

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI OUZOU

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat
en Sciences Biologiques
Option : Biochimie

THEME

***Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en
produits dérivés : effet des enzymes coagulantes
extraites de caillettes de dromadaires***

Présenté par : Boudjenah-Haroun Saliha

Soutenu le : 18/10/2012

Devant le jury :

Président : Mr MESBAHI Mahmoud	Maitre de conférences A	U.M.M. Tizi-Ouzou
Rapporteur : Mr MATI Abderrahmane	Professeur	U.M.M. Tizi-Ouzou
Examineurs :		
Mr CHOUKRI ALI	Professeur	U.Z.A. Djelfa
Mr DJENANE Djamel	Professeur	U.M.M. Tizi-Ouzou
Mr NOUANI Abdelouahab	Maître de Conférences A	UMB Boumerdes
Mr SABAOU Nasserredine	Professeur	ENS Kouba Alger

Année universitaire 2011/2012

REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu le tout puissant pour m'avoir donné le souffle, l'énergie et la volonté pour réaliser cette étude.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mes sincères remerciements à Monsieur Mati Abderrahmane, Professeur en Biochimie Appliquée à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou pour m'avoir permis de rejoindre son équipe de recherche, en me proposant ce sujet. Sa grande rigueur scientifique, ses grandes qualités humaines, ses recommandations mesurées, son attention discrète m'ont permis de bien mener à bien ce projet de thèse. Qu'il trouve ici ma reconnaissance et mon respect pérennes.

Je tiens à remercier particulièrement Dr Louis Cojo Laleye, Professeur associé à la faculté des sciences alimentaires et de l'agriculture de l'université d'El Ain des Emirats Arabes Unis pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir facilité toutes les commodités pendant mon séjour aux émirats ainsi que tous les services amicaux qu'ils m'ont rendus lui et sa femme Joïce.

Je remercie très sincèrement tous les éminents chercheurs et scientifiques qui ont accepté de faire partie du jury de ma thèse :

Monsieur Mesbahi Mahmoud, Maître de conférences, U.M.M. Tizi-Ouzou ;

Monsieur CHOUKRI ALI, Professeur, U de Djelfa ;

Monsieur DJENAN Djamel, Professeur, U.M.M. Tizi-Ouzou ;

Monsieur NOUANI Abdelouahab, Maître de conférences, UMB Boumerdes ;

Monsieur SABAOU Nasserline, Professeur, ENS Kouba, Alger.

J'avoue que je suis très sensible à l'honneur que vous me faites.

Mes remerciements vont également à tout le staff de l'université Kasdi Merbah de Ouargla en particulier monsieur le recteur, Ahmed Boutarfaia et madame la doyenne, Bissati Samia et à tous mes collègues et amis ainsi que tout le personnel de cette université à laquelle j'appartiens, pour leur soutien moral et matériel.

Mes remerciements s'adressent finalement à toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide pour la réalisation de ce travail. Que toutes ces personnes soient assurées de ma reconnaissance.

DÉDICACES

A mes parents

Maigres récompenses pour l'immense travail accompli. Que Dieu vous bénisse, vous protège et vous garde le plus longtemps avec nous.

A mon mari et mes enfants

Pour l'amour qui nous unit. Ce travail est également le fruit de vos nombreux soutiens. Soyez en remerciés éternellement.

A mes frères et sœurs

Sincères affections .Que Dieu vous accorde sa grâce et vous guide dans le droit chemin.

A toute personne qui a prié pour moi avec sincérité.

Liste des abréviations

Ac	Activité coagulante
BSA	« Bovine serum albumin »
CMP	Caséinomacropeptide
CN-αS	Caséine α S
CN-β	Caséine β
CN-γ	Caséine γ
CN-κ	Caséine κ
D°	Degrés DORNIC
DEAE-cellulose	Diéthylaminoéthyl-cellulose
DO	Densité optique
ECD1	Extrait coagulation de dromadaire âgé d'un an
ECD3	Extrait coagulation de dromadaire âgé de trois ans
ECD9	Extrait coagulation de dromadaire âgé de neuf ans
FAO	« Food and Agriculture Organization »
GMP	Glycomacropéptide
KDa	Kilo-Dalton
LV	Lait de vache
MG	Matière Grasse
Na Cl	Chlorure de sodium
NPN	Azote non protéique
P/V	Poid/Volume
PAGE	« Polyacrylamide Gel Electrophoresis »
PGRP	« <i>Peptidoglycan Recognition Protein</i> »
pHi	pH isoélectrique
PP3	Protéose-Peptide-3
ppb	partie par billion
Rt	Rendement
SDS	« Sodium Dodécylsulfate »
TCA	Trichloracétique Acide
tfc	Temps de floculation du lait de chamelle
tfv	Temps de floculation du lait de vache
TPA	« texture profile analysis »
UFC	Unité Formant Colonie
UP	Unité Présure
WAP	Protéine sériques acides ou « Whey Acide Protein »
α-La	α -lactalbumine
β-Lg	β -lactoglobuline

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Indications sur la variation de la composition chimique du lait camelin (g/kg) ; valeurs rapportées par différents auteurs pour le même paramètre mesuré.	06
Tableau II	Composition moyenne en acides gras des laits de dromadaire et de vache (ATTIA et al, 2000)	07
Tableau III	Composition moyenne en principaux minéraux du lait de dromadaire (g/l).	08
Tableau IV	Teneurs en certains ions métalliques dans les laits humain bovin et camelin ; comparaison avec la teneur de la ration infantile (AL-AWADI et STRIKUMAR, 2001).	09
Tableau V	Teneurs comparatives des fractions azotées (mg/100ml) des laits camelin, caprin et bovin (MEHAIA et ALKANHAL, 1992).	10
Tableau VI	Concentration moyenne des protéines du lait de différentes espèces en (mg/l) (KAPPELER <i>et al</i> , 2003).	12
Tableau VII	Origine des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait (MIETTON <i>et al</i> , 1994).	17
Tableau VIII	Caractéristiques des enzymes gastriques, selon ERNSTROM et WONGT (1983) et CUVELLIER (1993).	20
Tableau IX	Grille d'appréciation de la qualité microbienne du lait, selon BERRENS et LUQUET (1987).	34
Tableau X	Désignations des lots expérimentaux pour la conservation des extraits coagulants de dromadaire	44
Tableau XI	Analyses physico-chimiques des laits de chamelles collectés dans les régions de Ghardaïa, El-Oued et Ouargla. Comparaison avec les valeurs obtenues sur le lait de vaches prélevé à Ouargla.	48
Tableau XII	Analyse des constituants du lait de chamelles issu de mélanges de lait collecté dans les régions de Ghardaïa, El-Oued et Ouargla. Comparaison avec les teneurs du lait de vache prélevé à Ouargla.	50
Tableau XIII	Composition minérale du lait de dromadaire collecté à Ouargla, El Oued et Ghardaïa ; comparaison avec les teneurs du lait de vache.	53
Tableau XIV	Nombre d'UFC /ml de la flore Psychrotrophe totale et de <i>Pseudomonas fluorescens</i> présente dans le lait frais.	57
Tableau XV	Quantité de protéines contenues dans chaque ECD.	63
Tableau XVI	Variation de l'activité coagulante (UP) en fonction de la nature de l'enzyme.	65
Tableau XVII	L'activité protéolytique des différentes enzymes vis-à-vis des laits camelin et bovin.	66
Tableau XVIII	L'activité coagulante des extraits issues des animaux à différents régimes alimentaires	76
Tableau X IX	Paramètres mesurés de la texture des caillés bovin et camelin.	94

Liste des figures

Figures	Titre	page
Figure 1	Anatomie de l'appareil digestif d'un ruminant et d'un camélidé (FAYE, 1997).	04
Figure 2	Représentation de la micelle de caséine bovine selon le modèle de SCHMIDT (1980).	15
Figure 3	Comparaison des régions de la caséine κ sensibles à la chymosine dans les laits de chamelle et de vache (KAPPELER <i>et al</i> , 1998).	28
Figure 4	Protocole d'isolement des extraits enzymatiques gastriques préconisées par VALLES et FURET (1977)	37
Figure 5	Mesure du temps de floculation par la méthode de Berridge (1945) modifiée par COLLIN <i>et al</i> (1977).	39
Figure 6	Protocole d'isolement des caséines et des protéines du lactosérum à partir du lait camelin (SCHAMET <i>et al</i> , 1992).	41
Figure 7	Fiche de dégustation du fromage.	47
Figure 8	Part des germes <i>Pseudomonas</i> par rapport à la flore psychrotrophe totale présente dans le lait frais.	58
Figure 9	Evolution du nombre de <i>Pseudomonas</i> et de psychrotrophes, la durée de l'entreposage à 4°C.	61
Figure 10	Evolution du nombre des <i>Pseudomonas</i> et de psychrotrophes, selon la durée de l'entreposage du lait pasteurisé à 7°C.	62
Figure 11	Rendement de l'extraction des neuf (09) extraits coagulants de dromadaire obtenus dans différentes conditions de macération	64
Figure 12	Variation du temps de floculation des laits camelin et bovin en fonction de l'enzyme utilisée (ECD1, ECD3, ECD9).	67
Figure 13	Rapport tfv /tfc	68
Figure 14	Variation du temps de floculation du lait camelin par action des ECD fonction du pH.	70
Figure 15	Variation du temps de floculation du lait bovin traité par les ECD en fonction du pH.	70
Figure 16	Variation du temps de floculation du lait de chamelle traités par les ECD en fonction de la température	72
Figure 17	Variation des temps de floculation du lait de vache traités par les extraits coagulants en fonction de la température.	72
Figure 18	Variation du temps de floculation du lait camelin en fonction des concentrations de CaCl ₂ .	73
Figure 19	Variation du temps de floculation du lait bovin en fonction des concentrations de CaCl ₂ .	74
Figure 20	Variation du temps de floculation des laits camelin et bovins en fonction du type d'ECD utilisé.	75
Figure 21	Influence de la température sur le temps de floculation du lait en fonction de la nature des ECD utilisés.	78
Figure 22	Influence du pH sur le temps de floculation du lait en fonction de la nature des ECD utilisés.	79
Figure 23	Profil de séparation chromatographique de l'extrait coagulant de dromadaire adulte sur colonne (1x10cm) de DEAE-cellulose.	81
Figure 24	Histogrammes de comparaison entre l'activité coagulante (UP) avant et après la purification de l'Extrait Coagulant de dromadaire adulte.	82

Figure 25	Profil électrophorétique en Page-native des extraits de caillettes de dromadaires	83
Figure 26	Variation du taux de réduction de l'activité coagulante des extraits en fonction des modes et durées de conservation	84
Figure 27	Variation de l'activité résiduelle des extraits en fonction du mode et de la durée de conservation.	85
Figure 28	Variation de l'absorbance des échantillons du lait frais en fonctions des différents extraits coagulants de dromadaire.	87
Figure 29	Variation de l'absorbance des échantillons du lait de chamelle cru réfrigéré à 4° en fonction de la durée de conservation (24h, 96 h).	87
Figure 30	Variation de l'absorbance des échantillons du lait de chamelle pasteurisé porté à 4° C en fonction de la durée de conservation (24 et 96 h).	88
Figure 31	Etapas suivies au laboratoire pour la fabrication d'un fromage au lait camelin en utilisant les extraits enzymatiques coagulants isolés de caillettes de dromadaire adulte	90
Figure 32	Variation du rendement fromager en fonction du type du lait et d'enzymes utilisés	91
Figure 33	Microstructure du fromage bovin fabriqué en utilisant les extraits enzymatiques coagulants isolés de caillettes de dromadaires adultes	95
Figure 34	Microstructure du fromage Camelin fabriqué en utilisant les extraits enzymatiques coagulants isolés de caillettes de dromadaires adultes	95

Résumé

Le lait camelin est connu pour sa richesse en éléments de base très importants. Il est aussi réputé pour ses allégations de santé. Toutefois, sa valorisation est encore assez limitée compte tenu de ses aptitudes faibles à la coagulation.

Dans ce cadre et, pour lever cet handicap, nous nous sommes proposé d'étudier l'apport des enzymes gastriques issues de dromadaires de différents âges (1, 3 et 9 ans).

Les analyses préliminaires sur le lait de dromadaire collecté à travers les régions de Ghardaïa, Ouargla et El Oued ont montré que ce dernier possède une bonne valeur nutritionnelle avec un pH moyen de 6.53 et une acidité égale à 17°D. Il est caractérisé par un taux de vitamine C élevé (45mg/l) et un apport protéique appréciable de l'ordre de 33g/l (avec environ 27 g/l de caséines et 7g/l de protéines sériques). La détermination de sa composition minérale a mis en évidence sa richesse en cuivre, en zinc et en fer. Le genre *Pseudomonas* constitue la flore psychrotrophe prédominante (37%) dans le lait cru entreposé à 4 et 7°C pendant 4 jours.

Les extraits enzymatiques coagulants, isolés en utilisant le protocole de VALLES et FURET (1977 avec un rendement de 75%, sont obtenus à 38°C et à 0,2M d'acide chlorhydrique. L'activité coagulante de ECD9 (issu des caillettes de dromadaires le plus âgé) est la plus élevée (0,360). Cet extrait possède en plus une activité protéolytique relativement faible. Les temps de floculation mesurés ont permis de confirmer la bonne affinité des extraits existant pour le lait camelin et bovin.

Le suivi de la stabilité de l'extrait coagulant pendant 90 jours selon trois modes de conservation (réfrigération, congélation et lyophilisation) a montré que l'activité coagulante est mieux préservée dans les échantillons congelés (96% d'activité conservée), contre 55,3 % (extrait lyophilisé) et 18 % (extrait réfrigéré). Le comportement de ces extraits en électrophorèse PAGE-SDS avec ou sans -mercaptoéthanol a montré qu'il ya une différence assez nette entre les profils provenant des deux origines (jeune et âgé).

Enfin, un fromage camelin de coagulation mixte en utilisant l'extrait enzymatique issu de dromadaire âgé a été fabriqué avec un rendement jugé satisfaisant (17%, contre 20% pour le lait bovin). L'évaluation sensorielle a permis aux dégustateurs sélectionnés d'attribuer au fromage élaboré une appréciation favorable. Cette appréciation organoleptique a été renforcée par une analyse instrumentale (analyse du profil de texture ou TPA) qui a montré que le caillé camelin diffère du caillé bovin pour tous les paramètres mesurés (dureté, élasticité, cohésion et adhésivité). De plus, l'examen de la microstructure de ces fromages par microscopie électronique à balayage (MEB) a montré clairement que le réseau du caillé bovin est caractérisé par un espace plus ouvert, alors que le caillé camelin a une structure compacte et uniforme.

Mots clés : Lait, bovin, camelin, analyses physico-chimiques, psychrotrophes, conservation, fromage, activité coagulante, protéines, protéases.

Abstract

Camel milk is known for its wealth of very important basic elements. It is also famous for its allegations of health. However, its valorization is still very limited because of its weak aptitude for coagulation.

In this framework and, to raise this handicap, we proposed to study the contribution of the gastric enzymes resulting from dromedaries of various ages (1, 3 and 9 years).

The preliminary analyzes of the camel milk collected through the areas of Ghardaïa, Ouargla and El Oued showed that this milk has a good nutritional value with an average pH of 6.53 and acidity equal to 17°D. It is characterized by a high rate of vitamin C (45mg/l) and an appreciable proteinic contribution about 33g/l (with approximately 27 g/l of caseins and 7g/l of serum protein). The determination of its mineral composition highlighted its high content in copper, zinc and iron. The genus *Pseudomonas* is the predominant psychrotrophic flora (37%) in raw milk stored at 4 and 7 ° C for 4 days.

The clotting enzyme extracts were isolated using the protocol of VALLES and FURET (1977) with a yield of 75%, obtained at 38 ° C and 0.2 M hydrochloric acid. The clotting activity of ECD9 (resulting from stomachs of oldest dromedaries) is the highest one (0,360). In addition this extract has relatively low proteolytic activity. Measured flocculation times have confirmed the high affinity of these extracts for camel and bovine milk.

The follow-up of the stability of the extract coagulant during 90 days according to three modes of conservation (refrigeration, freezing and lyophilization) showed that the clotting activity is preserved better in the frozen samples (96% of activity is preserved), against 55, 3% (freeze-dried extract) and 18% (cooled extract).). The behavior of these extracts in SDS-PAGE electrophoresis with or without β -mercaptoethanol showed that there's a rather clear difference between the profiles from the two origins (young and old).

