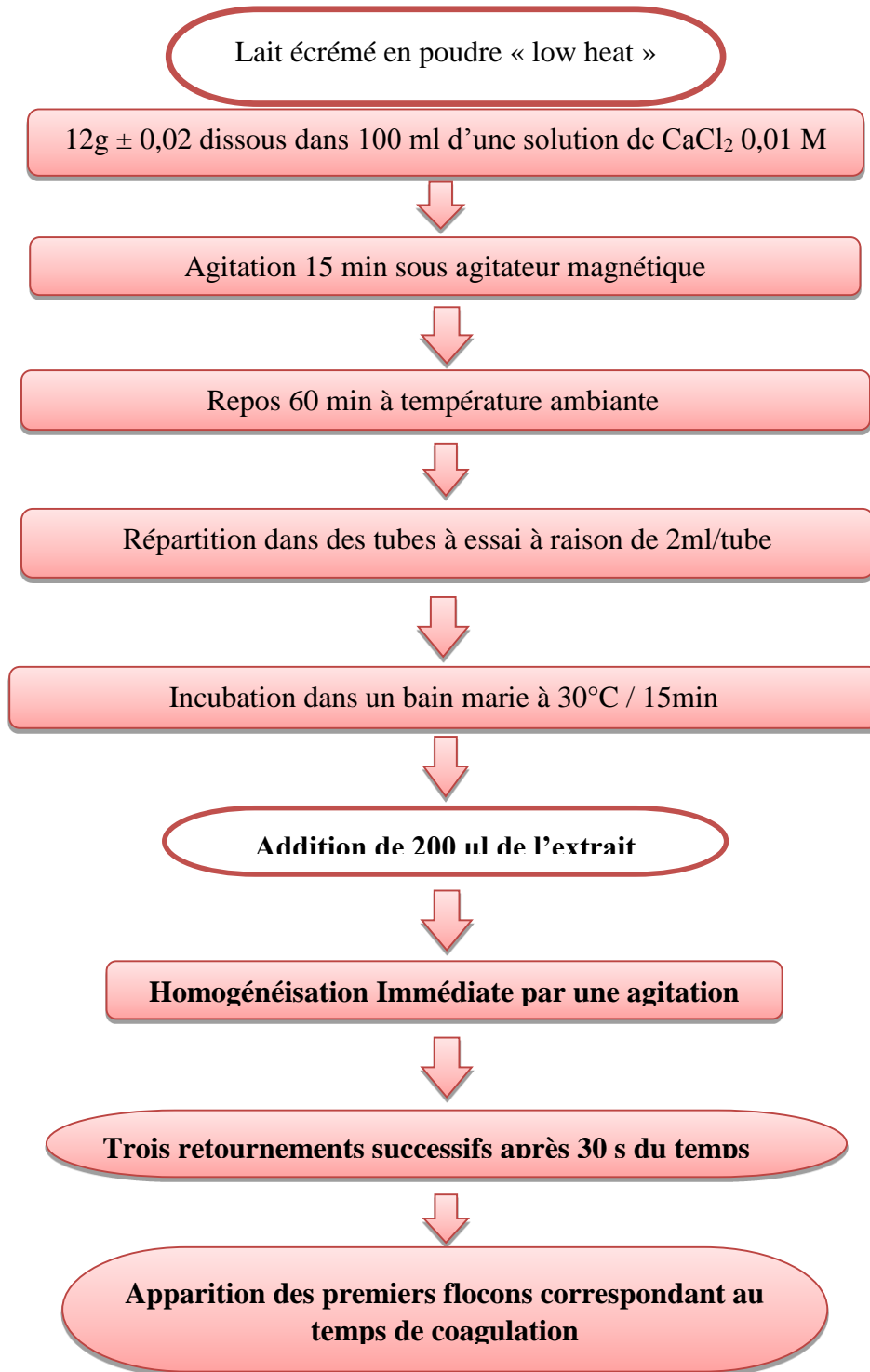


Figure 5 : Mesure du temps de floculation par la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN *et al*, (1977).

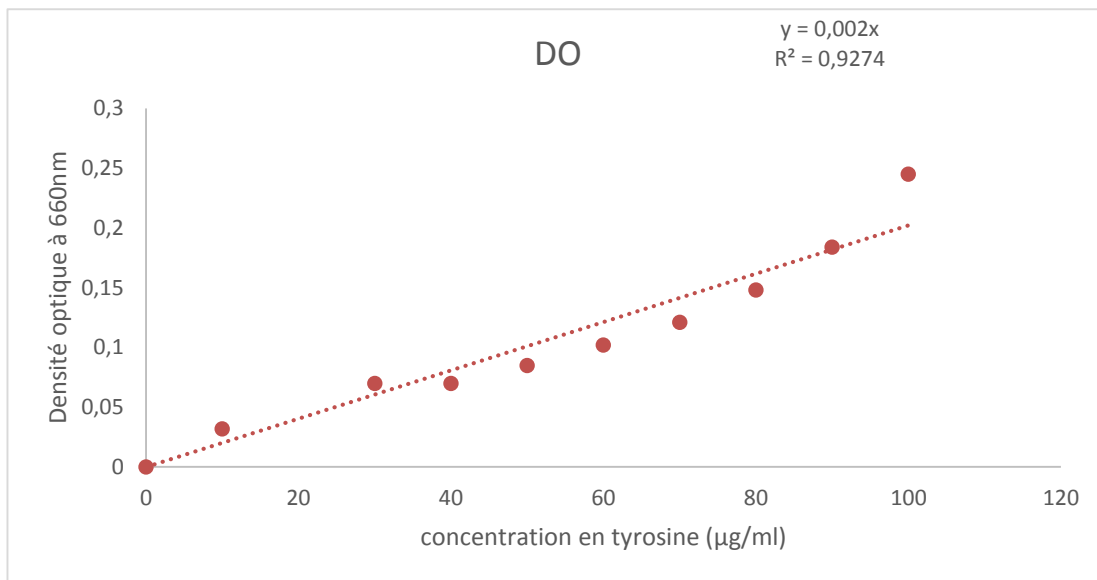
### 2.2.2.3. Mesure de l'activité protéolytique

La mesure de l'activité protéolytique des extraits coagulants est déterminée par la méthode d'ARIMA et al (1968) (annexe 02).

L'objectif de cette mesure est l'évaluation du taux de dégradation du substrat (Caséine bovines et caséines camelines) pendant la réaction enzymatique. Pour cela, on mesure la concentration en produits d'hydrolyse des caséines bovines solubles dans de l'acide trichloracétique (TCA) à 0,44 M. Le dosage des peptides solubles a été effectué à 660 nm.

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 un courbe étalon établie à partir de concentrations croissantes en tyrosine, variant de 10 à 100  $\mu\text{g/ml}$  et à 660 nm (Figure 6).

Pour l'étude de l'activité protéolytique, la concentration des extraits coagulants est ajustée de façon à obtenir un temps de coagulation voisin de 2 minutes, selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante.



**Figure 6 : Courbe d'étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951).**

### 2.2.3. Détermination des paramètres physico-chimiques du lait

Nous avons effectué des analyses physico-chimiques du lait bovin afin de connaître son état de fraîcheur et sa qualité.

#### 2.2.3.1. Mesure du pH

La détermination du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre, en introduisant directement les deux sondes (pH et température) dans un échantillon de lait à une température de 20 à 25°C. La lecture est faite après la stabilisation de la valeur du pH.

### 2.2.3.2. Détermination de l'acidité titrable en degrés dornic (D°)

En entend par acidité titrable du lait, celle exprimée conventionnellement en gramme d'acide lactique par litre du lait (LUQUET, 1985).

Il s'agit d'un titrage acido basique, l'acide lactique est neutralisé par une solution de NaOH (N/9) en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré.

Cette méthode consiste introduire dans un bécher 10 ml de lait à analyser, auxquels on ajoute 2 à 3gouttes de l'indicateur coloré, titrer avec la solution NaOH jusqu'à l'apparition d'une coloration rose.

**Lecture :**  $AT = V \times 10 (D^\circ)$  ( AT : acidité titrable / V : volume en ml de NaOH).

### 2.2.3.3. Mesure de la densité du lait

La densité du lait est le rapport des masses volumiques du lait et de l'eau à 20°C et à la même pression. Elle est mesurée par un lactodensimètre, renfermant un thermomètre. Le lait est versé dans l'éprouvette de 250ml, ensuite plonger le lactodensimètre dans l'éprouvette pleine, il faut maintenir l'appareil verticalement et lire quand il est immobile au sommet du ménisque.

Le lactodensimètre donne une valeur exacte à une température de 20 °C.

- Si la  $T^\circ > 20$  alors  $D = D^\circ + 0,2 (T^\circ - 15^\circ C)$ .
- Si la  $T^\circ < 20$  alors  $D = D^\circ - 0,2 (T^\circ - 15^\circ C)$ .
- Si la  $T^\circ = 20$  alors la densité reste la même.

### 2.2.3.4. Détermination de la teneur en matière grasse par la méthode de GERBER

La méthode acido-butyrométrique basée sur la dissolution des protéines et la séparation complète des lipides, par l'acide sulfurique sous l'action d'une force centrifuge. L'addition d'un petit volume d'alcool iso-amylique (3-méthyl-1-butanol) favorise l'opération et crée une séparation de la matière grasse. Après le positionnement des butyromètres sur un support, un volume de 10 ml d'acide sulfurique à 91 % est versé. Aussitôt, 11 ml de lait est introduit sans se mouiller le cou du butyromètre. Ensuite, 1ml d'alcool iso-amylique est déposé sur le lait. Le butyromètre est agité énergétiquement jusqu'à dissolution des protéines. Enfin, les butyromètres sont centrifugés à 65°C pendant 3 à 5 minutes à 350 tours/min.

### 2.2.4. Étapes de fabrication du Camembert

Nous avons procédé à la fabrication d'un fromage à pâte moelle de type camembert. Trois modèles de camemberts ont été fabriqués selon le processus de fabrication de la laiterie de Drâa Ben Khedda. (Figure 7) :

- Camembert fabriqué avec extrait enzymatique de dromadaire (ECD A)
- Camembert fabriqué avec la CHY-MAX M et le camembert fabriqué avec la CHY-MAX R (TASSILI), utilisés comme témoins.