Finally, a camel cheese with mixed coagulation using clotting enzyme extracted from the old camel was manufactured with a satisfactory yield (17% against 20% for bovine milk). Sensory evaluation has allowed the tasters selected to assign the cheese made a favorable assessment. . The organoleptic evaluation was reinforced by instrumental analysis (texture profile analysis, TPA), which showed that the camel curd differs from bovine curd for all measured parameters (hardness, elasticity, cohesion and adhesion). Furthermore, the examination of the microstructure of these cheeses by scanning electronic microscopy (SEM) showed clearly that the network of bovine curd is characterized by a more open space, whereas the camel curd has a compact and uniform structure.

Key words : Milk, bovine, cameline, physicochemical analyzes, psychrotrophes, conservation, cheese, clotting activity, proteins, proteases.

TABLE DE MATIERES

Liste d'abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
	pages
Introduction	01
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1. Aperçu sur le dromadaire	03
1.2. Particularités anatomiques physiologiques de dromadaire	03
1.2.1. Disposition de l'estomac	03
1.2.2. Adaptations physiologiques	04
1.3. Importance économique	05
1.3.1. Effectif du cheptel	05
1.3.2. Production laitière	05
1.4. Composition du lait camelin	06
1.4.1. Glucides	07
1.4.2. Lipides	07
1.4.3. Minéraux	08
1.4.4. Vitamines	09
1.4.5. Fraction azotée et protéines	09
1.4.5.1. Protéines Solubles	10
1.4.5.2. Caseines	11
1.4.5.2.1. Caseines α_1	13
1.4.5.2.2. Caseines α_2	13
1.4.5.2.3. Caseines β	13
1.4.5.2.4. Caseines κ	13
1.4.5.3. Micelle de caseine	14
1.5. Aptitude technologique du lait de chamelle	15
1.5.1. Coagulation du lait	15
1.5.2. Les principales enzymes utilisées en fromagerie	17
1.5.2.1. Enzymes d'origine animale	17
1.5.2.2. Enzymes d'origine végétale	21
1.5.2.3. Enzymes d'origine microbienne	22
1.5.3. Particularités moléculaires et mécanisme d'action	23
1.5.4. Aptitudes à la coagulation du lait camelin	26
1.5.5. Enzymes utilisées pour la coagulation du lait de chamelle	27
1.5.6. Fabrication du fromage camelin	28
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
2.1. Matériel	29
2.1.1. Matériel biologique	29
2.1.1.1. Lait de chamelle	29
2.1.1.2. Lait de vache	29
2.1.1.3. Poudre de lait écrémé « low heat »	29
2.1.1.4. Caséines camelines lyophilisées	29
2.1.1.5. Enzymes coagulantes	29
2.1.1.6. Caillettes de dromadaires	29
2.1.2. Appareillage	30
2.2. Méthodes de travail	31
2.2.1. Collecte du lait	31
2.2.2. Analyses physicochimiques	31
2.2.2.1. L'évaluation des principales caractéristiques	31
2.2.2.2. Evaluation spécifique des nutriments	32

2.2.2.2.1. Dosage des protéines	32
2.2.2.2.2. Matière grasse	32
2.2.2.2.3. Lactose	33
2.2.2.2.4. Vitamine C	33
2.2.2.2.5. Etude de la composition minérale	33
2.2.3. Etude de la qualité microbiologique	33
2.2.3.1. Test de la réductase	34
2.2.3.2. Dénombrement des micro-organismes psychrotrophes	34
2.2.3.3. Isolement et identification des <i>Pseudomonas fluorescens</i>	34
2.2.3.4. Influence du temps de réfrigération sur la qualité bactériologique du lait	35
2.2.3.5. Evolution de la flore psychrotrophe au cours d'entreposage	35
2.2.4. Extraction des enzymes coagulantes gastriques	36
2.2.4.1. Optimisation des conditions d'extraction des enzymes coagulantes	36
2.2.4.2. Calcul du rendement de l'extraction	38
2.2.4.3. Analyse statistique des résultats	38
2.2.4.4. Caractérisation des extraits coagulants gastriques	38
2.2.5. Coagulation du lait de chamelle par les ECD brutes	42
2.2.5.1. Effet de la nature de protéases gastriques sur le temps de floculation	42
2.2.5.2. Optimisation du temps de floculation du lait par les ECD brutes	42
2.2.5.3. Recherche du pH optimal	43
2.2.5.4. Recherche de la température optimale	43
2.2.5.5. Recherche de la concentration en CaCl ₂ optimale	43
2.2.6. Purification des extraits coagulants bruts de dromadaire par chromatographie échangeuse d'ions	43
2.2.7. Etude du mode de conservation des extraits coagulants.	44
2.2.8. Essai de fabrication du fromage frais camelin et bovin par l'utilisation des extraits coagulants de dromadaires.	45
2.2.8.1. Etude de la texture du fromage	45
2.2.8.2. Evaluation organoleptique des fromages	46
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	
3.1. Composition physico-chimique des laits collectés	48
3.1.1. pH et acidité	48
3.1.2. Densité	49
3.1.3. Matière sèche	49
3.1.4. Cendres	50
3.1.5. Teneurs en éléments nutritifs.	50
3.1.5.1. Lactose	51
3.1.5.2. Matière grasse	51
3.1.5.3. Protéines totales	52
3.1.5.3.1. Protéines sériques	52
3.1.5.3.2. Caséines	52
3.1.5.4. Vitamine C	52
3.1.6. Composition minérale	53
3.2. Qualité hygiénique et évolution des microorganismes au cours de l'entreposage réfrigéré	56
3.2.1. Dénombrement des microorganismes psychrotrophe et recherche des <i>Pseudomonas</i> dans le lait frais	57
3.2.2. Evolution de la flore psychrotrophe du lait en fonction de la durée de l'entreposage	59
3.2.2.1. Entreposage à 4°C.	59

3.2.2.2. Entreposage à 7°	60
3.3. Etude de la coagulation du lait camelin; effets des extraits de caillettes de dromadaire	63
3.3.1. Obtention des extraits	63
3.3.2. Evaluation de l'activité enzymatique des extraits bruts	65
3.3.2.1. Mesure de l'activité coagulante	65
3.3.2.2. Mesure de l'activité protéolytique	65
3.3.2.3. Mesure du temps de floculation du lait traité par les extraits bruts	66
3.3.2.4. Influence du pH de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait de chamelle traité par les ECD	68
3.3.2.5. Influence du pH de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait bovin traité par les ECD	69
3.3.2.6. Influence de la température de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait de chamelle traité par les ECD	71
3.3.2.7. Influence de la température de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait de vache traité par les ECD.	71
3.3.2.8. Influence de la concentration de CaCl ₂ de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait de chamelle traité par les ECD bruts.	73
3.3.2.9. Influence de la concentration de CaCl ₂ de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait bovin traité par les ECD bruts.	73
3.3.2.10. Comparaison des temps de floculations sur les laits bovin et camelin	75
3.3.2.11. Influence du régime alimentaire sur le pouvoir coagulant des extraits enzymatiques bruts	76
3.4. Caractérisation et conservation de l'extrait coagulant brut	81
3.4.1. Purification de l'Extrait Coagulant de Dromadaire adulte	81
3.4.2. Comportement électrophorétique en PAGE-SDS	82
3.4.3. Evolution de l'activité l'extrait en fonction du mode de conservation	84
3.5. Etude de la protéolyse des caseines camelines	86
3.5.1. L'activité protéolytique des extraits coagulants sur les caséines lyophilisées issues du lait de chamelle frais.	86
3.5.2. L'activité protéolytique des extraits coagulants sur les caséines lyophilisées issues du lait réfrigéré à 4 et à 7°C (cru et pasteurisé).	86
3.6. Essai de fabrication d'un fromage au lait camelin en utilisant l'extrait coagulant de caillettes de dromadaire	91
3.6.1. Calcul du rendement fromager	92
3.6.2. Evaluation sensorielle des fromages	93
3.6.3. Etude de la texture des caillés camelin et bovin	94
3.6.4. Etude de la microstructure des fromages camelin et bovin	95
Conclusion Générale	98
Références Bibliographiques	
Annexes	

Introduction
Générale

1. Introduction générale

Le dromadaire (*Camelus dromedarius*) est une composante importante de l'écosystème désertique. Il possède une tolérance exceptionnelle aux conditions hostiles des régions arides et désertiques comme les températures élevées, les radiations solaires, le manque d'eau, les terrains sablonneux et souvent la qualité médiocre de la végétation.

Dans de telles conditions, cette espèce peut produire un lait particulièrement riche et équilibré en nutriments de base (lipides, protides et glucides), en éléments minéraux et en vitamines.

Ce lait, qui est resté longtemps inexploré, a fait l'objet ces dernières décennies de travaux qui ont permis de mettre en évidence des activités biologiques variées dues à la nature des protéines et peptides présents. Comme il a été testé efficacement comme anti-hypertensif et régulateur de la survenue du diabète et du cancer. Il a en outre été recommandé pour des enfants allergiques au lait bovin.

A l'inverse de ce dernier et des laits d'autres espèces (caprines et ovines, notamment) le lait de dromadaire est connu pour présenter des aptitudes limitées aux transformations technologiques en produits dérivés, particulièrement dans le cas des fabrications du beurre et du fromage. Cette caractéristique est considérée comme un facteur limitant de son utilisation technologique malgré une production quantitative et qualitative qui a donné lieu dans certains pays d'Afrique (Mauritanie), du Golf (Emirats Arabes Unis) et très récemment en Algérie (Ghardaïa), à la création de laiteries à base de lait de chamelle.

Pour lever cette contrainte, plusieurs travaux ont été menés ces dernières décennies par de nombreuses équipes de par le monde pour comprendre les particularités structurales et physico-chimiques de ce lait afin d'apporter des correctifs appropriés.

Ces tentatives ont montré que les difficultés rencontrées seraient notamment en relation avec la nature et la composition des micelles qui se traduisent par une affinité limitée pour la présure (RAMET, 1993).

Dans ce cadre, la phase de coagulation a été particulièrement explorée en testant différents types d'enzymes (présure, pepsine, enzymes microbiennes ...etc.). Si la coagulation avec la présure n'a pas été concluante (BAYOUMI, 1990 ; MEHAIA, 1993 ; RAMET, 1997), les essais préliminaires réalisés avec la pepsine bovine ou avec les enzymes gastriques de dromadaire ont donné les résultats les plus probants (WANGOH *et al*, 1993 ; RAMET, 1994; GORBAN *et* IZZELDIN, 1997 ; SI BOUKEUR *et al*, 2005).

Ces premiers résultats encourageants augurent de perspectives intéressantes pour la transformation du lait camelin, surtout que la politique incitative développée par notre ministère de l'agriculture ces derniers temps, vise à augmenter les productions en laits ovin, caprin et camelin, pour que ces dernières puissent concourir à réduire un tant soit peu les besoins en lait, qui sont évalués autour de 3 milliard de litre par an. De plus, la production non négligeable en lait camelin dans notre pays et la possibilité d'injecter une partie de cette production pour la fabrication de produit dérivés donne un cachet particulier à ces investigations scientifiques qui peuvent avoir des retombées économiques à court et à moyen terme.

C'est précisément dans ce volet de préoccupation que s'inscrit l'objet de notre présent travail dont les objectifs scientifiques attendus concernent la connaissance approfondie des particularités de ce lait, le choix, la nature et les conditions optimales d'obtention de ces agents biologiques à utiliser pour coaguler le lait et enfin la maîtrise des conditions du milieu pour garantir à chaque fois les meilleurs activités enzymatiques requises.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

1. Synthèse bibliographique

1.1. Aperçu sur le dromadaire

Le chameau appartient à la famille des camélidés, représentée par le dromadaire ou *Camelus dromedarius* (ayant une seule bosse) et par le chameau à deux bosses *Camelus bactrianus* (HENRI, 1987).

Le chameau est synonyme du nomadisme en milieu désertique. En effet, sur ces vastes territoires arides, il procure du lait, de la viande et de la laine. De plus, c'est le moyen de transport des biens et des personnes le mieux adapté pour ces parcours sablonneux et par moment escarpés, sous des conditions climatiques les plus défavorables.

Cet animal se rencontre principalement en Afrique et en Asie. Le cheptel mondial est estimé à 20 millions de têtes dont 18 millions de *Camelus dromedarius* et 2 millions de *Camelus bactrianus*.

Les élevages sont la plupart du temps de type extensif traditionnel, mais l'élevage intensif est pratiqué aussi dans certaines régions du monde, notamment dans le golf persique. La durée de lactation varie entre 9 et 18 mois et le rendement en lait entre 600 et 3600 kg.

1.2. Particularités anatomiques et physiologiques

1.2.1 Disposition de l'estomac

Le dromadaire, comme les vrais ruminants, est un polygastrique, mais il se singularise néanmoins par des différences avec les autres ruminants sur le plan de la conformation et de la structure de l'estomac (EMA *et al*, 1980). Globalement, on peut distinguer 4 réservoirs gastriques (compartiments) : le rumen, le réticulum, l'omasum et l'abomasum (figure 1).

Selon (YAGIL, 1985 ; TITAOUINE, 2006), le rumen est la partie qui débouche sur l'œsophage et correspond à un réservoir large ayant une capacité de 100 à 130 litres. Le réticulum, en forme de poire, est partiellement séparé du premier compartiment, car il n'y a pas de sphincter. Sa muqueuse interne présente une structure alvéolaire. L'omasum est un organe tubulaire long et cylindrique qui ne se distingue pas, vu de l'extérieur, de l'abomasum. Il est visible de l'intérieur par une séparation marquée par la cessation des plis. C'est l'organe qui contient les glandes tubulaires sécrétrices. L'abomasum (appelé aussi caillette) est la dilatation de l'omasum et constitue 1/5 du volume de ce dernier. Cette partie est plus petite par rapport aux autres ruminants. Elle est tapissée d'une muqueuse épaisse et forme de gros plis. La caillette correspond à l'estomac proprement dit chez les ruminants. C'est le seul

secteur possédant des glandes digestives. Sa muqueuse est sécrétrice, elle est garnie de nombreux replis qui se disposent à la manière de valvules s'opposant au reflux des aliments

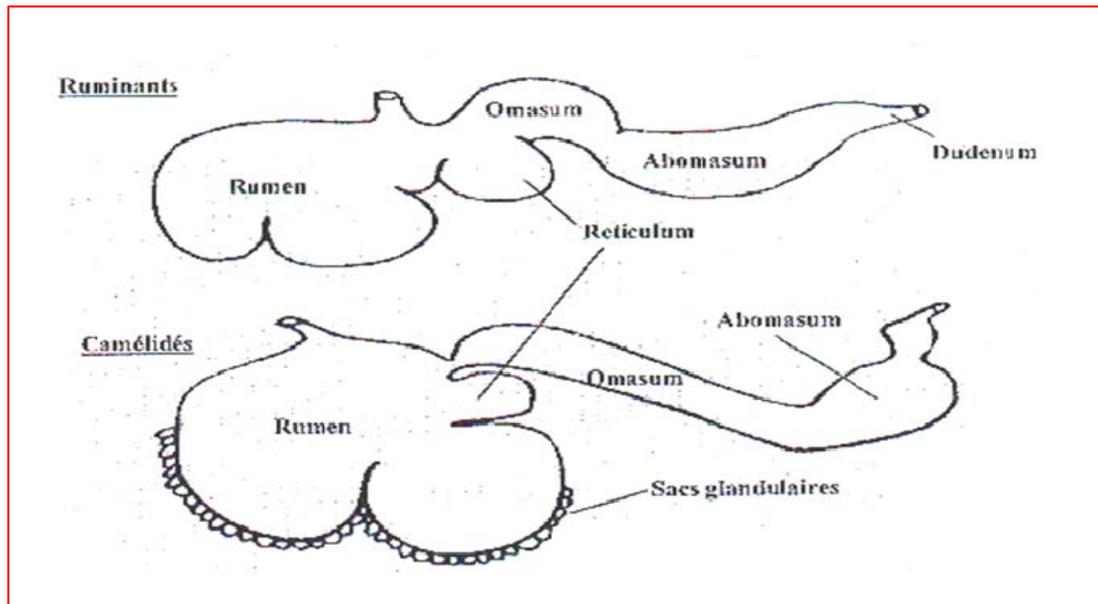


Figure 1: Anatomie de l'appareil digestif d'un ruminant et d'un camélidé (FAYE, 1997).

1.2.2. Adaptations physiologiques

Les études comparatives menées sur le règne animal ont montré que l'espèce cameline, bien que classée parmi les ruminants, présente certaines analogies avec les équidés et les porcins. Cette espèce se caractérise par des particularités anatomiques et fonctionnelles qui expliquent son adaptation particulière au milieu désertique.

Grasse à sa bosse qui est un amas de graisse, le dromadaire se refroidit mieux, transforme cette matière grasse en eau selon les besoins et connaît des variations importantes de sa température interne de l'ordre de 8°C (34-42°C) selon les conditions du milieu (RAMET, 1993 ; FAYE, 1997).

Le dromadaire est aussi connu pour sa remarquable qualité d'adaptation à la sécheresse, nécessitant un abreuvement de plusieurs mois en saison fraîche et un autre hebdomadaire en saison sèche. Cet animal est l'un des rares mammifères capable de perdre un tiers de son poids en eau sans mettre sa vie en danger et peut récupérer son poids initial aussi rapidement après abreuvement. Dans ces dispositions particulières, les estomacs constituent le plus important réservoir hydrique de l'organisme.

Au niveau métabolique, deux aspects distinguent le dromadaire des autres

ruminants domestiques :

- la glycémie est proche de celle des monogastriques (environ 1g/L) d'où un métabolisme énergétique particulier (CHANDRASENA *et al*, 1979) caractérisé par une néoglucogenèse active (rénale et hépatique) et une faible cétogenèse ;

- le recyclage très actif de l'urée qui rejoint le tube digestif via la salive ou l'épithélium du rumen (KAY ET MALOIJ, 1989). Ces caractéristiques signent l'adaptation de l'animal à des situations transitoires de sous alimentation énergétique ou azotée.

Concernant la physiologie digestive, le dromadaire présente une meilleure capacité à digérer les fourrages pauvres que les ruminants domestiques (KAYOULI *et al*, 1991).

I.3. Importance économique

I.3.1. Effectif du cheptel

La population mondiale de chameaux est estimée à 20 millions, selon les statistiques (ANONYME-1, 2009). La population cameline recensée en Algérie est de 245 000 têtes (ANONYME 2, 2006), réparties dans les régions steppiques (75%) et dans le Sahara (25%), (BEN AISSA, 1989). Cette population est élevée surtout en mode semi nomade (ADAMOU, 2008).

Le dromadaire est une composante importante de l'écosystème désertique. Il possède une tolérance exceptionnelle aux conditions hostiles des régions arides et désertiques comme les températures élevées, les radiations solaires, le manque d'eau, les terrains sableux et souvent la qualité médiocre de la végétation. Dans de telles conditions, cette espèce peut produire du lait et de la viande à partir d'une végétation peu ou pas utilisable par d'autres espèces domestiques, donc à des coûts relativement faibles (HAMMADI, 2003).

1.3.2 Production laitière

Dans des conditions drastiques, la chamelle a la possibilité à produire plus de lait que toutes les autres espèces et pendant des temps plus longs. Chaque chamelle produit entre 1000 et 2000 L de lait par période de lactation de 8 à 18 mois (ANONYME-2, 2006). La moyenne quotidienne de production laitière se situe entre 3 et 10 kilogrammes, au cours d'une période de lactation de 12 à 18 mois (FAYE, 2003). L'estimation de la production varie d'une région à une autre. En Afrique, elle oscille entre 1000 et 2700 litres par lactation.

En Asie, on relève des valeurs plus extrêmes, allant de 650 à plus de 12 000 litres/lactation. Dans des conditions intensives d'alimentation, il n'est pas rare d'obtenir des

moyennes de production comprises entre 3000 et 8000 Kg de lait et des valeurs quotidiennes de l'ordre de 20 litres (CHEHMA, 2004).

Durant la période allant de 2000 à 2005, la production du lait camelin dans notre pays occupe 0,5% de la production laitière totale (estimée à 1.583.583 tonnes) (ANONYME 3, 2006).

I.4. Composition du lait

Le lait de dromadaire est un liquide blanc opaque, de goût sucré ou salé selon le type d'alimentation et la disponibilité en eau (FARAH, 1993). Le pH moyen se situe autour de 6,5 alors que la densité moyenne est de 1,029. La composition chimique du lait camelin, en relation avec sa valeur nutritionnelle, a fait l'objet de plusieurs rapports (Tableau I). Les teneurs indiquées sont relativement similaires à celles du lait de référence en ce qui concerne les protéines, les lipides, le lactose, l'azote non protéique et les cendres.

En cas de déshydratation, la teneur en eau du lait de chamelle augmente (passant de 86 à 91 %), ce qui constitue une adaptation naturelle au milieu afin d'assurer en priorité les besoins des jeunes chamelons (YAGIL et ETZION, 1980).

Tableau I : Indications sur la variation de la composition chimique du lait camelin (g/kg); valeurs rapportées par différents auteurs pour le même paramètre mesuré.

Extrait sec total	Matière grasse	Matières azotées totales	Cendres	Références
144	55	34	9	KNOESS, (1977)
98	32	42	6	DESAL <i>et al</i> , (1982)
119	36	44	8	SAWAYA <i>et al</i> , (1984)
130	33	56	8	GNAN et SHERIHA, (1986)
134	32	48	7	ABDEL-RAHIM, (1987)
113	33	47	9	ABU-LEHIA, (1987)
110	35	39	8	HASSAN <i>et al</i> , (1987)
142	38	55	8	ABU-LEHIA, (1989)
122	32	52	8	FARAH et RÜEGG, (1989)
119	32	45	8	MEHAÏA et AL-KANHAL, (1989)
134	36	55	8	BAYOUMI, (1990)
109,5	31,5	28,1	8,3	ELAMIN et WILCOX, (1992)
113,5	32,2	29,1	7,9	MEHAÏA <i>et al</i> , (1995)
128	34,5	31,5	9,5	ATTIA <i>et al.</i> , (2000 a)

1.4.1. Glucides

Comme dans le lait bovin, le lactose est le glucide majoritaire présent dans le lait camelin. Sa teneur (valeur maximale = 56 g/kg) varie légèrement avec la période de lactation (HASSAN *et al*, 1987; FARAH, 1993).

1.4.2. Lipides

Comme dans le lait des autres espèces de mammifères, la fraction lipidique du lait camelin est constituée essentiellement de triglycérides, qui représentent 97 à 98 % de la matière grasse totale. La composition (Tableau II) fait ressortir une faible teneur en acides gras à chaîne courte et moyenne (de C4 à C12), et une teneur relativement élevée en C14 : 0, C16 : 1, C18 : 0 et C18 : 1. Ces résultats confortent la bonne digestibilité de cette matière grasse, critère relativement important sur le plan nutritionnel (GNAN et SHERIHA, 1986 ; FARAH et RÜEGG, 1989; GORBAN et IZZELDIN, 2001).

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

Nature des acide Gras	Teneur (g/Kg)	
	Lait camelin	Lait bovin
C4 : 0	0,60	2,60
C6 : 0	0,22	1,65
C8 : 0	0,21	1,12
C10 : 0	0,25	2,75
C12 : 0	1,19	3,89
C14 : 0	13,11	13,05
C14 : 1	0,70	1,70
C15 : 0	0,10	1,50
C16 : 0	31,45	38,59
C16 : 1	11,62	2,30
C18 : 0	16,12	8,65
C18 : 1	20,70	20,52
C18 : 2	1,91	1,92
C18 : 3	1,33	1,34
C20 : 0	0,49	0,49
C4-C12	2,47	12,01
<i>Ins./sat.</i>	0,57	0,34

La microstructure, la composition et les propriétés cristallographiques et thermiques de cette matière grasse ont été étudiées par KARRAY-LAADHAR, (2006).

Des travaux ont mis en évidence une résistance physique appréciable des globules gras du lait camelin qu'ils attribuent à une teneur plus élevée en phospholipides. Ces derniers,

qui se présentent à la surface des globules gras, constituent de bons agents émulsifiants et permettent, avec l'épaisseur de la membrane globulaire, de conférer au lait camelin une meilleure stabilité physique. Cette propriété qui s'ajoute au faible diamètre des globules seraient à l'origine de l'écémage difficile du lait camelin (ATTIA *et al*, 2000 a).

1.4.3. Minéraux

Le lait de dromadaire constitue une bonne source d'apport en minéraux (macro et oligoéléments) pour le chamelon et le consommateur humain (BENGOUMI *et al*, 1994). FARAH (1996), a rapporté que la variation de la composition minérale du lait camelin (Tableau III) est influencée par la saison, l'état sanitaire de la mamelle et le stade de lactation.

D'après AL-AWADI et STRIKUMAR, (2001), le lait de chamelle est plus concentré en manganèse et en fer comparé au lait de vache. Le lait de femme est plus concentré en cuivre que le lait de chamelle et de vache (Tableau IV). Les concentrations en sélénium sont comparables pour les trois laits.

Tableau III: Composition moyenne en principaux minéraux du lait de dromadaire (g/l).

Sodium (Na)	Potassium (K)	Calcium (Ca)	Magnésium (Mg)	Phosphore (P)	Fer (Fe) mg/l	Références
0,59	1,73	1,15	0,14	0,84	-	ABU-LEHIA, (1987)
0,36	0,6	1,32	0,16	0,58	-	GNAN et SHERIHA, (1986)
0,36	0,62	1,16	0,08	0,71	-	HASSAN <i>et al</i> , (1987)
0,69	1,56	1,06	0,12	0,63	-	MEHAÏA et AL-KANHAL, (1989)
0,39	1,61	0,76	0,04	0,49	-	MOHAMED (1990)
0,43	0,72	0,30	0,045	-	-	EL-AMIN et WILCOX (1992)
0,90	2,11	0,78	0,11	1,46	3,41	BENGOUMI <i>et al</i> , (1994)
0,66	1,72	1,23	0,09	1,02	-	ATTIA <i>et al</i> , (2000 b)
[0,35-0,6]	[1,35 1,55]	[1,01,40]	[0,1-0,15]	[0,75-1,10]	-	ALAIS (1984)

[] : Valeur moyenne pour le lait de vache.

Tableau IV : Teneurs en certains ions métalliques dans les laits humain, bovin et camelin; comparaison avec la teneur de la ration infantile (AL-AWADI et STRIKUMAR, 2001).

Origine	Zinc (mg/l)	Cuivre (mg/l)	Manganèse (µg/l)	Sélénium (µg/l)	Fer (mg/l)
Lait camelin	4,9 ± 0,5	0,36 ± 0,02	79,6 ± 7,4	13,9 ± 2,4	3,16 ± 0,03
Lait bovin	6,2 ± 0,3	0,27 ± 0,04	27,8 ± 5,2	12,6 ± 3,6	0,29 ± 0,02
Lait humain	2,9 ± 0,4	0,6 ± 0,1	4,4 ± 0,4	14,3 ± 2,1	0,26 ± 0,05
Ration infantile	5,7 ± 0,3	0,53 ± 0,03	36,9 ± 0,4	14,1 ± 3,6	0,71 ± 0,1

1.4.4. Vitamines

Le lait de chamelle contient moins de vitamines A (retinol), E (tocophérol), B1(thiamine), B2 (riboflavine), B5 (acides pantothénique) et B9 (acide folique) que le lait de vache (SAWAYA *et al*, 1984 ; FARAH *et al*, 1992 ; MEHAÏA, 1994). Il se distingue par sa richesse en vitamine C (acide ascorbique) dont la concentration (37,4 mg/l) est supérieure à celle trouvée dans le lait bovin et humain (FARAH *et al*, 1992). Cette richesse en vitamine C est de nature à compenser la rareté des fruits et légumes dans les zones arides. Elle expliquerait également l'utilisation du lait de dromadaire comme « médicament » dans certains pays asiatiques pour stimuler les fonctions du foie et lutter contre la fatigue générale (SHARMANOV *et al*, 1978; FARAH *et al*, 1992). A l'instar du lait bovin et humain, le lait de chamelle contient peu de vitamine B12 (cyanocobalamine) et le taux en vitamine A est variable en fonction du régime alimentaire.

1.4.5. Fraction azotée et protéines

La première azotée protéique représente 89,9% de l'azote total du lait de chamelle (contre 94,3% pour le lait bovin). La fraction azotée non protéique, qui représente 10,1%, est nettement plus élevée que celle du lait de référence dont la teneur se situe autour de 5,7% (MEHAÏA et ALKANHAL, 1992 ; FARAH, 1993 et 1996), (Tableau V). Cette dernière fraction est caractérisée par une haute valeur biologique qui est due à sa richesse en acides aminés libres, en nucléotides et certains précurseurs de vitamines ainsi que des peptides, de l'acide urique, urée, créatine, créatinine,...etc (MEHAÏA et ALKANHAL, 1992 ; MEHAÏA *et al*, 1995).

Tableau V: teneurs comparatives des fractions azotées (mg/100ml) des laits camelin, caprin et bovin (MEHAIA et ALKANHAL, 1992).

Formes d'azotes	Lait de chamelle	Lait de chèvre	Lait de vache
Azote total (NT)	485	475	540
Azote protéique (NP)	436	438	509
Azote non protéique (NPN)	49	37	31
NPN / NT %	10,1	7,8	5,7

Les acides aminés libres les plus abondants sont: l'acide glutamique, l'alanine, la phosphosérine, la glutamine et la phénylalanine (TAHA et KIELWEIN, 1990 et MEHAIA et ALKANHAL, 1992). La présence de taurine (dérivé de la cystine), qui se trouve à une teneur assez considérable dans le lait camelin, est intéressante à relever de part le rôle physiologique qui lui est connu dans les fonctions cardiaques et musculaires (MEHAIA et ALKANHAL, 1992).

La composante protéique du lait bovin est constituée principalement par deux groupes de protéines: les caséines majoritaires (environ 80% de la fraction protéique du lait) qui sont présentes à l'état colloïdal et les protéines solubles (20%), qui se retrouvent dans le lactosérum. Les caséines correspondent à la fraction protéique précipitant à pH 4,6 et à 37°C tandis que dans ces conditions les protéines solubles demeurent en solution.

Tenant compte de l'importance de cette fraction et ses implications dans le thème que nous nous proposons de traiter, nous les aborderons dans ce qui suit de façon plus détaillée.

1.4.5.1. Protéines solubles

La distribution qualitative et quantitative des protéines solubles diffère d'une espèce animale à une autre. Celle retrouvée dans le lait de dromadaire se singularise par l'absence en son sein de la protéine sérique majeure du lait bovin à savoir la β -lactoglobuline, qui est aussi absente dans le lait humain. D'autres protéines seraient spécifiques seulement au lait camelin et sont absentes dans les autres laits. C'est le cas de la protéine acide ou *whey acidic protein* (WAP), du *peptidoglycan recognition protein* (PGRP) de la protéine basique ou *whey basic protein* (WBP) (BEG *et al*, 1986b; KAPPELER *et al*, 2003; OCHIRKHUYAG *et al*, 1998).

Les principales protéines solubles du lait camelin sont l' α -lactalbumine, le sérum albumine, la lactophorine A (protéose-peptone-3 ou PP3), les immunoglobulines et la

lactoperoxydase (Tableau VI). L' α -lactalbumine est la protéine soluble majeure du lait des camélidés (BEG *et al*, 1985; CANTISANI *et al*, 1990), des rongeurs (VILOTTE et SOULIER, 1992) et de l'homme (BRIGNON *et al*, 1985). Alors que chez les ruminants domestiques (bovins, ovins, caprins), c'est la β -lactoglobuline qui constitue la principale protéine du lactosérum du lait.

Le lait contient également un certain nombre de protéines présentant des propriétés biologiques variées (enzymes, régulateurs de la prise alimentaire, molécules bio-actives ...etc).

La conservation relativement aisée du lait de chamelle et ses propriétés médicinales qu'évoquent souvent les nomades, ont conduit certains scientifiques à chercher à établir ses bienfaits sur la santé. Ainsi, on a pu mettre en évidence l'effet antimicrobien de plusieurs molécules contenues naturellement dans ce lait dont notamment :

- le lysozyme inhibant la croissance de certains germes pathogènes (BARBOUR *et al*, 1984 ; DUHAIMAN, 1988);
- la lactoferrine, la lactoperoxydase et les immunoglobulines G et A présentant une activité protectrice importante vis-à-vis de nombreux micro-organismes et virus (EL-AGAMY *et al*, 1992);
- la présence d'une protéine similaire à l'insuline (Beg *et al.*, 1986a), qui pourrait expliquer l'utilisation du lait de chamelle par les bédouins pour traiter le diabète;
- l'absence de la β -lactoglobuline (OCHIRKHUYAG *et al*, 1998) considérée comme un composant allergène du lait bovin. Cette propriété fait du lait camelin une alternative potentielle au lait de vache pour les enfants allergiques (RESTANI *et al*, 1999) et pour les formules infantiles eu regard de son analogie avec le lait humain.