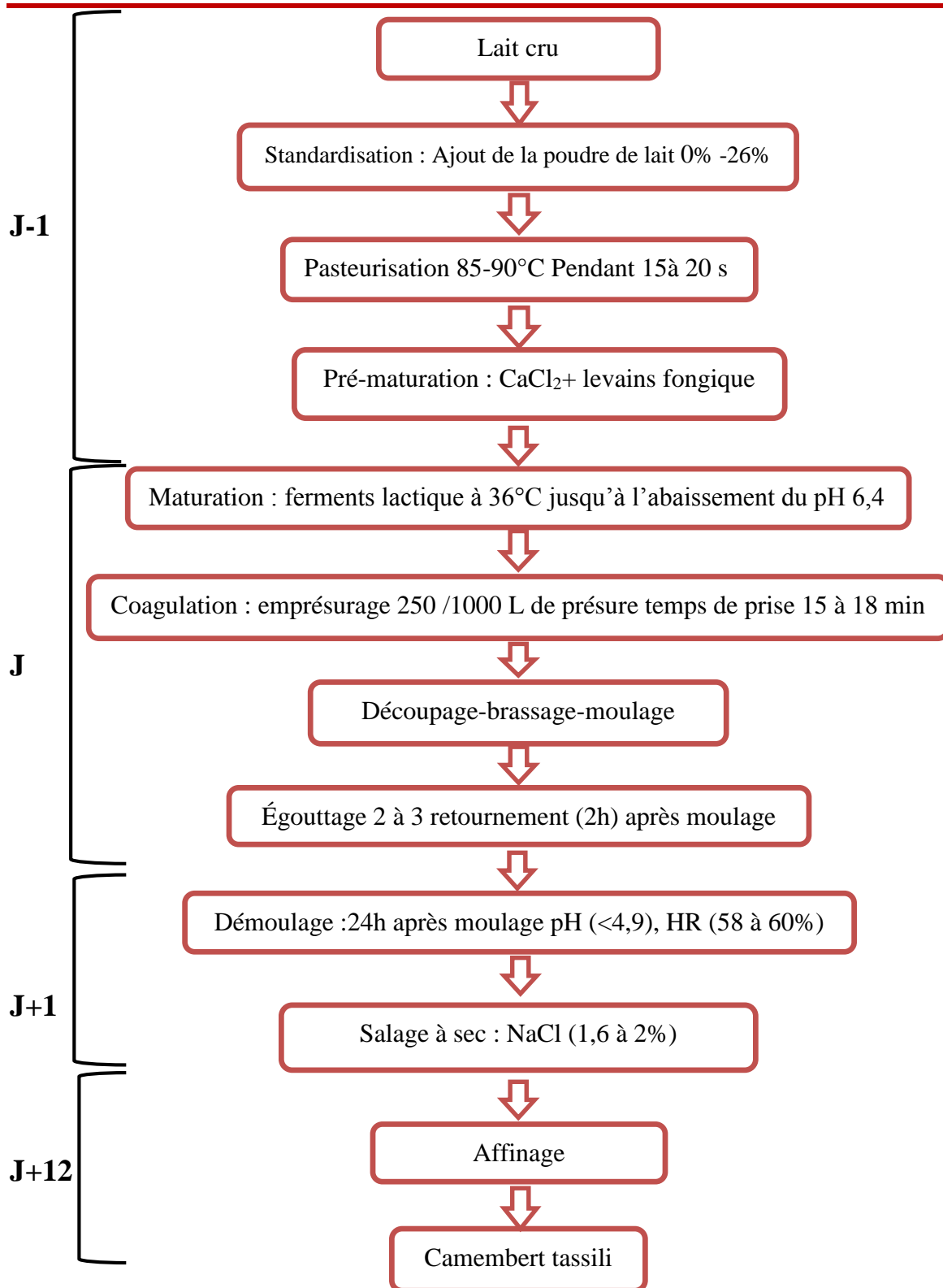


Figure 7 : Diagramme de fabrication du camembert « Tassili » à l'unité

DBK.

## 2.2.5. Analyse du Camembert

### 2.2.5.1. Méthodes d'analyse physico-chimiques du Camembert durant l'affinage

Un suivi de l'affinage a été effectué sur le camembert. Des échantillons de fromage ont été prélevés à différents jours de l'affinage (J1- J6- J12-J21-J28-J35) afin d'effectuer des analyses physico-chimiques (pH – MG – ESD – EST).

#### 2.2.5.1.1. Détermination du pH

Le pH a été déterminé en utilisant le pH-mètre. La méthode consiste à introduire l'électrode au cœur du fromage, puis lire la valeur du pH sur l'écran du pH-mètre.

#### 2.2.5.1.2. Détermination de la matière grasse par la méthode de VAN GULIK

Le taux de la matière grasse de fromage est déterminé selon la méthode acido-butyrométrique. Pour cela, 3g de l'échantillon de fromage ont été pesés dans un godet en verre préalablement taré. Ensuite, le butyromètre est recouvert avec l'acide sulfurique à 62 % jusqu'à l'immersion totale de l'échantillon, puis placé dans un bain marie à 80°C jusqu'à dissolution complète de fromage. Un volume de 1ml d'alcool iso-amylique est ajouté, ensuite de l'acide sulfurique jusqu'à la marque 15 % de l'échelle. Enfin, le butyromètre est centrifugé pendant 3 à 5 minutes à 350 tours/min à 65°C.

#### 2.2.5.1.3. Détermination de la teneur en extrait sec totale (EST), extrait sec dégraissé (ESD) et l'humidité

Cette méthode est basée sur l'évaporation d'une certaine quantité d'eau de Camembert par l'émission des radiations infrarouges à l'aide d'un dessiccateur, à une température qui varie de 105°C jusqu'à 165°C.

La valeur de l'EST est exprimée en pourcentage et l'ESD est calculé par la formule suivante :  $ESD = EST - MG$ , tandis que l'humidité est calculée comme suivant :  $H (\%) = 100 - EST$  avec : EST : c'est l'extrait sec total, ESD : c'est l'extrait sec dégraissé, MG : c'est la matière grasse.

### 2.2.5.2. Analyses sensorielles

L'évaluation sensorielle des aliments est une technologie dont l'objectif est la détermination des propriétés sensorielles ou organoleptiques des aliments et la recherche des préférences ou aversions pour ces aliments qui déterminent ces propriétés sensorielles. (PATRICK *et al*, 2009).

Le principe consiste à présenter à un sujet un échantillon de fromage pour lequel il doit préciser toutes les observations visuelles ou dégustation. Les caractéristiques sensorielles du camembert sont évaluées par des observations visuelles et des dégustations par un groupe de 11 personnes qui travaillent au sein de la laiterie de DBK

L'objectif de cette analyse consiste à donner le profil sensoriel global du fromage, en mettant à la disposition des dégustateurs une fiche de dégustation. Cette fiche permet de porter un jugement qualitatif sur les fromages en notant différents descripteurs : l'odeur du produit entier,

l'aspect de la croûte et de la pâte, la texture en bouche de la pâte ainsi que la flaveur (goût et saveur). Les trois fromages ont été codés :

- Modèle 1 : fromage fabriqué par l'extrait de caillette de dromadaire.
- Modèle 2 : fromage fabriqué par la CHY-MAX R (TASSILI).
- Modèle 3 : fromage fabriqué par la CHY-MAX M.

Les échantillons ont été présentés en même temps et déposés dans un ordre aléatoire. Les dégustateurs doivent individuellement évaluer chaque fromage selon les caractères prédéfinis. Lorsqu'ils passent d'un échantillon à un autre, ils doivent se rincer la bouche avec de l'eau afin d'effacer le goût de l'échantillon précédent.

## **Résultats et discussion**

### III. Résultats et discussion

#### 3.1. Teneur en protéines de l'extrait de caillette de dromadaire adulte

La teneur en protéines de notre ECD A est de 0,74 mg/ml. Cette valeur semble être faible par rapport à celles obtenues par BOUDJENAH-HAROUN, (2014). En effet, Les teneurs protéiques des extraits ont tendance à augmenter en fonction de l'âge de l'animal dont ils sont issus. VALLES et FURET, (1977) ont constaté que la richesse enzymatique des caillettes dépend de la race, de l'âge et du sexe de l'animal.

#### 3.2. Les facteurs affectants l'activité coagulante de l'extrait de caillette de dromadaire adulte

La mesure du temps de coagulation selon la méthode de BERRIDGE (1945), a permis de calculer l'activité coagulante exprimée par le nombre d'unité présure (UP). Les conditions de floculation ont été optimisées en faisant varier la température et le pH. Les résultats sont représentés par les (figures 9 et 10).

##### 3.2.1. Effet de la température sur l'activité coagulante des extraits coagulants

Les résultats obtenus montrent qu'à des températures de 25°C à 45°C, l'activité coagulante de la chymosine bovine recombinante (CBR), chymosine cameline recombinante (CCR) et ECD A augmenté progressivement, tandis que, pour la pepsine bovine(PB), son activité coagulante ne cesse d'augmenter jusqu'à une température de 50°C.

La meilleure activité coagulante pour ECD A a été observée à 45°C. Au-delà de cette valeur, l'activité baisse et fini par s'annuler à 65°C. Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2012), qui ont démontré que l'ECD A possède une activité coagulante maximale à une température de 42°C.

Une température optimale similaire à celle de l'ECD A (45°C) a été obtenue pour la CBR et CCR, tandis que pour la PB, son activité coagulante est maximale à 50°C.

La température optimale de l'activité des enzymes coagulantes se situe pour la plupart au voisinage de 40-50°C. Au-dessus de cette valeur se produit une dénaturation progressive de l'enzyme jusqu'à 65°C où l'enzyme devient inactive (RAMET, 1997). Au-dessous de 10°C l'enzyme devient inactive et entre 10-20°C l'activité est faible (TROCH *et al*, 2017).