1.4.5.2. Caséines

Les caséines, qui précipitent à leur pH isoélectrique (4,6 pour le lait bovin et 4,2 et 4,3 respectivement pour le lait caprin et camelin), (THOMPSON *et al*, 1965), sont constituées de 4 protéines différentes : (α 1, α 2, β et κ) dont les deux premières sont particulièrement sensibles au calcium (*calcium sensitive caseins*) en raison de leur précipitation à la concentration calcique normale du lait (30 mM), indifféremment de la température.

Ces caséines ont tendance à s'associer en particules sphériques ou micelles, de taille variable et fortement hydratées et minéralisées. L'assemblage et la cohésion de cette structure micellaire sont assurés par des liens phospho-calciques (HAMBRAEUS, 1982).

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

Plusieurs travaux ont été réalisés pour la séparation et la caractérisation des caséines camelines, notamment par chromatographie et électrophorèse (FARAH et FARAH-RIENSEN, 1985; LARSON-RAZNIKIEWIEZ et MOHAMED, 1986; MOHAMED, 1990; OCHIRKHUYAG *et al*, 1997 ; KAPPELER *et al*, 1998). Les séquences nucléotidiques des ADN complémentaires qui codent pour les quatre caséines camelines ont été déterminées par KAPPELER *et al*, (1998).

En comparant les caséines bovine et camelines, KAPPELER *et al*, (1998) déduisent que les dernières sont moins phosphorylées et moins riches en phosphate de calcium micellaire.

Tableau VI : Concentration moyenne des protéines du lait de différentes Espèces en (mg/l) (KAPPELER *et al*, 2003).

Protéine	Chamelle	Vache	Femme	Fonction principale
α 1-Caséine	5000	12000	Trace	Nutritive (acides aminés, Ca, P)
α 2-Caséine	2200	3000	Trace	Nutritive (acides aminés, Ca, P)
β -Caséine	15000	10000	4670	Nutritive (acides aminés, Ca, P)
κ -Caséine	800	3500	Trace	Coagulation de la micelle de caséines
α -Lactalbumine	3500	1260	3400	Synthèse du lactose
β -Lactoglobuline	-	3500	-	Liaison et transport des acides gras et du rétinol
Whey acidic protein (WAP)	157	-	-	Régulation dans la croissance épithéliale ; similaire au WDNM
Lactophorin (PP3)	950	300	-	Inhibition de la lipolyse
Lactoferrine	95 ↓↑	140 ↓↑	565 ↓↑	Anti-inflammatoire, nutritive, fixation du fer
Lactoperoxydase	-	30	6 ↓	Anti-inflammatoire, activité bactéricide
Peptidoglycan recognition protein (PGRP)	107 ↑	-	-	Anti-inflammatoire
Lysozyme C	-	~100 ↓↑	274 ↓	Activité bactéricide, N-acetylmuramidase

↓ indique une variation de concentration de la période colostrale et au cours de la lactation.

↑ indique une augmentation de concentration au cours des mammites.

1.4.5.2.1. Caséine α S1

C'est la protéine la plus abondante du lait. Dans le lait de chamelle, elle représente 22 % des caséines totales et contient 215 acides aminés pour une masse moléculaire de 25,773 kDa et un point isoélectrique de 4,4 (KAPPELER *et al*, 1998).

1.4.5.2.2. La caséine α S2

L' α S2 cameline est composée de 178 acides aminés pour une MM de 21 266 Da. Son point isoélectrique est de 4,58. Cette caséine présente des délétions au niveau de sa structure primaire au niveau d'une région de l'hélice α entre Glu49 et Asn89. Cette délétion entraîne la perte des sérines phosphorylées successives (Ser56, Ser57, et Ser58) qui sont impliquées dans la structure primaire de la caséine α S2 bovine. Ce qui n'est pas sans conséquences dans l'assemblage de la micelle, dans sa stabilité et dans ses propriétés nutritionnelles (FERRANTI *et al*, 1995).

1.4.5.2.3. La caséine β

La caséine β cameline est composée de 217 acides aminés pour une MM de 24 651 Da. Son pHi se situe à 4,76. Dans cette protéine, les sites de phosphorylation y sont présents en 4 positions (Ser 15, 17, 18, et 19) (KAPPELER *et al*, 1998).

1.4.5.2.4. La caséine κ

Bien que non majoritaire dans la micelle (3,3 g/l de lait) (RIBADEAU-DUMAS et GRAPPIN, 1989), elle est une des protéines laitières les plus étudiées, car elle joue un rôle fondamental dans le phénomène de stabilisation/déstabilisation de la micelle, particulièrement en faisant l'objet d'une coupure spécifique par la chymosine, dont le coagulum formé est nécessaire pour la fabrication de fromage à pâte pressée.

La caséine κ cameline est composée d'une séquence de 162 acides aminés. Sa masse moléculaire est de 18 254 Da et son point isoélectrique se situe à pH 4,11. Les sites de phosphorylation y sont présents en 2 positions (Ser 141 Ser 159).

KAPPELER *et al*. (1998) considèrent que la caséine κ représente le constituant déterminant de la croissance des submicelles déterminant ainsi la taille de la micelle. Elle serait également « le facteur stabilisant » de celle-ci grâce à ses groupements C-terminaux hydrophiliques responsables des forces répulsives stériques (WALSTRA, 1990) qui s'opposent à la floculation des micelles. Les formes glycosylées qui sont prédominante dans le lait camelin peuvent favoriser fortement les deux caractéristiques de la caséine κ citées ci-dessus grâce notamment aux répulsions stériques des groupements acides sialiques chargés et à l'hydrophobicité élevée (KAPPELER *et al*, 1998).

1.4.5.3. La micelle de caséine

La micelle de caséines permet, par un regroupement adéquat, de maintenir en solution des protéines non globulaires et de fixer en son sein une quantité importante de phosphate de calcium et magnésium colloïdal.

Pour comprendre comment ces protéines arrivent à s'organiser dans le lait et permettre les différentes transformations connues en produits dérivés du lait, trois modèles ont été proposés jusque-là :

- à noyau enveloppé de WAUGH ET AL (1970) ;
- à structure interne uniforme décrit par GARNIER et RIBADEAU-DUMAS (1970) ;

- en submicelles de SHMIDT (1980), (figure 2). Ce dernier, qui repose sur l'existence de submicelles de caséines, qui s'associent par pontage phosphocalcique, reste l'un des plus admis, car il est conforté par les essais de comportements des protéines dans divers conditions (action enzymatique de la chymosine immobilisée, fixation de la β -lactoglobuline en surface induite par des traitements thermiques excessifs, action des détergents ...etc) (HOLT, 1992). Néanmoins, l'observation, par balayage aux rayons X, pour la première fois de la structure des micelles de caséines sur un domaine étendu d'échelles de longueurs allant de 2 nm à 1000 nm et l'analyse des courbes de diffusion qui en découlent n'ont pas confirmé la présence de ces structures "submicellaires" (PIGNON *et al*, 2004, MARCHIN *et al*, 2007).

Globalement dans ces représentations, la caséine κ est présente de façon prononcée en surface de la micelle, notamment avec son pôle fortement hydrophile et est de ce fait accessible à l'enzyme coagulante.

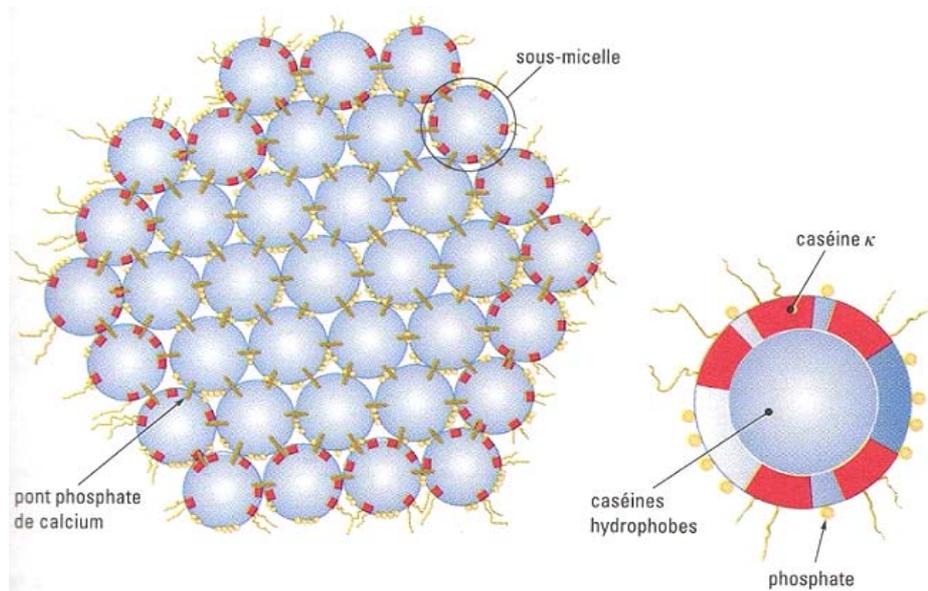


Figure 2 : Représentation de la micelle de caséine bovine selon le modèle de SCHMIDT (1980).

En ce qui concerne l'organisation structurale de la micelle de caséines cameline, les rares travaux publiés sur ce sujet ont concerné exclusivement l'aspect et la taille visualisée par microscopie électronique. Elle est de forme sphérique, de taille variable (25 à 400 nm selon GOUDA et *al.* (1984) et est composée d'un certain nombre de submicelles (FARAH et BACHMANN, 1987).

KHEROUATOU (2004) a mentionné que la micelle du lait de dromadaire diffère de son homologue du lait de référence sur plusieurs aspects :

- un diamètre micellaire plus important (0,4-0,5 μm contre 0,13-0,16 μm) ;
- une distribution de taille plus large (0,6 μm contre 0,3 μm) ;
- une minéralisation plus élevée (11,4 contre 7,2 g/100g de poids sec) ;
- un taux de caséines totales plus faible (20,60 g/kg contre en moyenne 28 g/kg).

1.5. Aptitudes technologiques du lait camelin.

1.5.1. Coagulation du lait.

La coagulation du lait est une étape importante de la préparation du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé qui, après un certain nombre de transformations, deviendra un fromage. Le processus de la coagulation est provoqué par l'action d'un coagulant (riche en chymosine), ajouté à un taux bien défini au lait de fabrication, sous des conditions de température et pH contrôlées.

Tel que décrit sur le lait bovin, le phénomène de coagulation du lait se produit en deux étapes :

- une phase primaire, enzymatique au cours de laquelle la présure hydrolyse la caséine κ au niveau de la liaison peptidique Phe105-Met106. Cette action divise la molécule de la caséine κ en deux fragments peptidiques ; le caséinomacropéptide (CMP) ou s'il est fortement glycosylé est dénommé glycomacropéptide (GMP) et la para caséine κ . Cette hydrolyse entraîne une réduction de la charge négative et des répulsions stériques de telle sorte que les micelles de caséine deviennent susceptibles à l'agrégation (LUCHEY, 2002).

-Une phase secondaire, agrégation, durant laquelle la libération du macropéptide de la caséine κ sous l'action de la protéase employée entraîne la réduction des répulsions électrostatiques entre les micelles de caséine hydrolysées. L'élimination de ces macropéptides entraîne également une réduction du diamètre hydrodynamique (d'environ 5 nm) et une perte de la stabilité stérique (WALSTRA *et al*, 1981).

La nature des interactions intervenant durant la phase d'agrégation n'est pas encore bien connue, toutefois les ponts calciques et les forces de Van der Waals ainsi que les interactions hydrophobes semblent impliqués (SCHMIDT, 1982). Les micelles déstabilisées s'agrègent en présence des ions calcium libres (Ca^{++}) et la coagulation se produit seulement en présence d'une quantité suffisante de phosphate de calcium colloïdal (LUCHEY et FOX, 1993). Au début, il y a formation de chaînes linaires de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas. Ces derniers font constituer le gel protéique qui se sépare nettement de la phase liquide ou lactosérum. (LUCHEY, 2002).

1.5.2. Les principales enzymes utilisées en fromagerie

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire.

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

Tableau VII: Origine des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait (MIETTON *et al*, 1994).

Origine	Enzymes
Animaux Ruminants <ul style="list-style-type: none"> • Veaux (*) • Chevaux (*) • Agneaux (*) • Bovins adultes (*) Monogastriques <ul style="list-style-type: none"> • Porc Oiseaux <ul style="list-style-type: none"> • Poulets 	Chymosine + pepsine Pepsine + chymosine Pepsine Pepsine
Végétaux <ul style="list-style-type: none"> • Figuier (suc) • Ananas (tige) • Chardon, artichaut • Gaillet • Courge 	Ficine Broméline
Moisissures <ul style="list-style-type: none"> • <i>Endothia parasitica</i> (*) • <i>Mucor pusillus</i> (*) • <i>Mucor miehei</i> (*) • <i>Aspergillus niger</i> 	Protéase Protéase Protéase Chymosine "génétique"
Levures <ul style="list-style-type: none"> • <i>Kluyvermyces lactis</i> 	Chymosine "génétique"
Bactéries <ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Bacillus subtilis</i> 	Chymosine "génétique" Subtiline "génétique"

* coagulants autorisés en France

Dans notre pays, plusieurs essais ont été entrepris sur ces sources de remplacement, tant au niveau laboratoire qu'avec des applications en milieu industriel. Nous pouvons citer les premiers essais de MATOUB (2000) sur la coagulase extraite de *Bacillus subtilis*, de BENGANA (2001) sur la pepsine, complétés et approfondis dans le cadre de la thèse réalisée par NOUANI (2009) sur plusieurs extraits issus de proventricules de poulets et d'estomacs de limon, de fleurs d'artichauts et du latex de figuier et celles produites par culture du champignon *Mucor pusillus*.

1.5.2.1. Enzymes d'origine animale

Les enzymes coagulantes d'origine animale sont des protéases gastriques. Les plus utilisées en fromagerie sont la présure, constitué principalement de chymosine (E.C.3.4.23.4) et de pepsines (E.C. 3.4.23.1, 2,3), d'origine bovine ou porcine. Ces protéases sont formées à partir d'un précurseur inactif (zymogène), secrété par la muqueuse gastrique. Elles perdent dans le processus de leur activation un peptide N-terminal constitué d'une quarantaine d'acides aminés (variable selon la nature, l'origine et le variant de l'enzyme considérée).

Ainsi, la pro-chymosine possède un segment riche en Glu, Lys, Leu et Ile alors que Le pepsinogène possède un polypeptide riche en Lys, Pro, Ala et Leu. Ces segments occupent les sites actifs et réduisent, par empêchement stérique, le contact de l'enzyme avec son substrat. De ce fait, l'activation du pro-enzyme nécessite la libération du pro-segment et la dissociation de ce dernier du site actif (RICHTER *et al*, 1998). Dans le cas de la chymosine, cette action est accompagnée d'une réduction du poids moléculaire qui passe de 36 000 (pro-chymosine) à 31 000 (chymosine), (FOLTMANN, 1971).

Cette activation a lieu à pH acide (inférieur à 5) où l'excès de charges positives du milieu va induire un changement de conformation de la molécule par rupture des interactions électrostatiques qui ont lieu entre les résidus basiques du pro-segment et les résidus acides de la portion correspondante à l'enzyme active (SANNY *et al*, 1975 ; RICHTER *et al*, 1998).

Il a été constaté que dès qu'une très faible quantité d'enzyme est libérée du précurseur à la faveur de l'acidité stomacale, la réaction devient auto-catalytique. L'enzyme produite provoque l'activation du zymogène par libération du pro-segment. Cette opération est réalisée soit par clivage d'une seule liaison peptidique (voie directe) ou de plusieurs liaisons (de façon séquentielle) (HORBOE *et al*, 1974 ; KAYAGEMA et TAKAHASHI, 1976 ; KOGA et HAYASHI, 1976 ; RICHTER *et al*, 1998).

En considérant la structure primaire des substrats hydrolysés, la chymosine a une action similaire à celle de la chymotrypsine dans le sens où elle coupe préférentiellement les liaisons peptidiques situés notamment à droite des acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) alors que la pepsine coupe plutôt la liaison peptidique située à gauche de ces acides aminés (DELVIN, 2006).