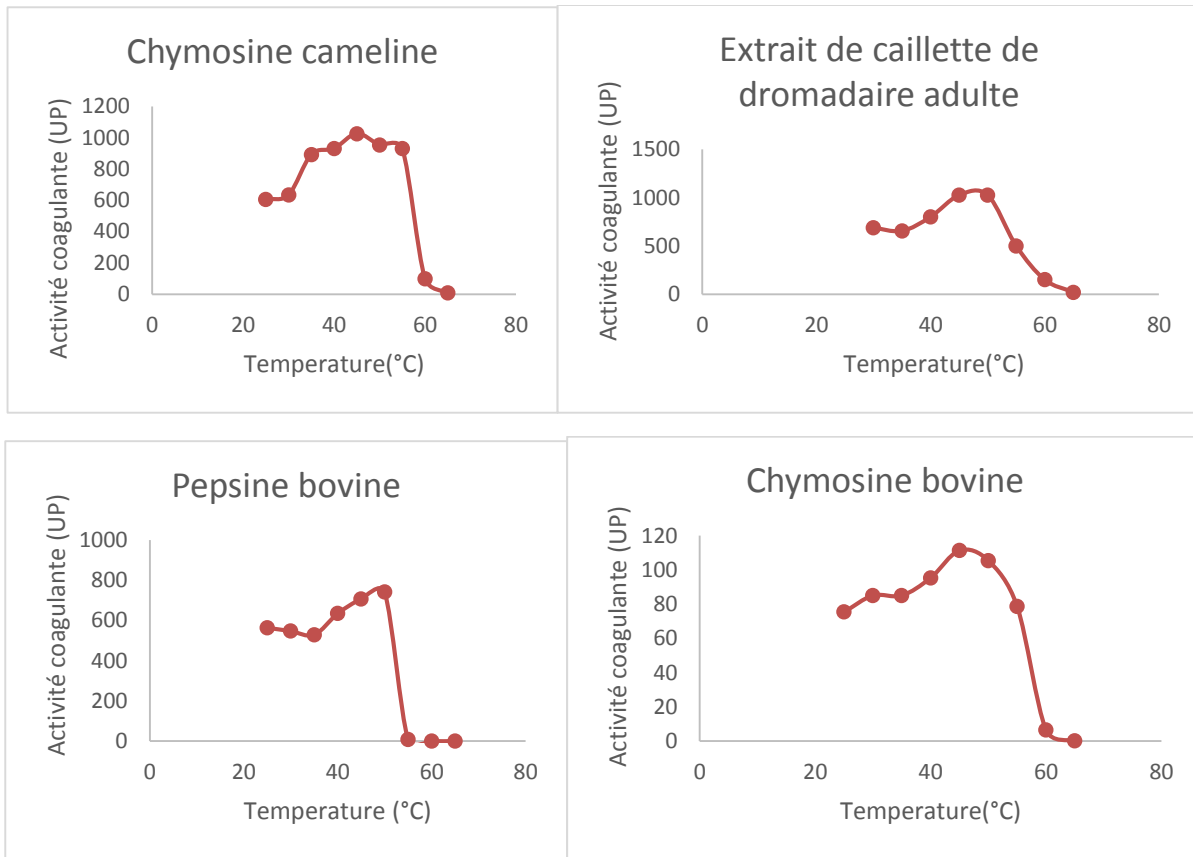
D'après NOUANI *et al* (2002), l'activité de la pepsine de poulet atteint son maximum à une température de 40°C.

D'après KAPPELER *et al* (2006), la chymosine cameline recombinante présente une activité maximale à une température de 40°C et au-dessus de 55°C l'enzyme devient inactive.

MAHMOUD SALEHI *et al* (2017), ont montré que la température optimale d'une protéase aspartique de *Withania Coagulans* (enzyme d'origine végétale) est de 65°C.

BELHAMICHE (2005) a indiqué une température optimale d'action pour la coagulase purifiée de *Mucor pusillus* est de 50°C. MATOUB (2000) a trouvé une température optimale d'action de 60°C pour la coagulase purifiée de *Bacillus subtilis*.

Les enzymes coagulantes d'origine microbienne et végétale semblent avoir la thermostabilité la plus importante par rapport à celles issues d'autres organismes.



**Figure 8 : Influence de la température sur l'activité coagulante de la PB, CBR, CCR et ECD A.**

### 3.2.2. Effet du pH sur l'activité coagulante des extraits coagulants

Des études montrent que l'activité enzymatique dépend du pH de la solution tampon utilisée.

L'évolution du temps de floculation du lait bovin en fonction du pH (figure 2), montre que le pH optimum de l'ECD A est de 4. Cette valeur obtenue est similaire à celle de la CBR, quant à la CCR et PB leur activité est maximale à un pH plus acide (pH 2).

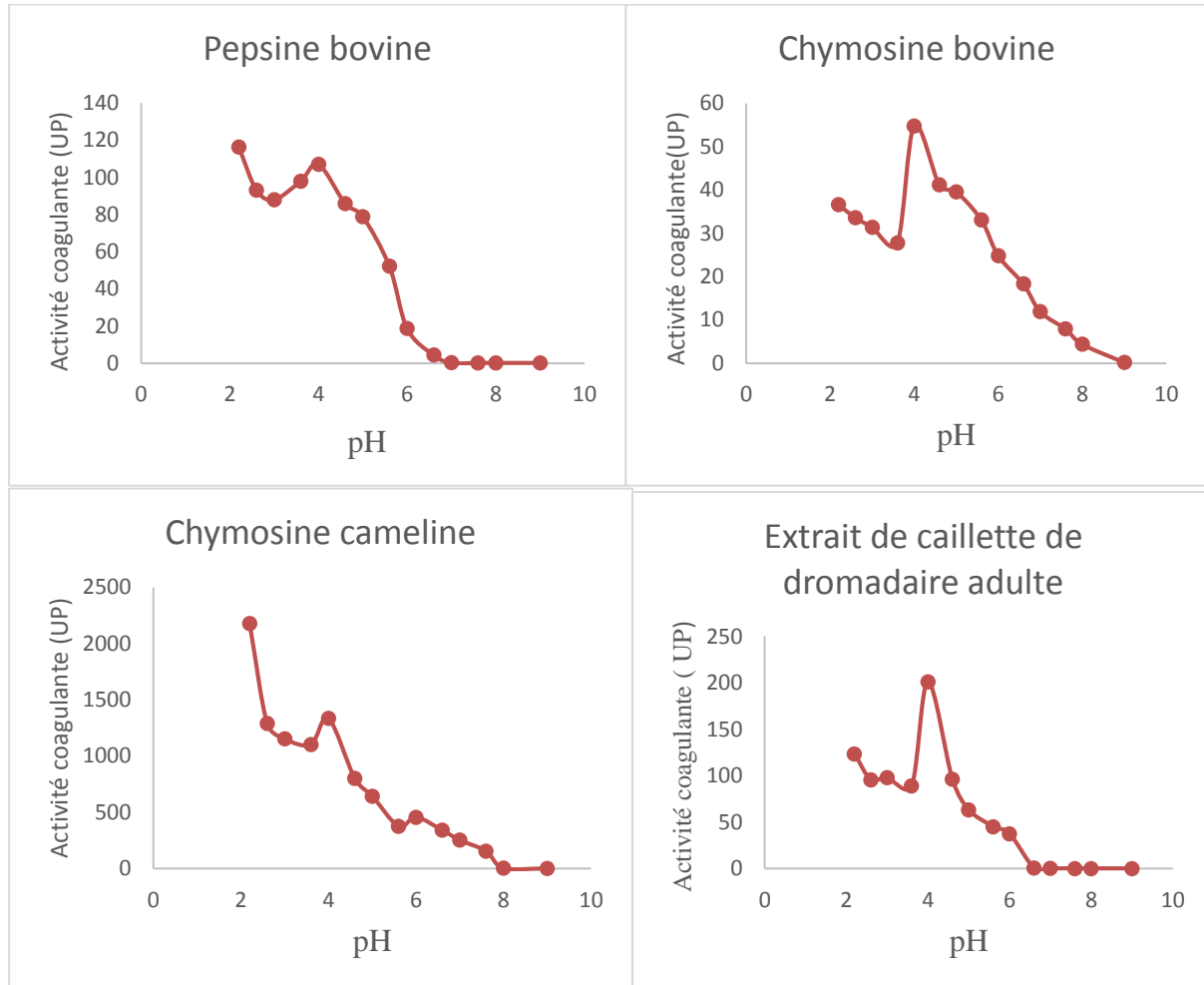
Au-delà du pH optimum, l'activité coagulante de chaque enzyme diminue progressivement jusqu'à atteindre la plage de pH de 7 à 9 où le lait ne coagule pas, cela pourrait être dû à l'inactivation complète de chaque enzyme.

Les enzymes d'origine végétale possèdent une activité coagulante maximale à des pH un peu plus élevés. En effet, MORSLI (1997) a signalé que la cynarase de l'artichaut et la ficine de latex de figuier présentent une bonne activité coagulante jusqu'à pH 6,6 alors que, MOUZALI (2001) indique un pH optimum d'action égal à 5,2 pour l'extrait brut de cardon.

Selon ROPOSO *et al* (2008), l'activité coagulante de la protéase *centaurea calcaptrapa* atteint son maximum à un pH de 5,5.

MEZINA *et al* (2001), ont montré que la chymosine de mouton recombinante est stable à pH acide, bien qu'aucune activité coagulante ne se manifeste à pH 7.

Selon Lenoir *et al* (2006), les enzymes coagulantes d'origine animale sont inactivées à pH supérieur à 7, ce qui concorde avec les résultats trouvés ci-dessous.