1.5.2.1.1. La présure

La présure de veau est l'agent coagulant traditionnellement utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages. Selon la fédération internationale du lait (FIL), la dénomination «présure» est donnée à l'extrait coagulant provenant de caillettes de jeunes ruminants abattus avant sevrage (ANDREN, 2002). Elle contient deux fractions actives, l'une, majeure, constituée par la chymosine, l'autre, mineure, par la pepsine (rapport de masse: chymosine/pepsine) ≥ 1.38 . Au pH du lait (6,2-6,6), la chymosine représente plus de 80 % de l'activité coagulante (ANDREN, 2002). Notons que de petites quantités de présure sont produites à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau (DESMAZEAUD, 1997).

Chez le bovin, la sécrétion de chymosine est réduite après sevrage et la pepsine devient de plus en plus dominante dans l'estomac d'un animal adulte.

Afin d'améliorer les rendements d'extraction de cette enzyme, des procédés de son obtention à partir de veaux fistulés ont fait l'objet de plusieurs expériences. La collecte de présure, deux fois par jour, jusqu'à ce que les veaux atteignent trois à quatre mois, a permis l'obtention d'une quantité de présure 30 à 40 fois plus importante que celle obtenue par veau après abattage (ALAIS, 1974 ; ERNESTROM et WONGT, 1983). Toutefois, le coût opératoire et les risques cliniques ont limité le développement de ces voies.

Par ailleurs, l'obtention de chymosine par transgénèse connaît actuellement un grand développement, vu le rendement élevé et la qualité de produit obtenue qui est comparable à celle de la chymosine de veau extraite par les procédés classiques (BELDARRAIN *et al*, 2002).

Au niveau de la chymosine, trois fractions désignées A, B et C sont rencontrées mais ont des activités spécifiques différentes évaluées respectivement à : 125, 100 et 57. La chymosine B est la plus abondante de ces trois formes (FOLTMANN, 1971). Deux variants génétiques pour les chymosines A et B ont été mis en évidence. Ils sont différents par la nature d'un seul acide aminé en position 244 : l'acide aspartique pour le variant A est remplacé la glycine dans le cas du variant B. Ces deux variants sont présents à un taux de 50% dans la population bovine. Bien que la chymosine A possède une activité coagulante 25% supérieure à celle de la chymosine B, les deux variants possèdent des propriétés fromagères similaires (ANDREN, 2002).

Concernant les conditions d'action de cette enzyme, il a montré que le pH optimum de son activité protéolytique se situe à 4,0 et que son activité maximale se situe à pH 5,5 pour une température d'incubation de 42°C (FOLTMANN, 1971 ; RAMET, 1997), (Tableau VIII). Au pH du lait frais (6,6-6,8), la chymosine possède une activité coagulante élevée comparée à la pepsine (rapport de 1/5) (ANDREN, 2002). La chymosine hydrolyse son substrat en milieu de chaîne est possède une double activité, l'une spécifique et prépondérante sur la caséine κ qui conduit à sa déstabilisation micellaire au cours de la phase de coagulation et une activité plus faible de protéolyse générale sur les différentes fractions caséiniques, qui intervient essentiellement pendant l'affinage du fromage (O'KEEFFE *et al*, 1976 ; DAVE *et al*, 2003).

Tableau VIII : Caractéristiques des enzymes gastriques, selon ERNSTROM et WONGT (1983) et CUVELLIER (1993).

Principales Caractéristiques		Chymosine	pepsine bovine		pepsine porcine
			I	II	
Masse molaire	pro-enzyme	36.000	38.943		42000
	enzyme active	31.000	-	33.400	34.500
Fractions		A, B, C,	-		A, B, C, D,
pH d'activation		5,0 ; 2,0	2,0		2,0
N-terminal	pro-enzyme	Glycine	Leucine	Sérine	Leucine
	enzyme active	Alanine	-	Valine	-
C-terminal	pro-enzyme	Isoleucine	Alanine		-
	enzyme active	Isoleucine	-	Alanine	-
pH optimum d'activité protéolytique sur l'hémoglobine		3,4	2,8	≤2	1,8
pH de stabilité (à 25°C)	pro-enzyme	5,3-9,0 ^a	>7,0 ^b		≤10,5 ^b
	Enzyme	5,3-6,3 ^a	< 6,0 ^b		≤ 6,5 ^b
pH inhibition (enzyme)		> 6,3a ; <3,5a	>6,9b		> 6,5b

^a valeurs déterminées sur l'hémoglobine comme substrat, ^b valeurs déterminées sur le lait comme substrat

1.5.2.1.2. La pepsine

La pepsine est une protéase acide présente dans le suc gastrique de tous les mammifères et les oiseaux. L'une de ses remarquables caractéristiques est sa grande activité dans cet environnement très acide. Elle est active même à pH 1 (Réf) où plusieurs enzymes et protéines subissent une rapide dénaturation.

1.5.2.1.2.1. La pepsine bovine

La pepsine bovine (E.C.3.4.23.1) est extraite à partir des caillottes d'animaux adultes et de veaux sevrés. Son poids moléculaire est de 33 400. L'extrait brut contient un pepsinogène majoritaire et plusieurs pepsinogènes mineurs qui donnent après activation à pH 2,0 les pepsines (I et II) correspondant (CHOW et KASSELL, 1968).

ANTONINI et RIBADEAU-DUMAS (1971) ont pu révéler la présence d'une pepsine I qui semble être un constituant mineur et d'une pepsine II dans l'extrait de caillette de bœuf issus de deux zymogènes différents. Les propriétés protéolytiques de la pepsine

bovine sur les caséines sont assez similaires à celles de la chymosine et provoque la coagulation du lait frais, contrairement à la pepsine porcine (ERNSTROM et WONG, 1983 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992). L'activité coagulante est néanmoins moins dépendante du pH (ERNSTROM et WONG, 1983). Elle est utilisée en fromagerie en mélange (50/50) avec la présure (RAMET, 1997a).

1.5.2.1.2.2. La pepsine porcine

L'extrait brut obtenu à partir de la muqueuse gastrique du porc contient en majorité de la pepsine A et des composés mineurs correspondants aux pepsines B, C, D, et à la gastricine (E.C.3.4.23.3) (CUVELLIER, 1993). Les pepsines sont produites à partir de zymogènes différents. La pepsine porcine (E.C.3.4.23.2) est formée d'une seule chaîne polypeptidique de 321 résidus d'acides aminés (masse moléculaire égale à 35000 Da), (SEPULVEDA *et al*, 1975 ; KAGEYAMA et TAKAHASHI, 1976). Son activité catalytique est la plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat (ANTONINI et RIBADEAU-DUMAS, 1971).

Les pepsines B et C provoquent la coagulation du lait mais beaucoup moins rapidement que la pepsine A. Cependant, contrairement à la pepsine A, elles sont relativement stables au pH 6,9. La pepsine D, très instable aux pH supérieurs à 6,0, est deux fois plus active que la pepsine majoritaire dans le processus de coagulation du lait (ERNSTROM et WONGT, 1983).

Le principal inconvénient de la pepsine porcine comme agent coagulant du lait est le fait que son activité coagulante est fortement dépendante du pH. En effet, à des valeurs fréquemment utilisées en fromagerie (pH voisin de 6,5 et température de 30 °C), la pepsine porcine est partiellement dénaturée et, après une heure d'incubation, seulement 50% de son activité coagulante est maintenue (ANDREN, 2002).

De plus, l'emploi de la pepsine porcine présente des inconvénients dus à une activité protéolytique supérieure à celle de la présure, avec présence d'arrière goût et d'amertume pour certains fromages (BRULE et LENOIR, 1997).

1.5.2.2 Enzymes d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale sont diverses mais parmi celles qui sont les plus utilisées en technologie laitière, on retrouve la papaïne, la broméline et la ficine :

- la papaïne extraite d'une plante équatoriale et tropicale (*Carioca papaya*). Elle est caractérisée par une activité coagulante assez forte mais également un fort pouvoir protéolytique (CUVELIER, 1993);

- la broméline, qui est extraite de l'ananas (*Ananas comosus*). Elle a été considérée comme substituant possible de la chymosine. Des travaux de MURACHI (1970) ont prouvé qu'elle a un pouvoir protéolytique défavorable au rendement et à la qualité organoleptique dans l'industrie fromagère ;

- enfin, la ficine issue de la figue (*Ficus glabrata*) (CUVELIER, 1993). Comme la papaïne, elle a un pouvoir coagulant important mais son utilisation est limitée par son fort pouvoir protéolytique important.

1.5.2.3. Enzymes d'origine microbienne

L'industrie de fermentation s'est intéressée à la production de protéases susceptibles de remplacer efficacement et à moindre coût la présure, à partir de la culture de micro-organismes. Dans ce but, de multiples espèces de bactéries et de champignons inférieurs ont été étudiées afin de pallier à la pénurie mondiale en présure. De plus et à l'inverse des protéases gastriques qui sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, les protéases microbiennes sont produites sous une forme active (DALGLEISH, 1997).

Ainsi, plusieurs bactéries ont été testées dans ce but, entre autre : *Streptococcus liquifaciens*, *Micrococcus caseolyticus*, *Bacillus subtilis* ...etc. Ces protéases, malgré un rendement intéressant, n'ont pas toujours donné des résultats concluants au vu de la non spécificité de l'hydrolyse et la protéolyse excessive enregistrée qui ont pour conséquence une modification substantielle des caractéristiques organoleptiques des fromages (apparition d'amertume, gout acide ...etc), (ERNSTROM, 1983).

De récents travaux de génie génétique ont permis de préparer une présure formée de chymosine pure, par clonage de gène sur *Escherichia coli* (ROSS *et al*, 2000). Par ailleurs, les travaux réalisés sur différents types de levures et moisissures, ont permis de sélectionner trois types de moisissures dont les propriétés coagulantes et protéolytiques de leurs enzymes se rapprochent le plus de celles de la présure. Ces moisissures sont : *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* et *Mucor pusillus* (GOURSAUD, 1999, TUBESHA et AL-DELAIMY, 2003; NOUANI, 2011). Les enzymes produites à partir de ces micro-organismes ont donné de grandes similarités dans le mécanisme de la coagulation du lait, comparativement à l'action de la présure traditionnelle. Toutefois, malgré des essais concluants obtenus, les industriels craignent l'utilisation de cette flore qui se répand très rapidement dans un milieu où

l'humidité relative et la température sont appropriées, ce qui se transforme en contamination gênante pour la suite de la fabrication.

1.5.3. Particularités moléculaires et mécanisme d'action

Les enzymes coagulantes du lait citées plus haut, à l'exception des protéases de plantes tropicales, appartiennent toutes au groupe des protéases acides. Quoiqu'elles dérivent d'espèces différentes, ce sont des endopeptidases qui semblent partager entre-elles plusieurs caractéristiques communes liées à la nature de leur structure, à leur caractéristiques physico-chimiques et enfin à leur activité catalytique (RAO *et al*, 1998 ; ERSKINE *et al*, 2003).

Sur le lait, leur activité augmente lorsque le pH est abaissé au dessous de 6,6. Le pH optimum acide est dû à la présence dans leur structure de deux résidus catalytiques : Asp32 et Asp215 (séquence dans la pepsine porcine) (SEPULVEDA *et al*, 1975). L'un d'eux est protoné et l'autre est ionisé (ANDREEVA et RUMSH, 2001 ; ERSKINE *et al*, 2003). Ce sont donc des aspartyl protéases, compte tenu du rôle essentiel tenu par ces deux résidus aspartyls dans leur mécanisme catalytique.

1.5.3.1 Action sur les caséines

Les principales protéases utilisées pour la coagulation du lait hydrolysent préférentiellement la liaison peptidique Phe105-Met106 à l'exception de la protéase de *Cryphonecteria parasitica* qui hydrolyse la liaison Ser104-Phe105 (LUCEY, 2002). Toutefois, l'attaque d'autres sites au niveau tant de la caséine κ que des autres caséines (α S et β) se produit mais elle est généralement indésirable. L'importance de cette protéolyse « secondaire » diffère d'une enzyme à une autre. La chymosine est la protéase qui donne le minimum de protéolyse. L'attaque de la caséine β et de la caséine α s1 par la chymosine est plus lente, d'un facteur de 100, que l'attaque spécifique de la caséine κ par la même enzyme (DALGLEISH, 1982).

Les substituts de la présure sont généralement choisis par rapport à leur activité coagulante élevée (l'attaque rapide de la liaison Phe105-Met106) combinée à une activité protéolytique générale limitée. Sinon, une activité protéolytique non-spécifique élevée au cours de la coagulation peut donner naissance à des peptides qui seront perdus en solution provoquant la diminution du rendement fromager.

Les essais réalisés dans ce sens ont montré que la majorité des enzymes coagulantes ont une activité protéolytique plus importante que la chymosine, lorsque la caséine est prise comme substrat (SAIMA *et al*, 2003). Cependant, les différences sont moins évidentes

lorsqu'elles sont comparées dans le lait écrémé ou durant la fabrication du fromage mais ces enzymes de remplacement provoquent pour une grande part des pertes dans le rendement fromager (EMMONS et BINNS, 1990 ; EMMONS *et al*, 1990 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992).

La caséine β est hydrolysée par la chymosine au niveau de la liaison Leu192-Tyr193 (TRIJILLO *et al*, 2000). Alors que La caséine α 1 est hydrolysée au niveau des liaisons Phe23- Phe24 ou bien Phe24-Val25 (HYNES, *et al*, 2001 ; Dave *et al*, 2003b).

L'hydrolyse de la caséine α 1 par la chymosine est beaucoup plus rapide que celle de la caséine β . Les produits d'hydrolyse de la caséine β par la chymosine sont très amers. Ce sont des peptides, libérées de la partie C-terminal de la caséine β à savoir: β (193-209) et β (193-207 ou bien 208). Les produits d'hydrolyse de la caséine α 1 ne produisent quant à eux aucune amertume (ERNSTROM et WONGT, 1983 ; KIM *et al*, 2004).

La majorité des enzymes coagulantes testées comme succédanées sur les caséines α S et β présentent la même spécificité que la chymosine mais différent selon leur cinétique d'action. La pepsine bovine et la protéase de *Rhizomucor miehei* hydrolysent la caséine β plus lentement que la chymosine, alors que les protéase de *Cryphonecteria parasitica*, de *Cyanara cardunculus* et celle extraite du proventricule de poulet, montrent une plus grande activité protéolytique sur cette protéine (EMMONS *et al*, 1990 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992 ; TRUJILLO *et al*, 2000).

1.5.3.2 Nature du coagulum formé et interactions mises en jeu

La diminution du pH lors de la coagulation acide conduit à la neutralisation progressive des charges négatives et provoque des attractions électrostatiques entre entités de chargés opposées. Cette création de nouvelles interactions peut faciliter d'avantage les liaisons intermoléculaires entre protéines voisines ou polypeptides de la matrice du gel. De même, du fait de l'équilibre entre les sels se trouvant à l'état colloïdal et sous forme soluble, il y a déminéralisation progressive de la micelle et obtention d'un gel acide (CAYOT et LORIENT, 1998).

Dans les gels présure, les micelles de caséines ne sont pas déminéralisées. Les intercations inter protéiques sont favorisées alors que le phosphate de calcium ou de magnésium colloïdal demeure liés aux protéines, ce qui donne une plus consistance à ce type de gel qui est destiné spécialement pour les fromages à pâte pressées cuites ou non cuites (LEFEBVRE-CASES *et al*, 1998 ; LUCEY, 2002b).

Selon LUCEY et SINGH, (2003), les interactions impliquées dans la formation du gel et sa stabilité, et par conséquent ceux responsables de ses propriétés rhéologiques, sont

constituées spécialement de ponts calciques, de forces de Van Der Waals, d'interactions hydrophobes et d'interactions électrostatiques. Les liaisons covalentes sont importantes dans les gels acides cuits à température élevée tels que la Ricotta et le Quarg. Peu de littérature explique avec exactitude, la nature et le type d'interactions responsables de la formation et de la rhéologie des différents gels.

Les travaux de LEFEBVRE-CASES *et al*, (1998) et KEIM et HINRICHS (2003) sur les interactions impliquées dans la formation et la stabilité des gels présure et acide, en utilisant des agents dissociants ont permis de conclure que les interactions hydrogènes sont impliquées dans la formation des deux types de gel, et que les interactions hydrophobes et les liaisons calciques sont principalement impliquées dans la formation et le maintien du gel présure.

1.5.3.3 effets au niveau de la phase d'affinage

Le taux d'hydrolyse des fractions caséiniques, au cours de l'affinage, dépend étroitement du taux d'enzyme coagulant employé pour la coagulation (HYNES *et al*, 2001 ; DAVE, *et al*, 2003a).

L'activité protéolytique durant l'affinage du fromage, due à la quantité d'enzyme retenue par le caillé, joue un rôle essentiel dans la dégradation des caséines (WILKINSON et KILCAWLEY, 2004). La quantité d'enzyme retenue par le gel est influencée par la température de coupe du coagulum et par le pH au cours du drainage du lactosérum. En effet, l'abaissement du pH augmente le taux d'adsorption de la chymosine sur les micelles de caséine (LARSSON *et al*, 1997). Toutefois, le taux retenu pour les protéases fongiques ne semble pas être influencé par l'abaissement du pH (RAMET, 1997), ce qui n'est pas le cas des pepsines qui exigent un coupe du coagulum à pH acide (GREEN et FOSTER, 1974 ; SOUSA *et al*, 2001).

L'activité résiduelle est également liée à la stabilité thermique de l'enzyme coagulante utilisée. Ainsi, l'activité résiduelle de la chymosine dans les fromages à pâte cuite, tel l'emmental, est très réduite (HYNES *et al*, 2001). La pepsine porcine tend à être la plus sensible au chauffage. La protéase de *Cryphonectria parasitica*, la pepsine bovine, les coagulases produites par *Rhizomucor pusillus* et *Rhizomucor miehei* montrent une meilleure stabilité à l'élévation de la température (SOUSA *et al*, 2001).

En dehors de ces paramètres, la nature des produits formés au cours de l'affinage varie avec la nature de l'enzyme utilisée. Ainsi, du Cheddar préparé à l'aide de pepsine de poulet a montré un taux de protéolyse et d'amertume plus élevé que celui préparé à l'aide de la présure (GREEN *et al*, 1984). Cependant, l'utilisation de la pepsine de poulet dans la

fabrication de certains fromages à pâte cuite tels que l'Emmental a donné des résultats satisfaisants (GORDIN et ROSENTAL, 1978).

Par ailleurs, il a été constaté que la dégradation de la caséine β par les enzymes coagulantes dans le fromage est fortement affectée par le contenu en sel. L'hydrolyse de la caséine β est considérablement réduite à 5% de NaCl et complètement inhibée à 10% de NaCl. En effet, les fromages non salés contiennent moins de caséine β intacte. Les fragments C-terminaux de la caséine β qui sont reconnus être amères ont été mis en évidence dans les fromages non salés préparés par la chymosine (SOUSA *et al*, 2001).

Notons que la formation du goût amère est due à l'action combinée des enzymes coagulantes et des protéases microbiennes des cultures employées dans l'affinage sur les caséines. En effet, il y a formation de peptides de taille moyenne sous l'action des enzymes coagulantes. Ces peptides sont ensuite hydrolysés à leur tour par les protéases microbiennes en peptides de bas poids moléculaire, responsables d'amertume (O'KEEFFE *et al*, 1978 ; SOUSA *et al*, 2001).

1.5.4. Aptitudes à la coagulation du lait camelin

Bien que peu d'études lui ont été consacrés, comparativement aux laits d'autres espèces, il n'en demeure pas moins que le lait de dromadaire a montré, dès les premiers travaux, de faibles aptitudes à la transformation en produits dérivés, notamment en fromage. En effet, plusieurs auteurs ont mentionné que la coagulation de ce lait par la présure est difficilement réalisable.

Cette aptitude limitée du lait du dromadaire à la coagulation par la présure a vraisemblablement pour origine principale la composition particulière des micelles de caséine. A cet effet, des travaux ont montré que la caséine kappa, qui constitue la fraction de la micelle sensible à l'action des protéases coagulantes, possède une charge électrique moindre que celle de l'homologue dans le lait de référence, ce qui entraîne une mobilité électrophorétique plus faible (FARAH et FARAH-RIESEN, 1985 ; JARDALI, 1988 ; RAMET, 1993). De plus, l'équilibre des fractions de caséine est très différent de celui du lait de vache. On note en particulier que la proportion de caséine kappa est limitée à 5% de la caséine totale à lors quelle est de 13,6% pour le lait de vache (RAMET, 1993). Cette réduction de la proposition en cette protéine est un élément qui concoure à procurer une moindre stabilité aux micelles de caséines et une réduction d'autant de la capacité des enzymes coagulantes à l'hydrolyser et la déstabiliser en vue de l'obtention d'un coagulum « présure ».

Dans ces particularités physico-chimiques susceptibles d'avoir une relation avec cette faible aptitude à la coagulation, notons que les caséines du lait de dromadaire se trouvent

sous forme de micelles de plus grande taille (300µm de diamètre) que celles rencontrées dans le lait de vache (160µm), (FARAH et BACHMAN, 1987 ; FARAH et RUEGG, 1989 ; JARDALI et RAMET, 1991).

1.5.5. Enzymes utilisées pour la coagulation du lait de chamelle

L'ajout de la présure au lait camelin entraîne une réaction de protéolyse de la caséine dont l'évolution peut être suivie par mesure du taux d'azote non protéique libéré (MEHAIA, 1987). Il semble par contre que la réaction secondaire, qui correspond à l'agrégation des micelles de caséine préalablement hydrolysée, se déroule d'une manière particulière dans le lait de dromadaire où l'association de micelles de caséine est plus tardive et le réseau formé est plus lâche et moins compact (RAMET, 1993).

Il est vraisemblable que cette aptitude réduite à la polymérisation des micelles de caséine du lait du dromadaire résulte d'une faible potentialité du substrat à l'établissement de pont calcique entre les micelles du fait que les grosses micelles sont moins minéralisées que les petites (RAMET, 1993). De plus, les propriétés rhéologique du coagulum sont étroitement dépendantes de la teneur en matière sèche du lait : plus celle-ci est élevée, plus grande est la fermeté. Dans ce cadre, tous les composants de la matière sèche ne participent pas de la même manière à la formation du gel mais le taux de caséine a le rôle majeur : plus il est importante, plus la trame du réseau micellaire constitué lors de la coagulation est dense et plus les propriétés rhéologiques sont améliorées (FAMELART *et al*, 2009).

Plusieurs équipes de recherche se sont proposé de mieux comprendre les interactions qui ont lieu dans ce lait et lever par la même ces contraintes à la transformation technologique en produits dérivés. Ainsi, des travaux ont montré que ce comportement à la coagulation peut être amélioré moyennant soit un apport de CaCl₂ (FARAH et BACHMAN, 1987), soit un ajout de lait d'autres espèces (chèvres, brebis ou bufflesse), ou enfin par l'utilisation parallèle de ferments lactiques (Mohamed *et al*, 1990).

Faisant appel à la coagulation mixte, RAMET (1989 ; 1991) et MEHAIA (1993 a, b et 1994 b) ont fabriqué du fromage à pâte molle à base de laits de chamelle seuls ou en mélange avec du lait de brebis (JARDALI-MAATOUK, 1994 ; RAMET, 1990) ou du lait de vache (MEHAIA, 1993 a, b et 1994 b).

D'autres agents coagulants sont proposés en dehors de la présure bovine. Il s'agit de la pepsine bovine (WANGOH *et al*, 1993 ; RAMET, 1994), des protéases coagulantes microbiennes de *Mucor miehei* et d'*Endothia parasitica* (RAMET, 1985 et 1990), de la présure cameline (ELABBASSY et WAHBA, 1986 ; EL-ABBASSY, 1987 ; EL-BATAWY

et al, 1987 ; WANGOH *et al*, 1993 ; EL-AGAMY, 2000 b) et enfin de l'extrait coagulant issu de caillettes de dromadaires (SIBOUKEUR *et al*, 2005).

Il en ressort cependant de tous ces travaux, qu'un meilleur coagulum est obtenu en utilisant soit des enzymes gastriques de dromadaires, soit la pepsine bovine. Ceci résulterait d'une meilleure affinité de ces extraits enzymatiques pour les caséines camelines, comme semblent le suggérer les travaux de KAPPELER *et al* (1998), où il est montré que le site de coupure de la chymosine est différent selon les caséines κ considérées (bovines et camelines), (Figure 3).

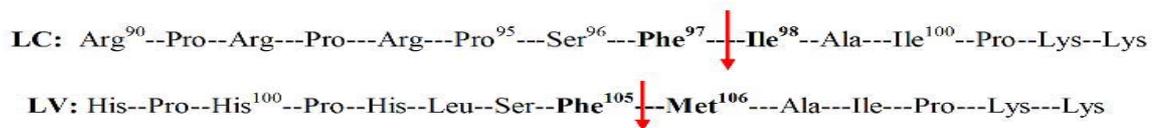


Figure 3 : Comparaison des régions de la caséine κ sensibles à la chymosine dans les laits de chamelle et de vache (KAPPELER *et al*, 1998).

LC : lait de chamelle ; LV : lait de vache ;

↓ : site préférentiel de coupure de la chymosine.

Toutefois, une réserve souvent exprimée, relative à l'utilisation de la pepsine bovine, est qu'elle possède une activité protéolytique assez prononcée, qui peut se manifester dans les fromages par la libération de peptides amers. Les autres protéases ne présentant pas ces inconvénients, seraient les mieux indiquées (RAMET, 1993).

1.5.6. Fabrication du fromage camelin

Certains fromages traditionnels de lait camelin sont fabriqués chez les nomades localisés à l'Ahaggar ainsi qu'à la péninsule du Sinaï, en Tunisie et au Kenya (YAGIL *et al*, 1994). Ces fromages sont élaborés par thermo-coagulation des protéines et obtention d'une pâte humide en forme de galette à consommer rapidement ou après séchage naturel et/ou salage (GAST *et al*, 1969 ; YAGIL, 1982 ; MOHAMED *et al*, 1990). Notons également que MOHAMED *et al* (1990) ont obtenu un fromage à pâte dure de type "GRANA" à partir du lait de chamelle non standardisé. Ces auteurs n'ont signalé aucune difficulté lors de sa fabrication et estiment que les divergences des résultats observés d'un auteur à un autre sont attribuables aux origines très différentes des laits utilisés.

D'autres types de fromages (secs) nommés «Afig et Oggit» sont fabriqués, respectivement, au Kenya et en Arabie Saoudite (AL-RUQAIE *et al*, 1987 ; MEHAIA, 1994b).

Néanmoins, les spécificités du lait de chamelle (faible proportion en κ -CN, grande taille des micelles caséiniques, petite taille des globules gras, présence d'un système antibactérien ...etc.), entravent le transfert aisé de la technologie fromagère du lait bovin au lait camelin.

C'est le cas notamment de la fabrication des fromages à coagulation acide (pâte fraîche) où la formation du caillé est assez lente (RAMET, 1993 et 1994 ; KAMOUN, 1995) du fait que l'acidification est limitée par le système antimicrobien du lait (BARBOUR *et al*, 1984 ; GNAN *et al*, 1994 a ; KAMOUN, 1995 ; EL-AGAMY, 2000 a).

Très récemment, une innovation technique, consistant en la mise au point d'un ferment (Camifloc ND), permettant de coaguler le lait de chamelle, a offert une opportunité intéressante aux éleveurs camelins du Sahel (Mali et Niger), de valoriser les excédents laitiers sous forme de fromage (VIA FRANCK *et al*, 2003). La coagulation est meilleure en ajoutant des sels de calcium sous forme de CaCl_2 (EL-ZUBEIR et JABREEL, 2008). Cette opération se heurte cependant aux difficultés d'approvisionnement en ce ferment.

Chapitre II
Materiel et Methodes

2. Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé avec la collaboration de trois laboratoires : Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides de l'Université Kasdi Merbah de Ouargla, Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université M. Mammeri de Tizi-Ouzou et Laboratoire des Sciences Alimentaires de l'Université d'Al Ain (Emirats Arabes Unis). Il a été sous tendu par le matériel et les méthodes ci après indiqués.

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel biologique

2.1.1.1. Lait de chamelle

Il s'agit des échantillons du lait collecté, pendant trois saisons différentes (hivers, printemps et été), à partir de troupeaux de dromadaires (*Camelus dromedarius*) de la population Sahraoui vivant en élevage extensif dans des parcours naturelles de trois régions du sud-est Algérien : Ouargla, El oued et Ghardaïa.

2.1.1.2. Lait de vache

Le lait de vache utilisé à titre comparatif est un mélange issu de la traite du matin de vaches en stabulation dans une ferme située dans la ville d'Ouargla.

2.1.1.3. Poudre de lait écrémé type « low heat » :

Cette poudre de lait nous a été fournie gracieusement par la Laiterie de Draa Ben Khedda (wilaya de Tizi- Ouzou).

2.1.1.4. Caséines camelines lyophilisées

Elles sont obtenues selon le protocole décrit par SCHAMET *et al* (1992), à partir de lait préalablement écrémé.

2.1.1.5. Enzymes coagulantes :

Les préparations commerciales de pepsine et de présure bovines sont issues de la firme Texel-Poulenc (France).

2.1.1.6. Caillettes de dromadaires

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

2.1.2. Appareillage

Dans chacun des laboratoires cités plus haut, un certain nombre d'équipement scientifique a été utilisé pour réaliser les différentes expérimentations :

2.1.2.1. Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides de l'Université Kasdi Merbah d'Ouargla.

- balance analytique (0,01g) et de précision (0,1 mg) ;
- centrifugeuses (6000 x g, Hettich, Allemagne et 12 000 x g, Sigma, France) ;
- four à moufle (Heraeus, Allemagne) ;
- ionomètre SA 720 (Hanna, Allemagne) avec électrode spécifique aux fluorures;
- lyophilisateur à plateau (Christ α 1-2 LD, Allemagne) ;
- spectrophotomètre à flamme type 410, Corning (Japan);
- spectrophotomètre à absorption atomique type Varian (France), spectra 10 utilisé en flamme air-acétylène ;
- spectrophotomètre UV-visible (Unicam, Allemagne) ;
- matériel utilisé pour les analyses microbiologiques : microscope optique (Zeiss, Allemagne), doté d'un appareil photo et connecté à un microordinateur, loupe binoculaire (Zeiss) ; autoclave (Sanoclav, France), étuve compteur de colonies...etc.

A cette liste, s'ajoute le petit équipement courant de laboratoire : pH mètre, bain-Marie ; agitateurs (magnétique et basculant) ; dessiccateur, lactodensimètre ; pompe péristaltique ...etc.

2.1.2.2. Laboratoire des sciences alimentaires d'Al Ain (Emirats arabes Unis)

- analyseur de texture (TA-XT PLUS, USA) avec le logiciel d'opération ;
- microscope électronique.

2.1.2.3. Laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université M. Mammeri de Tizi-Ouzou

- unité de chromatographie en basse pression (Buchi, Switzerland) ;
- unité d'électrophorèse sur mini- cuves verticales (Hoeffer SE 260, USA) comprenant : couleur de gel, cuves d'électrophorèse ; générateur de courant (max 250V, 100mA) ; plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10×12cm) ; espaceurs de 1mm d'épaisseur.

Un certain nombre d'accessoires et petit matériel spécifique est utilisé dans le cadre de cette étude : micropipettes, micro-seringues Hamilton, membranes de dialyse (seuil d'exclusion de 8000 Da), gants et masques pour manipulation de produits dangereux, laine de verre et différents types de verrerie (bêchers, fioles jaugées, pipettes graduées, tubes à essais, burette...).

2.1.3. Produits chimiques et réactifs

- produits et solvants usuels (acide acétique, acide chlorhydrique, acide trichloracétique, acide lactique, éthanol, glycérol, méthanol...);
- colorants et réactifs spécifiques (bleu de méthylène, phénolphthaléine, réactif de Folin-Ciocalteu);
- sels et tampons (chlorure de sodium, sulfates d'aluminium, sulfate de cuivre, tartrate de sodium et potassium, sulfate di-sodium);
- supports chromatographiques (diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE cellulose DE 52));
- produits biologiques : tyrosine, Albumine Sérique Bovine (BSA), enzymes (pepsine et présure);
- milieux de culture pour la microbiologie.