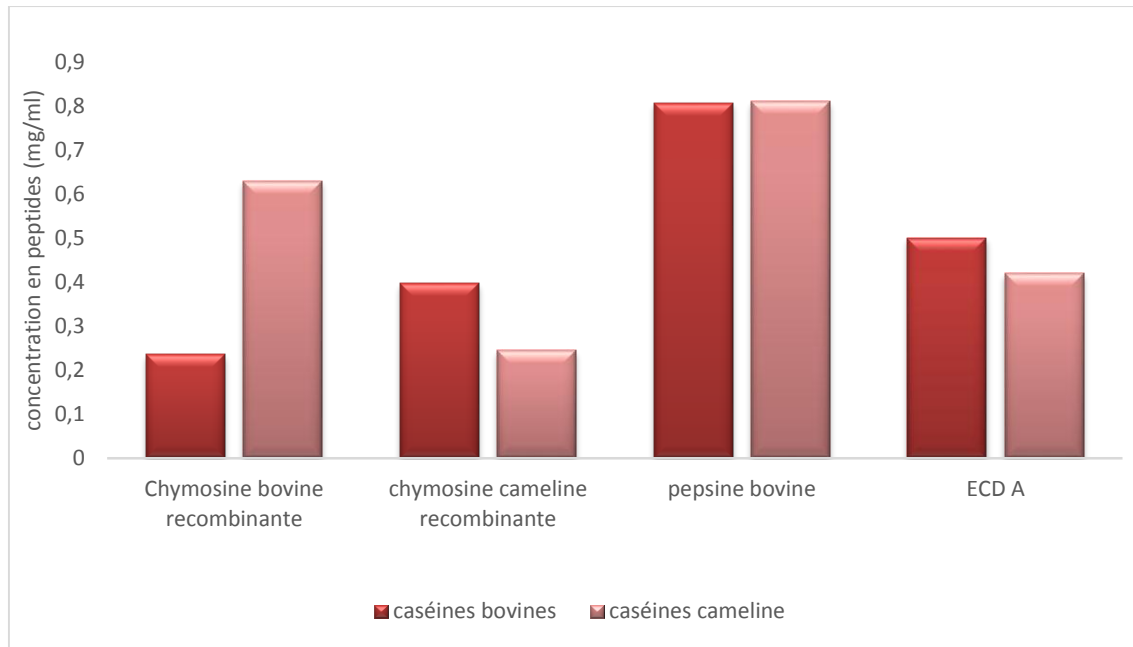


**Figure 9 : Influence du pH de la PB, CBR, CCR et ECD A sur l'activité coagulante.**

### 3.3. Mesure de l'activité protéolytique

La mesure de l'activité protéolytique (AP) des enzymes nous permet de caractériser le pouvoir protéolytique de chacune, par la mesure du taux de peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des caséines bovines et camelines par la chymosine bovine, cameline, pepsine bovine et ECD A obtenu par la mesure de l'absorbance à 660nm. (Figure 8).

Nous avons employé la chymosine cameline recombinante (CCR), chymosine bovine recombinante (CBR) et la pepsine bovine (PB) comme témoins.



**Figure 10 : Taux de peptides issus de la protéolyse des caséines bovines et camelines par la CCR, CBR, PB et ECD A.**

D'après la figure, on constate que l'activité protéolytique la plus élevée sur les caséines bovines est observée chez la PB suivie par l'ECD A puis la CCR et enfin la CBR qui présente l'activité protéolytique la plus faible.

Sur les caséines camelines, on a noté une plus grande activité protéolytique chez la PB suivie par CBR puis l'ECD A et enfin la CCR.

La CBR semble avoir une activité protéolytique beaucoup plus élevée sur les caséines camelines que sur les caséines bovines par rapport aux autres enzymes.

La PB réagit d'une manière identique vis-à-vis des caséines camelines et bovines.

Selon BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2014), l'activité protéolytique des ECD diffère selon l'âge du dromadaire.

Les enzymes possédants une activité protéolytique élevée sont généralement indésirables en technologie laitière car, une quantité de peptides libérés de cette hydrolyse enzymatique élevée, serait à l'origine du développement d'amertume dans le fromage.

### **3.4. Détermination des paramètres physico-chimiques du lait bovin destiné à la fabrication des camemberts**

Les résultats des analyses physico-chimiques du lait bovin utilisé pour la fabrication du fromage à pâte molle type Camembert sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 9 : Résultats des analyses physico-chimiques du lait bovin.**

	Acidité	pH	MG	Densité	E.S.T
<b>Lait bovin cru</b>	19°	6,61	29g/l	1030,9	113 g/l
<b>Normes FIL-AFNOR</b>	16-18	6,6-6,8	32-36	1028-1033	102-125

La valeur du pH (6,61) du lait utilisé pour la fabrication du camembert est conforme aux normes AFNOR (6,6-6,8), tandis que l'acidité titrable (19°) est supérieure à la norme AFNOR (16-18°). Une acidité de 19° montre qu'il y'a une accumulation de l'acide lactique dans le lait.

Le pH et l'acidité dépendent de la teneur en caséines, en sels minéraux et en ions (ALAIS, 1984), des conditions hygiéniques lors de la traite, de la flore microbienne totale et son activité métabolique (MATTIEU, 1998) et de la manutention du lait.

La densité du lait mesurée à 20°C (1030,9) est en accord avec l'intervalle (1028-1032) avancé par l'AFNOR.

La densité du lait varie selon le taux de matière sèche et de matière grasse (elle diminue avec l'augmentation de la matière grasse) (Le MENS, 1985), elle dépend aussi de l'augmentation de la température et des disponibilités alimentaires (MATTIEU. J, 1998).

La valeur de la matière grasse (29g/l) est plus faible que la norme fixée par l'AFNOR (32-36g/l). La variabilité de la teneur en matière grasse dépend des facteurs tels que les conditions climatiques, le stade de lactation et l'alimentation (LABIOUI *et al*, 2009).

La valeur de l'extrait sec (113g/l) est dans l'intervalle de la norme AFNOR (102-125g/l). Celle-ci semble faible par rapport à celle du lait bovin : 128 g/l selon (ALAIS, 1984), lait humain (129 g/l). La valeur de l'extrait sec dépend des facteurs climatiques, alimentaires et également de la race (LABIOUI *et al*, 2009).

### **3.5. Détermination des paramètres physico-chimiques des camemberts aux différents stades d'affinage**

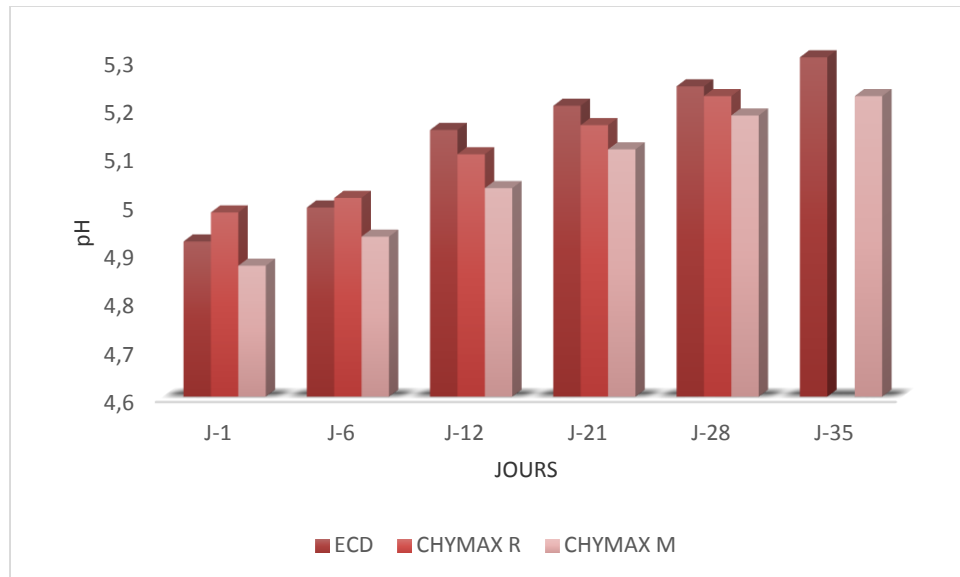
Le suivi de l'affinage a été réalisé en mesurant les différents paramètres des trois fromages. Celui fabriqué avec ECD A et deux autres fromages utilisés comme témoins : le fromage à base de la Chymax-R et le fromage fabriqué avec la Chymax-M.

#### **3.5.1. Évolution du pH au cours de l'affinage pour les trois Camemberts**

D'après la figure, Les valeurs du pH pour les trois modèles augmentent progressivement au cours de l'affinage du J-1 au J-35.

Selon VASSAL *et al* (1986), cette augmentation est due à la désacidification du fromage par la consommation de l'acide lactique et la production de composés alcalins par la flore de surface principalement le pénicillium, ce qui provoque le ramollissement de la pâte du camembert.

KIKUCHI *et al* (1974), a signalé que le pH acide des pâtes au dernier jour d'affinage assure la protection ultérieure du produit, par la réduction des activités enzymatiques, protéolytiques et lipolytiques qui seraient plus active à un pH proche de la neutralité.



**Figure 11 : Suivi de l'évolution du pH au cours de l'affinage pour les trois camemberts.**

### 3.5.2. Évolution de l'humidité au cours de l'affinage pour les trois Camemberts

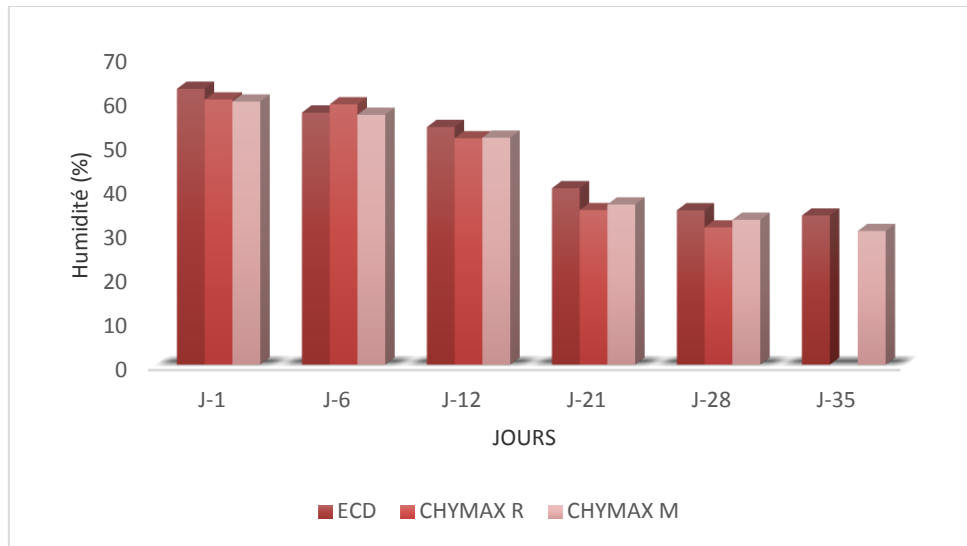
L'humidité est le critère physicochimique qui détermine la consistance et la fermeté des fromages, aussi elle joue un rôle important dans la conservation du produit fini.