2.2. Méthodes de travail

2.2.1. Collecte du lait

Le lait est traité à partir de chèvres en bon état de santé. Il est recueilli proprement dans des flacons en verre de 100 ml et est acheminé au laboratoire dans une glacière contenant un bloc réfrigérant. Ces échantillons sont ensuite congelés à -18 °C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

2.2.2. Analyses physico-chimiques

2.2.2.1. L'évaluation des principales caractéristiques :

Afin d'avoir une idée sur la qualité des laits collectés, plusieurs paramètres physico-chimiques sont évalués :

- la mesure du pH est effectuée à la même température (de + 20°C). La valeur est lue directement sur le pH mètre après immersion de son électrode dans l'échantillon à analyser. Les mesures sont précédées d'une étape d'étalonnage qui consiste en un ajustement du cadre de lecture du pH à l'aide d'une solution de pH connue (solution de pH étalon);
- la matière sèche totale qui est le produit résultant de la dessiccation du lait, est obtenue par évaporation de l'eau à l'étuve réglée à 103 ± 2 °C pendant 3 heures, (ANONYME 4, 1980). Le résultat est exprimé en g/l;
- les cendres sont déterminées par incinération des matières sèches pendant 4h à 550°C (ANONYME 5, 1993). Le résultat est exprimé en g/l;

- la densité du lait est déterminée à l'aide d'un lactodensimètre graduée, dans une éprouvette de 250 ml remplie de l'échantillon à analyser, la lecture donne directement la valeur de la densité (ANONYME 6, 1986) ;

- la mesure de l'acidité titrable du lait est réalisée selon la méthode normalisée (ANONYME 4, 1980). Celle-ci consiste en la mesure du volume de la solution de NaOH (0.1N) nécessaire à la titration de l'acidité du lait, en présence de phénophtaléine comme indicateur. La valeur de l'acidité du lait est obtenue par la formule suivante :

$$A=10(V/V') \text{ (g/l)}$$

A : quantité d'acide lactique en (g/l)

V : volume de la solution de NaOH utilisé (ml)

V' : volume de l'échantillon (ml)

Pour obtenir l'acidité titrable en degrés DORNIC (°D), la valeur de A est multipliée par 10.

2.2.2.2. Evaluation spécifique des nutriments

2.2.2.2.1 Dosage des protéines

La teneur en protéine totales a été déterminée par la méthode de Lowry. Son principe repose sur le développement d'une coloration bleue foncée suite à l'addition à la solution protéique d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungstomolybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine. Les espèces réduites absorbent la lumière à 750nm. Le dosage des protéines s'effectue à cette longueur d'onde en utilisant un spectrophotomètre visible. La concentration en protéines de l'échantillon analysé est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en employant de l'albumine sérique bovine (BSA) (GUILLOU *et al*, 1986).

La séparation des protéines sérique et caséines s'effectue selon les étapes récapitulées sur la figure 5.

2.2.2.2.2 Matière grasse

Les teneurs en matières grasses du lait sont déterminées par la méthode acidobutyrométrique de Gerber. Cette méthode repose sur la lecture directe sur un butyromètre de la quantité de matière grasse contenue dans 11 ml d'échantillon après dissolution des protéines par de l'acide sulfurique ($d = 1,820$) et séparation de la matière grasse par centrifugation en présence d'alcool amylique. La lecture directe des graduations du butyromètre détermine la quantité de matière grasse en g/l.

2.2.2.2.3. Lactose

Le lactose est dosé selon la méthode de Bertrand (ANONYME 5, 1993). C'est une méthode titrimétrique basée sur la réaction à chaud d'une solution de liqueur de Fehling qui renferme des ions Cu^{2+} (cuivre II), de couleur bleu en milieu basique. A chaud en présence d'une substance réductrice, la liqueur de Fehling donne un précipité rouge d'oxyde de cuivre Cu_2O (cuivre I). Le dosage est réalisé sur le filtrat, après défécation au ferrocyanure de zinc.

Pour l'étalonnage de la liqueur de Fehling nous avons eu à utiliser une solution de lactose de concentration connue.

2.2.2.2.4. Vitamine C

Le dosage de la vitamine C s'est fait par titrimétrie à l'aide d'une solution d'iode à 0,1 N (MULTON, 1991) en présence d'empois d'amidon dont une molécule d'iode réagit avec une molécule de vitamine C selon la réaction (mode opératoire donné en annexe) :



Cette méthode a été choisie pour sa simplicité, sa rapidité et sa fiabilité. Toutefois, avant le dosage, une défécation est indispensable à l'aide de l'acétate basique de plomb (10%) pour éliminer les macromolécules. Lorsqu'il n'y a plus de vitamine C, les molécules d'iode vont s'accumuler dans la solution. Cette accumulation indique la fin du titrage et est mise en évidence par la formation de l'amidon (composé bleu de grande intensité).

2.2.2.2.5. Etude de la composition minérale

La quantification des éléments minéraux présents dans le lait est réalisée par différentes techniques :

- le dosage du fer, zinc, cuivre et du plomb est effectué à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique équipé d'une lampe à cathode creuse spécifique pour chaque élément.

Les résultats sont exprimés soit en partie par billion (ppb) (ou en $\mu\text{g/l}$;

- le dosage du sodium et du potassium par spectrométrie d'absorption à flamme ;

- le dosage du calcium et du magnésium par complexométrie ;

- le dosage du fluor par Ionométrie en utilisant une électrode spécifique (RODIER, 1984).

2.2.3. Etude de la qualité microbiologique

A l'image des pays en développements qui ont des productions à valoriser et à fructifier, notre pays, particulièrement la région de Mزاب, a développé ces quelques dernières années l'implantation de centres de collectes pour recueillir et transformer le lait camelin. Cette nouvelle orientation forte intéressante nécessite néanmoins une connaissance scientifique appropriée. Dans ce cadre et afin d'évaluer la qualité microbiologique de notre production et

voir comment ce lait va évoluer selon les conditions d'entreposage, en intégrant un refroidissement précoce de dernier, nous avons conduit des essais au laboratoire susceptibles de répondre à ces préoccupations particulières

2.2.3.1. Test de la réductase

L'appréciation de la qualité microbienne du lait de dromadaire collecté est réalisée par le test de la réductase. Il s'agit de la mesure du temps de décoloration du lait additionné du bleu de méthylène et incubé au bain-marie à 37 °C. La rapidité de cette décoloration est directement proportionnelle au nombre de germes présents (Tableau IX).

Tableau I X: Grille d'appréciation de la qualité microbienne du lait, selon BERRENS et LUQUET (1987).

Durée de décoloration (heures)	Nombre de germes (germes/ ml)	Qualité microbienne du lait
Supérieure à 5 heures	20^5	Bonne
De 2 à 4 heures	20^5 à 20^6	Bonne à passable
Inférieure à 2 heures	20^6 à 10^7	Insuffisante

2.2.3.2. Dénombrement des micro-organismes psychrotrophes

Certains micro-organismes dits psychrotrophes sont non seulement capables de se développer à des températures inférieures à 10°C mais ont leur optimum de croissance dans la plage de température comprise entre 0 et 10°C.

Afin de quantifier cette population, le dénombrement des germes a été réalisé sur gélose nutritive ordinaire (GNO) avec des dilutions classiques. Un ensemencement en surface (incubation à 7°C pendant 10 jours) a été utilisé. Les colonies apparues sont examinées macroscopiquement et microscopiquement.

2.2.3.3. Isolement et identification de *Pseudomonas fluorescens*

Parmi les bactéries GRAM négatives qui constituent la flore psychrotrophe dominante du lait réfrigéré, le genre *Pseudomonas* occupe la première place (LECLERC, 1961 ; BUSSE, 1965 ; BOCKELMAN, 1969). Il a été rapporté de plus que *Pseudomonas fluorescens* est la principale espèce psychrotrophe caséolytique du lait cru. 95 % des souches de cette espèce, étudiées par SAMAGH et CUNNINGHAM (1972), liquéfient la gélatine et produisent une protéolyse sur le lait écrémé, aux basses températures.

Nous avons essayé de voir dans quelle mesure ces tendances, établies sur le lait bovin, pouvaient avoir une ressemblance ou pas sur le lait de dromadaire. Nous avons ainsi ciblé préférentiellement la recherche de cette espèce.

Les milieux de King (milieu King A et milieu King B permettent de différencier entre les différentes espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques, pyocyanine sur King A et pyoverdine sur King B (GUILLAUME, 2004).

L'ensemencement des milieux King A et King B gélosés, coulés en boîtes de Pétri est fait à partir d'une culture de la flore psychrotrophe identifiée sur GNO (après quelques repiquages successifs) par des stries en surface. L'incubation se fait après au moins 24h à 30°C et en aérobiose. Le test au rouge de méthyle (RM), qui présente un intérêt dans l'identification bactérien, est également utilisé (JOFFIN et LEYRAL, 2006).

D'autres tests sont aussi effectués dans cette étude et qui permettent de mieux identifier l'espèce recherchée :

- test de la catalase (GUIRAUD, 2003) ;
- test de l'oxydase (VÉZINA et LACROIX, 2000) ;
- croissance à 4°C et 43°C (GUIRAUD, 2003) ;
- API 20 E qui est une micro-méthode normalisée utilisée pour réaliser le test de GEL (Gélatinase) et ADH (arginine déshydrolase) (VÉZINA et LACROIX, 1998).

2.2.3.4. Influence du temps de réfrigération

Le refroidissement du lait et son maintien prolongé au froid sont à l'origine de modifications d'ordre physico-chimique, biochimique et bactériologique (SMITHWELL, 1995 ; GILLIS et ECK, 1997).

Nous avons essayé de voir dans ces volets, les effets de la température et du temps de réfrigération sur le comportement de la flore psychrotrophe et notamment le genre *Pseudomonas* et voir leur incidence sur les caséines du lait de chamelle. La protéolyse de ces dernières est ainsi suivie dans les différentes conditions de conservation.

2.2.3.5. Evolution de la flore psychrotrophe au cours d'entreposage

Les analyses ont été effectuées sur du lait cru et sur du lait pasteurisé. En effet, certains groupes microbiens produisent des enzymes protéolytiques et lipolytiques actives à basse température mais sont thermorésistantes et se retrouvent dans le lait pasteurisé. Pour cela, nous avons choisi deux températures de conservation, 4 et 7°C. La première (4°C) est la température habituelle de stockage pratiquée par les laiteries et la seconde (7°C) est favorable au développement des psychrotrophes. Les durées de stockage de 24 et 96h ont été choisies.

2.2.4. Extraction des enzymes coagulantes

L'obtention des extraits coagulants gastriques est réalisée selon la méthode décrite par VALLES et FURET (1977) pour le bovin et adapté par nos soins aux extraits issus de caillettes de dromadaires (figure 4).

Des échantillons de caillettes préalablement décongelées, de poids P (en g) chacun, sont macérés à 42 °C dans un volume ($V = 1.25 \times P$) d'une solution d'acide chlorhydrique 0.2 M pendant 60 minutes. Après filtration de chaque mélange, on obtient des extraits enzymatiques brutes. Ces derniers subissent alors une clarification par addition d'1% (V/V) d'une solution de sulfate d'aluminium ($AlSO_4$), 1M et 5 % (V/V) d'une solution de sulfate de sodium (Na_2SO_4), 1M à une température de 42°C. Après une deuxième filtration, nous obtenons un filtrat jaune auquel nous faisons subir une concentration par addition d'une solution saturée de NaCl, additionnée à 1% (V/V) d'une solution de HCl ($d= 1.19$). Après un repos d'une heure suivie d'une centrifugation (2100xg /20 min), nous obtenons un précipité humide que l'on fait dissoudre dans un volume minimal d'eau distillée. Le pH de ces extraits enzymatiques clarifiés est ajusté à 5.5 par une solution de phosphate dissodique, 1M.

Les extraits obtenus ont été dénommés ECD1 (extraits issus des animaux âgés d'un an, ECD3 (extraits issus des animaux âgés de trois ans) et ECD9 (extraits issus des animaux âgés de neufs ans). La conservation de ces ECD est réalisée à 4°C après addition de quelques grains de thymol.

2.2.4.1. Optimisation des conditions d'extraction des enzymes coagulantes

Dans le but de déterminer les conditions optimales d'extraction des enzymes gastriques de dromadaire, nous avons procédé à quelques modifications des conditions expérimentales préconisées par VALLES et FURET (1977) pour le cas des enzymes gastriques bovines. Ces modifications ont touché la phase de macération (concentration en HCl) et la température de macération. Les variations de l'activité coagulante des extraits dans les différentes conditions ainsi que le rendement de l'extraction ont été suivis. Pour cela, les températures de 38, 40, 42 et 43°C ont été choisies tout en fixant la concentration d'HCl à 0.2M.

Pour déterminer l'influence de la concentration d'HCl sur l'activité coagulante des ECD, trois (03) concentrations (0.1, 0.2 et 0.3M) sont utilisées pour la macération tout en maintenant la température à 42°C.

Nous avons obtenu ainsi six (06) échantillons correspondant aux différentes conditions.



Figure 4 : Protocole d'isolement des extraits enzymatiques gastriques préconisées par VALLES et FURET (1977) pour le bovin et adapté par nos soins aux extraits issus de caillettes de dromadaires de différents âges prélevées à l'abattoir central d'Ouargla.

2.2.4.2. Calcul du rendement de l'extraction :

Le rendement de l'extraction dans chaque condition est déterminé selon la relation suivante : $Rt = UP/P$; où **Rt** = rendement, **UP** = unité présure et **P** : poids de la macération.

2.2.4.3. Analyse statistique des résultats

Pour chaque test trois répétitions sont effectuées. La signification des essais a été analysée en utilisant un logiciel SPSS 18.

2.2.4.4. Caractérisation des extraits coagulants gastriques

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

L'activité coagulante s'exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait. Elle est testée sur du lait écrémé par mesure du temps de floculation à 30°C selon la méthode de BERRIDGE (1955). Ce temps correspond à la durée s'écoulant depuis l'addition de l'extrait enzymatique jusqu'à l'apparition de fins flocons sur la paroi interne du tube à essai.

Le procédé consiste à ajouter 1 ml d'extrait coagulant à 10 ml de substrat standard à 30°C puis à noter le temps de coagulation. La préparation du substrat standard consiste à la dissolution du lait de type «low heat» à 10% (P/V) dans une solution de CaCl₂ (0.01M) et ajustement du pH à 6,5 par l'ajout d'une solution de Na OH 0,1N. Cette préparation est suivie d'une agitation magnétique pendant 15 min à température ambiante, puis d'un repos pendant 60 min. Le substrat standard est ensuite reparti dans des tubes à essais, à raison de 10 ml/tube, suivi d'une incubation dans un bain marie à 30°C pendant 15min. L'addition de l'extrait coagulant est réalisée à raison de 1ml/10ml de 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'observation des premiers flocons correspond au temps de coagulation (figure 5).

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 et elle est calculée comme suit : $UP=10 \times V / T_c \times Q$;

avec : **UP** = unité présure

V = volume de substrat standard utilisé (ml) ;

Q = volume d'extrait coagulant (ml) ;

T_c = temps de coagulation (secondes).