Les résultats expérimentaux obtenus révèlent une diminution de l'humidité avec le temps dans les trois types de fromage.

L'hygrométrie étant inférieure à 100 %, il se produit toujours une évaporation de l'eau contenue dans le fromage vers l'ambiance.

Cette perte d'eau varie fortement d'un type de fromage à un autre en fonction de diverses caractéristiques de celui-ci, à savoir : la teneur en eau totale, la surface spécifique du fromage qui détermine l'importance de la surface d'évaporation, l'état de liaison de l'eau, l'état de surface des fromages et le temps de séjour dans les locaux d'affinage.

Il convient de noter par ailleurs que les réactions d'ordre biochimique intervenants dans le substrat en cours d'affinage correspondent, pour la plupart, à des réactions d'hydrolyse qui fixent l'eau ; en conséquence, elles entraînent une diminution de l'eau libre et donc celle de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) (FAO, 1998).



**Figure 12 : Suivi de l'évolution de l'humidité au cours de l'affinage pour les trois camemberts.**

### 3.5.3. Évolution de la matière grasse au cours de l'affinage pour les trois Camemberts

Les résultats expérimentaux obtenus révèlent une augmentation du taux de matière grasse au cours de l'affinage dans les trois types de camemberts.

Les valeurs passent de 17 g/l (j=1) à 22,5 g/l (j=35) pour le fromage à base de l'ECD. De 26 g/l (j=1) à 22 g/l (j=35) pour le fromage à base de la Chy-M et pour le fromage préparé à base de lait de la Chy-R de la crème fraîche, il passe de 21 g/l (j=1) à 26 g/l (j= 28).

Cette augmentation peut être attribuée à la concentration des composants du fromage suite à la perte d'eau par évaporation et l'activité des lipases.

Cependant, le taux de matière grasse du camembert fabriqué à partir de notre extrait est très faible par rapport aux deux autres camemberts. Cela pourrait être expliqué par une perte de la MG dans le lactosérum lors de l'égouttage.

Selon MAHAUT et al (2000), l'activité des lipases est maximale dans un intervalle de pH de 7,5 à 9,0.

D'après CHOISY et al (1997), les microorganismes les plus lipolytiques des fromages sont les moisissures telle que le *Penicillium*, qui peut produire de grandes quantités de lipases extracellulaires.

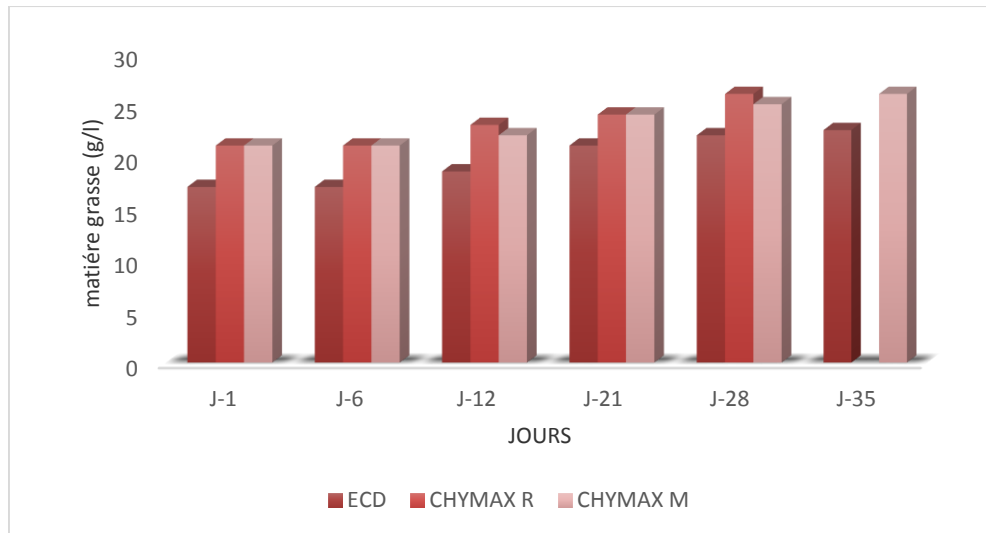


Figure 13 : Suivi de l'évolution de la MG au cours de l'affinage pour les trois camemberts.

### 3.5.4. Évolution de l'extrait sec totale au cours de l'affinage pour les trois Camemberts

La figure 14 montre que l'EST évolue dans le même sens pour les trois types de fromages au cours de l'affinage.

Selon BERTOLINO *et al* (2011), cette augmentation est due à la déshydratation du fromage lors de l'affinage. Ce phénomène est causé par la perte d'eau et les échanges de composés volatils (ammoniac, acide gras volatil...) entre la surface du fromage et l'environnement de la salle d'affinage.

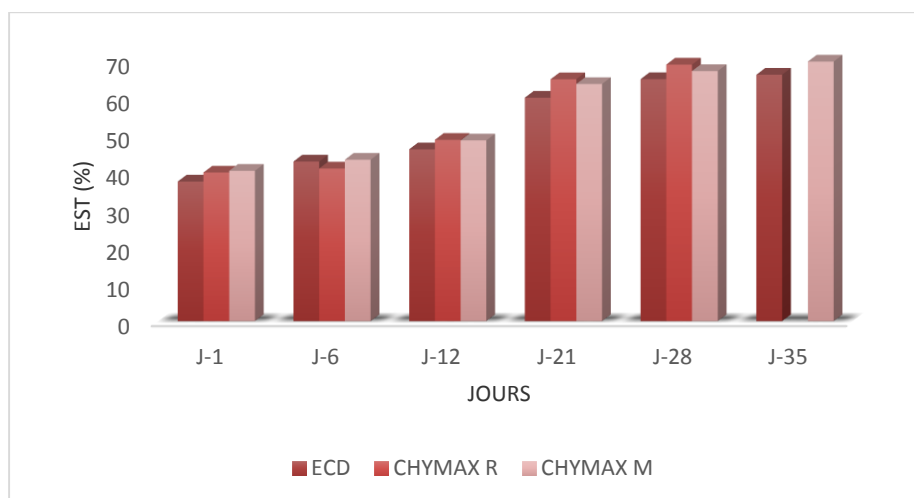


Figure 14 : Suivi de l'évolution de l'EST au cours de l'affinage pour les trois camemberts.

### 3.5.5. Évolution de l'extrait sec dégraissé des fromages au cours de l'affinage

L'extrait sec dégraissé augmente avec le temps de maturation du fromage. Les valeurs passent de 35,85 g/l (j=1) à 61,73 g/l (j=35) pour le fromage à base de l'ECD. De 38,32 g/l (j=1) à 64,69 g/l (j=35) pour le fromage à base de la Chy-R et pour le fromage préparé à base de la Chy-M, il passe de 37,86 g/l (j=1) à 63,88 g/l (j=28). Cela n'est qu'une conséquence logique des constatations faites pour les paramètres précédents à savoir l'EST et la MG.

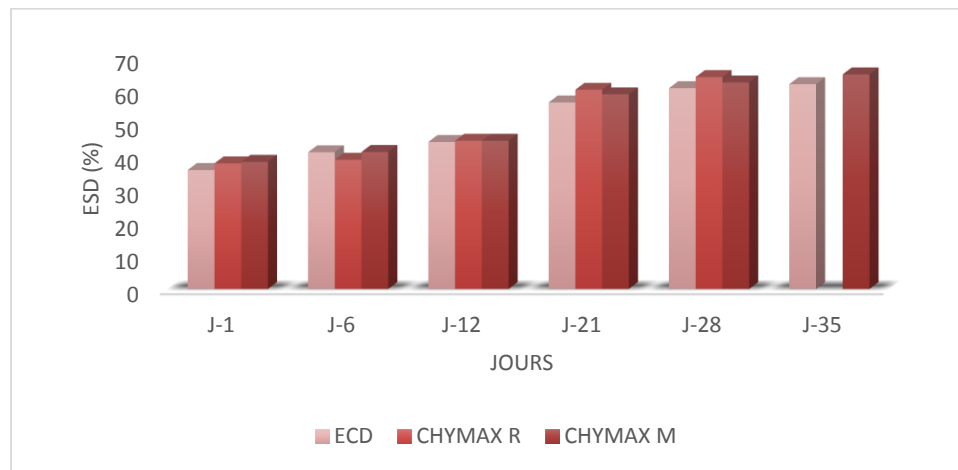


Figure 15 : Suivi de l'évolution de l'ESD au cours de l'affinage pour les trois camemberts

### 3.6. Analyse sensorielle

L'évaluation sensorielle permet de mettre en évidence les différences qui existent entre les trois types de camembert pour chaque caractéristique (Aspect, goût, texture, odeur). Les résultats sont représentés dans le tableau 10.

#### 3.6.1. L'aspect visuel

D'après les résultats du tableau, on constate que les dégustateurs ont apprécié différemment la couleur de la pâte. En effet, l'aspect de la couleur jaune est prépondérant par rapport à l'aspect blanchâtre, ceci on le remarque pour les trois types de camembert.

Selon CHEFTEL *et al* (1984), cette différence de couleur peut être due à l'EST, l'ESD et à la MG du fromage.

Les caroténoïdes des produits laitiers sont responsables de la coloration jaune des produits laitiers et des tissus adipeux bovins (PRACHE *et al*, 2002).

On constate aussi que du point de vu croûte, il n'existe aucune différence entre les trois camemberts obtenus avec différents agents coagulants. Les trois modèles semblent avoir une croûte totalement fleurie ce qui signifie un bon affinage.

### 3.6.2. Le goût et l'odeur

Sur le plan gustatif, l'observation montre une saveur acide et salée pour le camembert fabriqué à base de CHY-MAX M et celui fabriqué à base de CHY-MAX R, tandis que le camembert fabriqué à base de l'ECD possède un goût amer légèrement acide. La salinité est due probablement à un saumurage excessif.

Les arômes de ce type de fromage sont principalement issus des activités enzymatiques des levures et des moisissures utilisées pour leur affinage. Ils sont généralement issus du catabolisme des protéines et des peptides.

Selon HARDY et SCHER (2006), l'activité protéolytique des penicilliums dans les fromages à pâte molle type camembert est prédominante et conduit à la formation de peptides. Ces peptides peuvent être responsables d'une certaine amertume.

En ce qui concerne l'odeur, d'après les résultats du tableau ci-dessus, les trois camemberts ont une odeur lactique.

### 3.6.3. La texture

Les résultats de la texture révèlent une similarité entre le camembert fabriqué à base de l'ECD et celui à base de CHY-MAX M pour les caractères dur et friable, par rapport au camembert fabriqué à base de CHY-MAX R qui est mou et fondant.

Selon HARDY et SCHER (2006), le PH et l'EST sont les deux paramètres qui agissent sur la fermeté du fromage de type camembert.

La teneur en sel et en eau a un effet important sur la dureté de la pâte (HARDY et SCHER, 2006). Ce qui pourrait être le cas de nos deux camemberts fabriqués à base de l'ECD et la CHY-MAX M.

BUGAUD *et al* (2002), ont montré que la pâte peut être influencée par la nature des acides gras. Plus il y'a de longs acides gras insaturés dans la composition du fromage, plus la fermeté est faible.

### 3.6.4. Appréciation du produit

Les résultats finaux de dégustation montrent que les dégustateurs trouvent les camemberts fabriqués à base de CHY-MAX M et CHY-MAX R plus agréables par rapport à celui fabriqué à base de l'ECD qui est jugé moyennement agréable.

**Tableau 10 : résultats de l'analyse sensorielle des trois camemberts.**

Paramètre		Fromage à base de l'ECD	Fromage à base de Chy-R	Fromage à base de Chy-M	
<b>Aspect visuel</b>	<b>Couleur</b>	blanchâtre	36.36%	27.27%	45.45%
		jaunâtre	63.64%	72.73%	54.55%
	<b>Croûte</b>	totalement fleurie	100%	100%	100%
		Partialement fleurie	0%	0%	0%
<b>Aspect olfactif</b>	<b>Odeur</b>	Lactique	100%	100%	100%
		Animale	0%	0%	0%
<b>Aspect gustatif</b>	<b>Texture</b>	friable	27.27%	/	63.64%
		fondant	0%	45.45%	0%
		Dur	72,73	0%	36,36
		mou	0%	100%	0%
	<b>Goût</b>	amer	63.64%	0%	0%
		acide	36.36%	54.55%	63.64%
		salé	0%	45.45%	36.36%
<b>Appréciation du produit</b>		agréable	0%	100%	70%
		moyennement agréable	100%	0%	30%
		Désagréable	0%	0%	0%

## **Conclusion générale**

Les agents coagulants sont des enzymes protéolytiques très utilisés en industrie fromagère. Ils permettent la coagulation du lait et l'obtention d'un produit dérivé avec des caractéristiques bien définies.

En premiers lieu, l'extraction des enzymes coagulantes a été effectuée à partir de caillettes de dromadaire en adoptant un protocole d'isolement approprié. Un extrait brut (ECD) a été obtenu.

Cette préparation enzymatique ainsi que les témoins utilisés (CCR, PB, CB) ont été caractérisés par la mesure de leur activité coagulante à différentes conditions de température et de pH et de leur activité protéolytique.

Les résultats obtenus affirment que l'activité coagulante optimale des ECD est atteinte à une température de 45° et à un pH de 4. Quant à l'activité protéolytique, nous avons constaté que l'ECD possède une activité très élevée sur les caséines bovines que sur les caséines camelines.

En deuxième lieu, l'extrait brut a été utilisée afin de fabriquer un fromage à pâte molle de type Camembert à partir d'un lait bovin reconstitué (pH : 6,61, acidité :19°D, MG : 29 g/l, densité : 1030,9) au niveau de la laiterie-fromagerie de DBK. Trois modèles de Camembert ont été fabriqués, dont notre fromage et deux autres utilisés à titre comparatif (camembert fabriqué à base de la CHY-MAX M et le Camembert fabriqué à base de la CHY-MAX R). Un suivi des paramètres physico-chimiques (pH, MG, humidité, EST) durant l'affinage (J-1, J-6, J-12, J-21, J-28, J35) a été effectué sur les trois camemberts. Les résultats trouvés ont montré que les valeurs du pH et de la MG augmentent respectivement de 4,92 à 5,65 et de 17 à 22g/l, tandis que l'humidité diminue de 62,45% jusqu'à 33,82%. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés pour les deux camemberts fabriqués à base de la CHY-MAX R et de la CHY-MAX M.

En troisième lieu, nous avons réalisés des analyses sensorielles sur ces trois Camemberts. Les résultats obtenus ont montré que le camembert obtenu à base de notre extrait est de texture friable et dure avec une odeur lactique et forte et un gout amer.

Les résultats semblent être acceptables d'autant qu'ils montrent la possibilité d'obtention des extraits enzymatiques capable de remplacer la présure commerciale dans l'industrie fromagère en partant des pratiques traditionnelles. Ces extraits sont obtenus à partir de matières assez disponibles et inexploitable.

En perspectives, il est intéressant de poursuivre cette étude, notamment les points suivants :

- La purification de l'enzyme ;
- Une analyse microbiologique sur le camembert fabriqué à base de cet extrait brut ;
- L'incorporation de cet extrait dans la fabrication d'autres types de fromages à bases d'autres types de lait.

## **Références bibliographiques**

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

**ABOU EL-YAZID., ABD EL-SALAM B., ABD EL-HAMID., IBRAHIM O. et ABD EL-RAZEK EL-SAYED H. (2017).** Purification et caractérisation de l'enzyme de coagulation du lait de l'artichaut (*Cynara cardunculus* L.) Fleurs comme coagulant sur le fromage blanc à pâte molle. International. *Journal of Dairy Science.*, 12(4), 254-265.

**AFNOR. (1993).** Contrôle de la qualité des produits alimentaires : lait et produits laitiers : analyses physico-chimiques. Paris La Défense : AFNOR, 4e éd., 581Tome 2. Paris. *Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris, P : 354-367.

**AGUDOLO. (2004).** Kinetics of peptide fraction release during in vitro digestion of casein. *Jornal of the Science of Food and Agricultural.*, 84, p. 325-333.

**ALAIS C. (1984).** Principes des techniques laitières. *Science du lait*. Sepaic, Paris, 68p.

**ALAIS C. et LINDEN G. (1993).** Biochimie alimentaire. Masson, 2e éd paris. *Technologie de lait*, Québec, canada.

**AL-ALAWI A.A. and LALEYE L.C. (2011).** Characterization of camel milk protein isolates as nutraceutical and functional ingredients. Collaborative Research Project

Sultan Qaboos University, United Arab Emirates University.

**AI HADJ O.A. and AI KANHAL H.A. (2010).** Composition, technological and nutritional aspect of dromedary camel milk. *International Dairy Journal*, 1-11.

**AMIOT J., FOURNER S., LEBEUF Y., PAQUIN P., SIMPSON R. et TURGEON H., (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. *Science et technologie du lait – Transformation du lait.*, ISBN :3-25-29 (600 pages).

**AMIRA AB., BAUWENS J., DE PAUW E., BESBES S., ATIA H. et FRANCIS. (2017).** Identification of proteins from wild cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.) by a Proteomic approach. *Journal of Chemical Biology.*, 10, 25e33.

**ANDREN A. (2002).** Rennets and coagulants. *Encyclopedia of Dairy Science.*, Roginski H, Elsevier.

**ANDREEVA N.S. and RUMSCH 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 Science.*, 10,2439-2450.

**ANIFANTAKIS E.M. et KANDARAKISJ C. (1983).** Utilisations de pepsine bovine en fabrication de fromage Feta fait à partir du lait de brebis. *Le lait.*, 63 :416-424.

**BANGA-MBOKO H., GODEAU J.M., DRION P.V., EL AMIRI B., DRION V., PERENYI Z., SOUSA N.M. et BECKERS J.F. (2002).** Évaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguin comme biomarqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc.1. Historique, physiopathologie de la muqueuse gastrique et différentes formes de pepsinogènes. *Annales de Médecine Vétérinaire.*, 146, 339-346.

**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. *International Dairy Journal.*, 19, 510–517.

**BARBANO D.M. and RASMUSSEN R.R. (1992).** Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulation. *Journal of Dairy Science.*, 75, 1–12.

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

**BERTRAND F. (1988).** Le fromage grand œuvre des microbes. *Revue générale du Froid.*, 78. P : 519-527.

**BOUDJENAH-HAROUN S., LALEYE S., CODJO L., SENOUSSE C., MOULTI-MATI F., SI AHMED S. et MATI A. (2012).** Coagulation du lait de chamelle en utilisant des enzymes gastriques dromadaires comme un substitut de la présure commerciale. *American Journal of Food Technology.*, 7,409-419.

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

**BOURDIER J. M. et LUQUET M. F. (1991).** Dictionnaire laitier. 2 e éd. *Technologie et Documentation*, Lavoisier, Paris.

**BROOME M.C. and HICKEY M.W. (1990).** Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology.*, 45, 5359.

**BUGAUD C., BUCHIN S., HAUWUY A. and COULON J. (2002).** Texture and flavor of the cheese according to the nature of the pasture: case of Abondance cheese. *INRAE Animal Productions.*, P 31-36.

**CAVALCANTI M.T.H., TEIXEIRA M. F. S., LIMA FILHO J. L. and PORTO A. L. F. (2004).** Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis* sp. *Bioresource Technology.*, 93, 29-35.

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

**CHEFTEL J.C., LUQUET J.L. et LORIENT D. (1984).** Les protéines alimentaires, propriétés fonctionnelle. *Technique et Documentation*. 1 e éd. Lavoisier, Paris.

**CHOISY C., DEZMAZEAUD M., GRIPON J. C., LAMBERT G. et LENOIR J. (1997).** La biochimie de l'affinage. In « Le fromage ». Eck A Gillis J. LE. *Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris, p 86-153.

**CHOLET O. (2006).** Étude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat, pour obtenir le grade de Docteur de l'Institut National Agronomique Paris Grignon.

**CIPC Lait Commission Interprofessionnelle des Pratiques Contractuelles (2011).** Avis relatif à la définition et aux méthodes d'analyse de l'acidité du lait n°2011-02.

**CODEX STAN283-1973. (2011).** Norme codex Alimentarius pour le camembert.

**DEBRY G. (2001).** Lait, nutrition et santé. *Technique et Documentation*. Lavoisier, Paris.

**DEZMAZEAUD M.J. (1981).** Principales utilisations des enzymes en industrie laitière : aspect scientifique et technique., AA : 195-204.

**DEVENDRA K., VERMA K.A., CHATLI M.K., SINGGH R, KUMAR P, MEHTA N. and MALAY O.P. (2016).** Camel's milk: alternative milk for human consumption and its health. *Benefits Nutrition of Food Science.*, pp. 217-227.

**ECK A. (1987).** In « Le fromage ». Eck A Gillis J. LE. *Technique et documentation*. 2 e éd. Lavoisier. Paris. P : 13, 17, 137,138. 529.

**ECK A. et GILLIS J.C. (2006).** De la science à l'assurance qualité. In « Le fromage ». Eck A Gillis J. LE. *Technique et Documentation*, 3 e éd. Lavoisier, Paris, (891p).

**EI-HATMI H., JERAD Z., SALHI I., AGUIBI A., NEDRI A., KHORCHANI T. (2015).** Comparison of composition and whey protein fractions of human, camel, donkey, goat and cow's milk. *Mljekarstvo/Dairy*. 159-167

**FAO (1998).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO: Alimentation et nutrition, n° 28, ISBN 92-5-20534-6.

**FENG Z., REN J., ZHANG Y., HU S. (2011).** Improved secretory production of calf prochymosin by codon optimization and disruption of PMR1 in *Kluyveromyces lactis* GG799. *African Journal of Biotechnology.*, 10 (52), pp. 10786-10789.

- FOLTMAN B. (1969).** Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin). *Biochemical Journal.*, 115(3), 3-4.
- FOLTMAN B., PEDERSEN V. B., KAUFFEMAN D. and WYBRANDT G. (1979).** The primary structure of calf chymosine. *The Journal of Biological, Chemistry.*, 254(17), 84478456.
- FOLTMANN B. and AXELSEN N.H. (1980).** Gastric proteinases and their zymogens. Phylogenetic and developmental aspects. *FEBS. Proceedings.*, 60, 271-280.
- FOX. (1969).** Milk clotting and proteolytic activity of bovine pepsin and porcine. *Jornal of Dairy Research.*, 36 :427-433.
- FOX P. F., MCSWEENEY P. L. H., COGAN T. M. and GUINEE T. P. (2004).** Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology, Volume 1. Elsevier, 3 e éd., Academic Press, London.
- FREDOTE. (2005).** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, *Technique et Documentation.*, Lavoisier.397p.
- FUSTE-FRNE F. (2020).** Dite gouda, dites fromage : récits de voyage d'une identité alimentaire, 22.
- GARG S. K. and JOHRI B. N. (2009).** Rennet: current trends and future research. *Food Reviews International.*, 10(3), 313-355.
- GAUCHERON F. (2004).** Minéraux et produit laitiers. Lavoisier, Paris.
- GASSI J. & SCHUCK P. (2017).** Partie : Procédés de transformation fromagère **33** (partie 3), 1- 11.
- GOURSAUD J. (1985).** Composition et propriétés physico-chimiques. Dans Laites et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laitière. *Technique et Documentation.* Lavoisier, Paris.
- 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*, 5 e éd., Lavoisier, Paris.
- GUETOUACHE M., GUESSAS, BETTACHE, MEDJEKAL and SAMIR. (2014).** Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and pharmaceutical Research.*, 2(10), 115- 122.

**HARDY J. (1997).** L'activité de l'eau et salage des fromages .in « Fromage ». Eck A Gillis J. LE. 3 e éd, Lavoisier, paris, p62-84.

**HARDY J. et SCHER J. (2006).** Les propriétés physiques et organoleptiques du fromage. In « Le fromage ». *Technique et Documentation.*, Lavoisier, Paris, p 480-505(891p).

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

**HENRI., GOUDERANCHE., BENEDICT., CAMIER-CAUDRON., JEAN-YVES GASSI. et PIERRE SCHUCK. (2008).** Procédés De Transformation Fromagère- Partie 1, Pp 305.

**HERMIER et CERF. (2006).** La préparation du lait sur le plan microbiologique. In « Le fromage ». Eck A Gillis J. LE. *Technique et Documentation.* Lavoisier, Paris, p173 (891p).

**HORNBUCKLE W.E., SIMPSON K.W. and TENNANT B.C. (2008).** Gastrointestinal Function. In « Clinical Biochemistry of Domestic Animals» Academic Press, 6 e éd. *Science Direct*, p 413- 457.

**JACOB M., JAROS D. and ROHM H. (2011).** Recent advances in milk clotting enzymes. *Internatonal Journal of Dairy Technology.*, 64, 14–33.

**JEAN C. et DIJON C., (1993).** Au fil du lait, ISBN 2-86621-172-3.

**JENSEN L.J., MOLGAARD A., POULSEN J.C.N., HARBOE M.K., SIMONSEN J.B., LORENTZEN A.M., HJERNO K., VAN DEN BRINK J.M., QVIST K.B. and LARSENA S. (2013).** Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese making properties. *Acta Cryst allographica*, 69, 901–913 2e éd. *Technique et Documentation.* Lavoisier, Paris, (185 p).

**JOHNSON M.E. and LUCEY J.A. (2006).** Major technological advances and trends in cheese. *Journal of Dairy Science.*, 89 1174–1178.

**JORF. (2007).** Relatif aux fromages et spécialités fromagères. *Journal Officiel de la République Française.*, Décret n° 2007- 628.

**KAGEYAMA T. (2002).** Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, 59(2), 288-306.

**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. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 342, 647–654.

**KONGO J.M. & MALCATA F.X. (2016) a.** Cheese: Processing and Sensory Properties. *Encyclopedia of Food and Health. Elsevier.*, 748- 754.

**KUMAR., SHAMA J., GROVER S., MOHANTY A.K. and BATISH VK. (2007).** Molecular cloning and expression of goat (*Capra hircus*) prochymosin. *E. coli Food Biotechnology.*, 21, pp. 57-69.

**LABIOUI H., ELMOUAL L., BENZAKOUR A., EI YACHIOUI M., BERNEYE H. et OUHSSINE M. (2009).** Étude physicochimique et microbiologique de lait crus. *Taureau. Soc. Pharm.* Bordeaux, 148, 7-16.

**LANGHOLM JENSEN J., MOLGAARD A., NAVARRO POULSEN J.C., HARBOEM K., SIMONSEN J. B., LORENTZENA. M. and LARSENS. (2013).** Camel and bovine chymosin : The relationship between their structures and cheese making properties. *Acta Cryst allographica Section D : Biological Crystallography.*, 69(5), 901–913

**LEMENS P (1985).** Le lait de chèvre : propriétés physiques-chimiques, nutritionnels et chimiques. Dans : Lait et produits laitiers, vache, chèvre, brebis, de la mamelle à la laiterie.

**LENOIR J., LAMBERT G. et SCHMIODT J.L. (1983).** L'élaboration d'un fromage : l'exemple du Camembert. *Pour la science.*, 30, 69.

**LENOIR J., REMEUF F. et SCHNEID N. (2006).** Le Lait de Fromagerie. In « Le fromage ». Eck et Gillis. 3 e éd. *Technique et Documentation.*, Lavoisier, Paris.

**LO PIERO AR., PUGLISI I. and PETRONE G. (2002)** Characterization of “lettucine”, a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal of Agriculture Food and Chemistry.*, 50:2439–2443.

**LOWRY O.H. ROSEBROUGH N. J. FARR A. L. and RANDELL R.J. (1951).** protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.*, 193, 265- 275.

**LUQUET F.M. (1985).** Lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre. 3volumes. Paris. *Technique et documentation.*, Lavoisier.

**MAHAUT M., JEANTET R. et BRULE G. (2000).** Initiation à la technologie fromagère. *Technique et Documentation.*, Lavoisier, Paris, (194p).

**MAHAUT M., JEANTET R. et BRULE G. (2003).** Initiation à la technologie fromagère. *Technique Et Documentation.*, Lavoisier, France ; Pp 24-102.

**MAKHLOUF M. (2015).** Performances de la filière laitière locale par le reformat de la coordination contractuelle entre les acteurs : cas de la Wilaya de Tizi-Ouzou Algérie. Thèse Doctorat Université Mouloud Mammeri ; Tizi-Ouzou, 250p.

**MANDY J., DORIS J. and HARALD R. (2011).** Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology.*, 64(1), 14-33.

**MARTIN B. et COULON J.B. (1995).** Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. I. Influence des facteurs de production sur l'aptitude à la coagulation des laits de troupeaux. *Lait.*, 75, 61-80.

**MATHIEU J. (1998).** Initiation à la physicochimie du lait. *Technique et Documentation.*, Lavoisier, Paris, 220p.

**MATOUB L. (2000).** Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* (Lc33). Mémoire de Magistère en Sciences agronomiques, Institut National d'Agronomie, El-Harrach, Algérie.

**MAUBOIS J.-L. (2018).** Le lait, matière première de la transformation en fromage. In: Le fromage. 195- 208.

**MELLOR J., DOBSON M.J., ROBERTS N.A., TUTE M.F., EMTAGE J.S., WHITE S. (1983).** Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin. *In Saccharomyces cerevisiae Gene.*, 24, pp. 1-14.

**MC SWEENEY P.L.H. and SOUSA M.J. (2000).** Biochemical pathways for the 24-26- octobre, Nouakchott, Mauritanie 324.

**MIETTON B. (1995).** Incidence de la composition des fromages au démoulage et des paramètres d'environnement sur l'activité des agents de l'affinage. *Revue des ENIL.*, 189, 19-27.

**MOHANTY A.K., MUKHOPADHYAY U.K., KAUSNIK J.K., GROVER S., BATISH V.K. (2003).** Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Dairy Research.*, 70, pp. 37-43.

**MOIR D., MAO JI, SCHUMM J.W., VOVIS G.F., ALFORD B.L., TAUNTON-RIGBY A. (1982).** Molecular cloning and characterization of double-stranded cDNA coding for bovine chymosin. *Gene.*, 19, 127-138.

**MOUZALI L. (2001).** Extraction enzymatique et caractérisation de l'agent coagulant de la fleur de cardon sauvage *Cynara cardunculus*. Mémoire de Magister en Sciences agronomiques, Institut National d'Agronomie, El-Harrach, Algérie.

**MURTAZA M.A. (2021).** Fromages de type cheddar.

**NANA and FARKYE (2004).** Cheese technology. Dairy Product Technology Center, California Polytechnic State University, San Luis Obispo, CA 93407, USA.

**NOUANI A., HAMRANI L. and BELLAL M.M. (2011).** Purification et caractérisation de protéase coagulant le lait, extraite à partir du proventricule de poulet (GALLUS). *Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole.*, Tours.

**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.

**PATRICK L. (2009).** Les caractéristiques d'une réponse sensorielle. In « Évaluation sensorielle Manuel méthodologique ». Félix D. Lavoisier, Paris., p8- 12.

**PATRICK F.FOX, TIMOTHY P. GUINEE, TIMOTHY COGAN M., PAUL L.H. and MCSWEENEY (2017).** Biochemistry of cheese ripening, in *Fundamentals of Cheese Science*. Springer: New York, NY, USA. p. 391-442.

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

**PRACHE S., PRIOLO A., JAILLER H., DUBROEUCQ H., MICOL D. and B. MARTIN. (2002).** Traceability of grass-feeding by quantifying the signature of carotenoid pigments in herbivores meat, milk and cheese. *Grassl of Science European.*, **7** :592–593.

**RAMET J. P. (1997).** Propriétés physiques du coagulum. In : « Le Fromage, de la Science à l'Assurance de Qualité » Ed. Eck A. et Gillis J.C. *Technique et Documentation.*, Lavoisier, p 324-333.

**RAMET JP. (1985).** Étude des enzymes de coagulation du lait de chamelle en Arabie-Saoudite. *Rapport de mission.*, FAO, 1-73.

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

**RANDAZZO C.L., CAGGIA C. et NEVIANI C.L.E. (2009).** Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiology and Methods.*, **78** :1–9

**RAWLINGS N.D., TOLLE D.P. and BARRET A.J. (2004).** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acid Res* **32**, Database issue, D160-D164.

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

**ROGELJ., B PERKO., A FRANCKY, V PENCA., J PUNGERCAR. (2001).** Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme. In cheese production. *Journal of Dairy Science.*, **84**, pp. 1020-1026.

**ROMAIN J., THOMAS C, MICHEL M., PIERRE S., GERARD B. (2008).** Laits de Consommation. Les produits laitiers. 3 e éd. Lavoisier, paris, p.1- 21.

**ROSEIRO L.B., BARBOSA M., M AMES J. and WILBEY R.A., (2003).** Cheesemaking with vegetable coagulants and the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology.*, 56, 76e85.

**ROSET G. (2019).** Coagulation et coagulation enzymatique en transformation fromagère. *Technique de l'ingénieur.*, 2, F4700.

**SAHAH M. A., MIR S. A. et PARAY M. A. (2013).** Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheese making: A review. *Dairy Science and Technology*, 94(1), 5-16.

**SAMLOFF I.M. (1989).** Peptic ulcer: the many proteinases of aggression. *Gastroenterology* 96, 586-595

**SCHMIDT D G. (1980).** Association of caseins and casein micelle structure. *In developments in dairy Chemistry - 1- Proteins* (Coord. FOX P.F.) A.S. Publishers, pp. 61-86, 410 p. Sciences Agronomiques université INA ELHarrach-Alger.

**SCRIBAN R. (1999).** Biotechnologie 5 éd. *Technique et Documentation.*, Lavoisier, Paris.

**SIDIKOU D. I., REMY B. and BECKERS J. F. (2005).** Development of a Radio immuno assay for Bovine Pepsinogen A. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire*, 58 (4), 229-235.

**SILVA SV. and MALCATA FX (2005)** Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chem* 89 :19–26.

**SOUSA MJ et MALCATA FX (2002).** Des avancées dans le rôle de coagulant végétal (*Cynara cardunculus*) in vitro et pendant l'affinage de fromages de plusieurs espèces laitières. *Le Lait.*, 82 ans, 151e170.

**ST-GELAIS D., TIRAD-COLLET P. (2002).** Fromage. In « Science et technologie du lait : transformation du lait ». *Presses internationales Polytechnique*, Montréal, Canada, p 349-415

**TANG J. (2013).** Pepsin A; in: « Handbook of Proteolytic Enzymes » Elsevier, 3 e éd., Science Direct.

**THAPON JL. (2005)** - Science et technologie du lait. *Agro campus-Rennes.*, France : 14, (77 pages).

**TROCH T., LEFEBURE E., BAETEN V., COLINET F., GENGLER N. et SINDIC M. (2017).** Cowmilk coagulation : process description, variation factors and évaluation méthodologies. *Biotechnolgy, Agronomy, Society and. Environment.*, 21(4), 276287.

**TUBESHA Z. A. and AL-DELAIFY K.S. (2003).** Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolated of *Mucor*. *International Journal of Dairy Technology*, 56(4), 237241.

**USILATO M., NEVALAINEN K.M.H., HARKKI I.M., KNOWLES J.K.C., PENTILA M.E. (1991).** Enzym production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. *Journal of Biotechnology.*, 17, pp. 35-49.

**VALLEJO JA., AGEITOS JM., POZA M, VILLA TG. (2008).** Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry.*, 56 :10606–10610.

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

**VASSAL, L., MONNET, V., Le BARS, D., ROUX, C. et GRIPON, J. C. (1986).** Relation entre le pH, la composition chimique et la texture des fromages de type Camembert. *Le Lait.*, 66(4) 341-51.

**VEGA-HERNENDEZ M.C., GOMEZ-COELLO A., VILLAR J. and CLAVERIE-MARTIN F. (2004).** Molecular cloning and expression in yeast of caprine Prochymosin. *Journal of Biotechnology.*, 114 (1–2) pp. 69-79.

**VIGNOL C.L. (2002).** Science et technologie du lait –Transformation du lait, École polytechnique de Montréal., ISBN : 29-34 (600 pages).

**VISSER S., VAN ROOYERN PJ. and SLANGEN CJ. (1980).** Peptide substrates for chymosin (rennin). Isolation and substrate behaviour of two tryptic fragments of bovine  $\kappa$ -casein. *European Journal of Biochemistry.*, 108: 415-421.

**WANG N., KEVIN Y., WANG B., GANG L. and WEN F. (2015).** Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris* Protein Expression and Purification. 111, pp. 75-81.

**WOLTER R. (1988).** Alimentation de la vache laitière. 3 e ed. *France Agricole.*, Paris.

**YEGIN S. et DEKKER P. (2013).** Progrès dans le domaine des protéinases aspartiques dans le fromage fabrication : structures, fonctions, mécanisme catalytique, inhibition et ingénierie. *Science et technologie laitières.*, 93,565e594.



**Annexes**

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

- |  |     |                |
|--|-----|----------------|
| - NaOH 0,1 N.....  | 0,4 | } V final = 10 |
| - Carbonate de sodium anhydre (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) ..... | 2 g |                |

**Solution B:**

- CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O (0,1 g/20ml) ..... 1 ml
- Tartrate double de Na et de K (0.2 g/20 ml) ..... 1 ml

**Solution C :**

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

**Solution mère de BSA :**

- BSA..... 2mg
- Eau distillée..... 20 ml

**Gamme étalon :**

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

Concentration en BSA µg/ml	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Solution mère de BSA (µl)	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
Eau distillée (µl)	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50	0

**2. Méthode :**

- 1 ml d'échantillon contenant 100 µg de protéine maximum et 25 µg minimum :
- Ajouter 2,5 ml de solution C et mélanger ;
- Laisser 10 mn à température ambiante ;
- Ajouter 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- Laisser 30 mn à l'obscurité ;
- Lire la DO à 750 nm.

### 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 D.O mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration en protéine inconnue X, est déterminée en portant la valeur de la D.O 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 ARIMA *et al*, (1968).

### 1. Solutions :

#### Substrat :

Caséines bovine 1,5% (1,5g / 100ml) .....40ml

Caséines camelines 1,5% (1,5g/100ml) .....40ml

#### Solution TCA:

TCA 7% (10,77g /150ml) .....108ml

#### Solution C :

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8,73g/150ml) .....108ml

### 2. Condition d'hydrolyse :

2,5ml de la solution de caséines à 1,5% dans le tampon phosphate (pH=5,5) est additionné à 0,5 ml d'extrait enzymatique. Le mélange réactionnel ainsi préparé est incubé pendant 10 mn à 35°C.

Après incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 2,5 ml de solution trichloracétique (TCA) à 7%. Après 15 mn de repos, il se forme un précipité blanc que l'on sépare par centrifugation à 10000g/12mn.

### 3. Préparation de l'échantillon :

A 1ml de filtrat (surnageant obtenu) sont additionnés 2,5 ml de la solution Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 0,5 ml de réactif Follin-ciocalteu et on agite immédiatement. On laisse incuber à l'obscurité pendant 20 mn à 35°C au bain marie.

### 4. Courbe étalon de tyrosine :

#### Solution mère de tyrosine :

Tyrosine .....2mg

Eau distillée.....20ml

#### Gamme étalon :

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

Concentration en tyrosine $\mu\text{g/ml}$	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Solution mère de tyrosine ( $\mu\text{l}$ )	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
Eau distillée ( $\mu\text{l}$ )	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50	0

**Dosage :** méthode de Lowry (annexe 01).

**Annexe 3 : normes fixées par l'unité pour les éléments du lait destiné à la fromagerie.**

**Tableau : normes fixées par l'unité pour les éléments du lait destiné à la fromagerie.**

Paramètres	Normes
Matière grasse (g/l)	32-36
Acidité ( $^{\circ}\text{D}$ )	16-18
Densité (g /kg)	1,029-1,035
ESD (g/l)	84-87
EST (g/l)	117-121