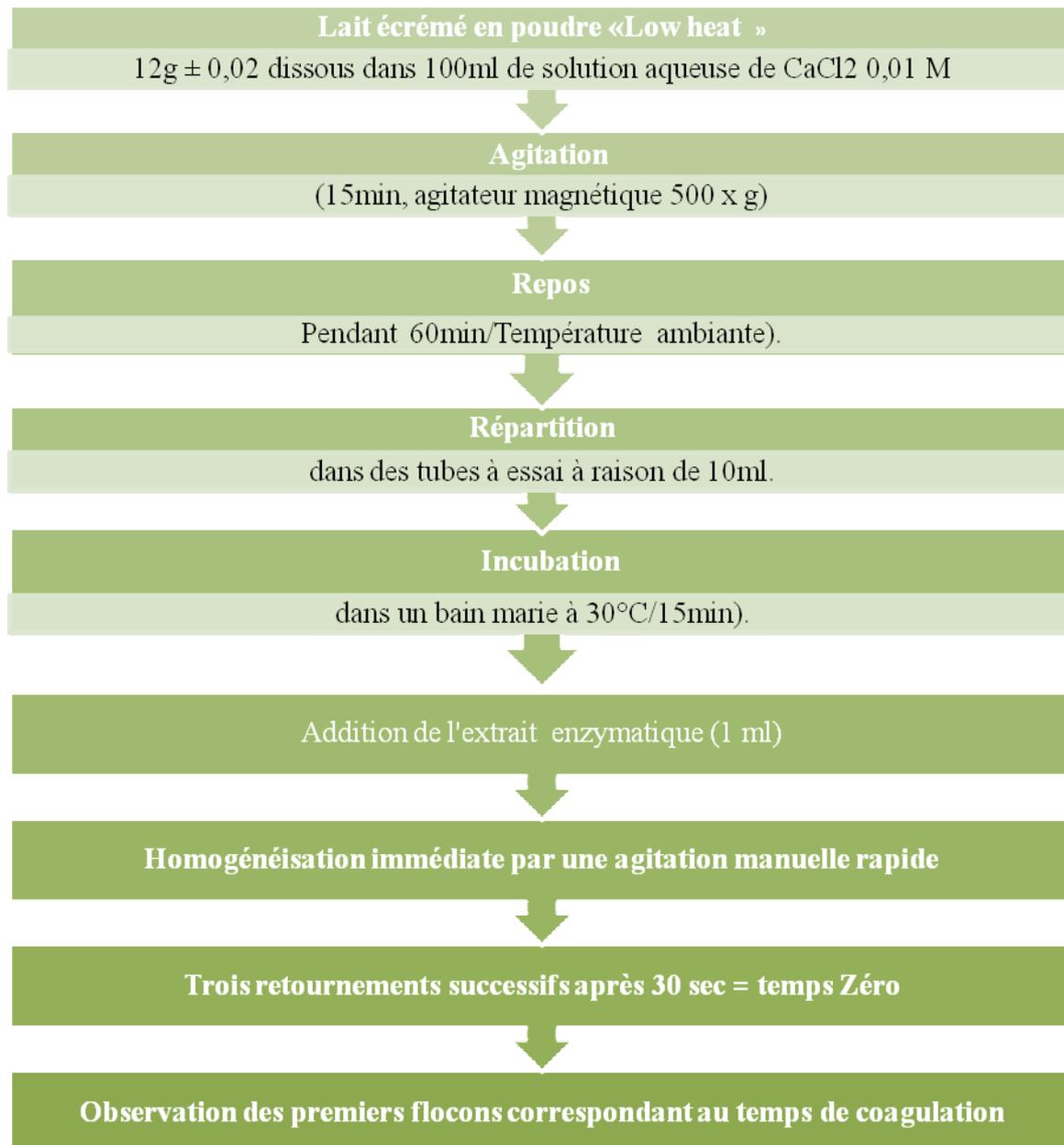


Figure 5: Mesure du temps de floculation par la méthode de Berridge (1945) modifiée par COLLIN *et al* (1977).

L'activité coagulante peut être également exprimée en Force coagulante de Soxhlet. Cette dernière, est liée à l'unité présure par la formule rapportée par BOURDIER et LUQUET (1981) : $F=UP/0,0045$; où **F** = la force coagulante de Soxhlet.

La mesure de l'activité protéolytique des ECD est basée sur l'intensité de la protéolyse des caséines camelines en solution, sous l'action enzymatique de ces extraits (BERGERE et LENOIR, 1997). L'hydrolyse enzymatique des caséines aboutit à la libération des peptides de faibles poids moléculaires, qui sont séparés des caséines non dégradées, par addition d'acide trichloracétique (TCA) à 12% P/V). A cette concentration, le TCA permet la

défécation des protéines et des polypeptides en laissant en solution que les peptides de faibles poids moléculaires.

Après filtration, la mesure de l'absorbance à 280nm permet d'apprécier la richesse en peptides du filtrat obtenu, celle-ci étant proportionnelle à l'activité protéolytique.

Afin d'étalonner le spectrophotomètre, un échantillon est préparé pour servir de témoin. Dans ce dernier, la réaction enzymatique est empêchée par l'ajout de TCA avant l'addition de la préparation coagulante.

2.2.4.4.1. Préparation du substrat caséinique

Ce substrat est obtenu par une solubilisation à 2% (P/V) dans l'eau distillée des caséines camelines lyophilisées. Ces dernières, sont séparées selon la méthode de SCHAMET *et al* (1992), (figure 6) en suivant les étapes suivantes :

- le lait est porté au bain marie à une température de 30 à 35°C. Il est agité légèrement, pour favoriser la remontée de la matière grasse (MG) en surface, puis centrifugé à 3500xg pendant 20min et filtré sur la laine de verre. L'opération est refaite une seconde fois pour l'élimination totale de la matière grasse ;

- les caséines sont précipitées à pH 4.3 comme préconisé par WONGOH *et al* (1998) avec du HCl (4N). Elles sont ensuite séparées des protéines solubles du sérum par centrifugation à 4000xg/30min. Cette opération est répétée deux fois pour éliminer toutes traces de caséines et de protéines de lactosérum, respectivement dans le surnageant et le précipité ;

- les échantillons de protéines totales du lait, de caséines et de lactosérum sont dialysés contre l'eau distillée à 4°C pendant 48 à 72 heures, afin d'éliminer les composés azotés non protéiques (NPN), le lactose et les sels minéraux. Le seuil d'exclusion des membranes utilisées est de 10.000Da ;

- après la dialyse, les échantillons de protéines sont concentrés, congelés et lyophilisés. Ils sont conservés sous cette forme pour des utilisateurs ultérieurs.

2.2.4.4.2. Détermination de l'activité protéolytique des ECD

Pour déterminer l'activité protéolytique des ECD, cinq étapes sont suivies :

- l'ajustement de l'activité coagulante qui consiste à la dilution des ECD brutes avec de l'eau distillée jusqu'à un niveau qui permet d'obtenir un temps de coagulation fixé à 15min (SHAMET *et al*, 1992) ;

- l'hydrolyse enzymatique est réalisée par l'incubation à 35°C pendant 60min d'un volume de substrat caséinique (1ml) additionné d'extrait coagulant dilué (1ml) ;

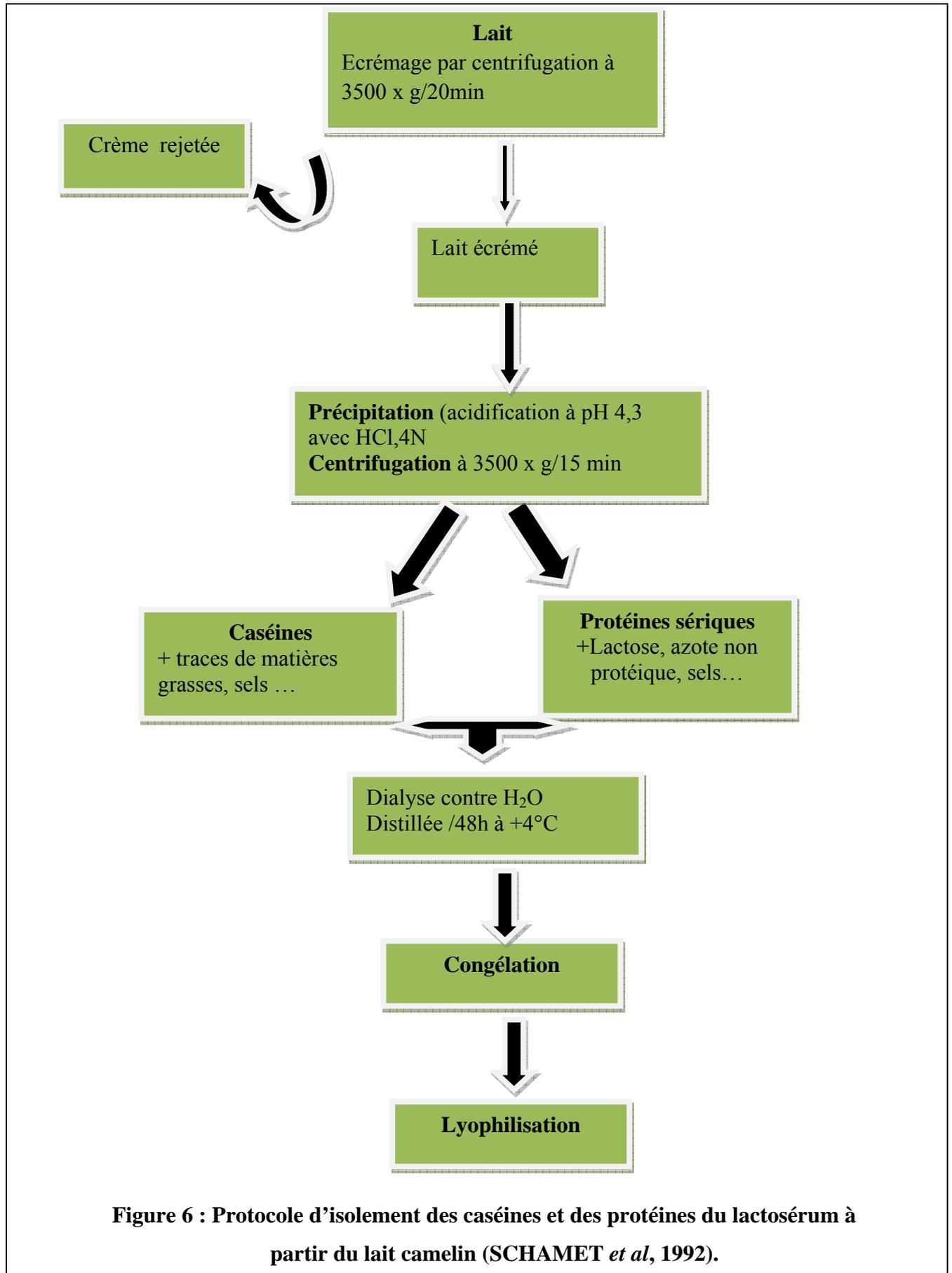


Figure 6 : Protocole d'isolement des caséines et des protéines du lactosérum à partir du lait camelin (SCHAMET *et al*, 1992).

- le blocage de la réaction enzymatique est réalisé au bout de 60min d'incubation par addition de 5ml de TCA à 12% (P/V) ;

- enfin, la mesure de la protéolyse est effectuée sur le mélange filtré après un repos de 15min à la température ambiante.

2.2.4.4.3. Profil électrophorétique des extraits en PAGE-SDS

Le SDS (sodium dodécyl sulfate) de formule $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SO}_3^- \text{Na}^+$ est un détergent anionique qui se fixe aux protéines et leur confère ainsi une même charge globale négative. Si ces dernières sont mises dans ces conditions sous un champ électrique, elles ne pourront se séparer que sur la base de leur taille et leur forme, autrement dit selon leur poids moléculaire (PM).

La séparation est conduite selon la méthode de LAEMMLI et FAVRE (1973), qui se base sur un système biphasique : le gel de concentration superposé sur un gel de séparation où les concentrations d'acrylamide et son co-monomère, le NN', méthylène bis acrylamide, sont définies par les paramètres T et C :

$$T = \frac{a + b}{V} \times 100 \% \qquad C = \frac{b}{a + b} \times 100 \%$$

Où **a** : acrylamide (g) ; **b** : méthylène bis acrylamide (g) ; **V** : volume de la solution (ml)

Nos avons utilisé un gel de concentration (T = 4% et C = 2,7%), en tampon (TRIS - HCl, pH 6,8) et un gel de séparation (T = 17% et un C = 2,7%), en tampon (TRIS - HCl, pH 8,8)

Les échantillons protéiques sont préparés et mis en solution (à raison de 2 mg/ml) en présence de tampon de gel de concentration dilué, de SDS, de 2-ME et d'eau. Ils sont chauffés dans un bain d'eau bouillante pendant 2 à 3 mn avant l'ajout de glycérol et de bleu de bromophénol pour suivre la migration.

A la fin de la migration, les protéines sont fixées par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (P/V) pendant 45 minutes. Le gel est ensuite coloré dans une solution contenant du bleu de Coomassie 0,2% (P/V) dans un mélange (eau/méthanol, TCA ; 1/1/2%) puis décoloré par trempage répétés dans le mélange (eau/méthanol/acide acétique ; 3 / 1,5 / 0,3).

Pour les besoins d'étalonnage du gel, des protéines de MM connues (ovalbumine 45kDa et α -Lactalbumine 14,2 kDa) sont déposées dans un puits et séparées dans les mêmes conditions que les échantillons d'extraits enzymatiques.

2.2.5. Coagulation du lait de chamelle par les ECD

2.2.5.1. Effet de la nature des protéases gastriques sur le temps de floculation

Chez le bovin, les proportions et l'impact des protéases gastriques, particulièrement la chymosine et la pepsine diffèrent sensiblement selon l'âge de l'animal où on passe d'un rapport de (80/20) respectivement pour ces deux protéases chez un jeune bovin non sevré, à un rapport inversé de (20/80) quand l'extrait émane de caillettes de bovin adulte.

Comme la physiologie du dromadaire est particulière sur pas mal de points, nous avons essayé de voir si on avait une différence similaire chez cet animal et surtout déterminer l'extrait possédant l'activité coagulante la plus marquée.

Pour cela, les temps de floculation du lait de dromadaire par les différents extraits coagulants (correspondant aux âges cités) sont mesurés dans différentes conditions de pH et de température. Le lait de vache est utilisé pour les besoins de la comparaison.

2.2.5.2. Optimisation du temps de floculation

L'objectif est d'essayer de faire ressortir les conditions optimales de pH et de température permettant d'avoir le meilleur temps de floculation du lait camelin traité avec par les ECD de différents âges.

Le temps de floculation de chaque ECD est mesuré pour un échantillon de lait camelin cru. 10 ml de lait sont introduits dans un tube à essai avec une concentration déterminée de solution de CaCl_2 (1M) et thermostaté à la température désirée, après addition de 1ml de l'ECD. La concentration de chaque ECD est telle que la floculation du lait, au pH 6,3, a lieu après environ 15 minutes, à une concentration de CaCl_2 de 0,01M et à la température de 30°C.

La variation du pH du lait (5.8 ; 6 ; 6.3 et 6.6) est obtenue par l'utilisation de l'acide lactique (1N). La mesure se fait à différentes valeurs de température (30 ; 37 et 42 °C).

Cette mesure du temps de floculation du lait, traité avec les différents ECD, est réalisée trois fois à différentes valeurs de pH et de température.

2.2.5.3. Recherche du pH optimal

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

Dans le but de rechercher les meilleurs conditions d'activités enzymatiques, nous avons examiné l'effet valeurs suivantes de pH : 5,8 ; 6 ; 6,3 et 6,6 sur l'activité produite.

L'expérimentation est conduite en bloc. Pour cela, trois blocs représentant les trois répétitions sont confectionnés. Il comporte chacun quatre unités expérimentales du lait

dedromadaires dans les mêmes conditions de température et de concentration en CaCl_2 mais se distinguant par la valeur du pH adoptée et la nature (âge) de chaque ECD brute.

2.2.5.4. Recherche de la température optimale

La température du lait de dromadaire est ajustée aux valeurs de 30 ; 37 et 42 °C. Les temps de floculation sont alors mesurés pour chaque température et pour chaque ECD. La moyenne de trois répétitions (non éloignées) permet d'obtenir un temps de floculation pour chaque température et pour chaque préparation coagulant.

L'expérimentation est conduite en dispositif expérimental de type carré latin. Ce choix se justifie par le fait qu'il s'agit de comparer entre trois unités expérimentales répétées trois fois. Ces unités expérimentales renfermant du lait de dromadaire au pH et concentration en CaCl_2 identiques et ne diffèrent entre elles que par la valeur de la température. Le temps de floculation est alors mesuré à chaque valeur de température et pour chaque ECD brute.

2.2.5.5. Recherche de la concentration en CaCl_2 optimale

Afin de déterminer la concentration en CaCl_2 qui permettra d'obtenir le meilleur temps de floculation pour chaque ECD brute, nous avons réalisé des essais en bloc. Pour cela, trois blocs représentant les trois répétitions sont confectionnés. Ils comportent chacun quatre unités expérimentales du lait de dromadaires dans les mêmes conditions de pH et de température mais se distinguent par la valeur de la concentration adoptée et la nature de l'ECD. Les différentes concentrations choisies sont (0 ; 0,01 ; 0,02 et 0,03).

Pour l'ensemble de ces tests, la signification statistique des essais a été réalisée en utilisant un logiciel d'analyse approprié.

2.2.6. Purification des extraits coagulants bruts de dromadaire par chromatographie échangeuse d'ions

Afin de comparer entre les extraits coagulants bruts et ceux obtenus après purifications, nous avons opté pour l'utilisation d'une méthode de séparation chromatographique sur colonne, en utilisant la diéthylaminoéthyl (DEAE), qu'est une résine échangeuse d'anions. Cette technique présente l'avantage d'être non dénaturante et a été utilisée avantageusement sur les extraits enzymatiques similaires d'origine bovine (WANGO, 1993).

Le principe consiste à fixer les protéines par l'intermédiaire de leurs charges négatives, sur les charges positives de la DEAE puis de les décrocher par passage de tampons ayant des concentrations croissantes en chlorure de sodium.

Le gel est coulé sur une colonne (1,0 x 10cm). Il est ensuite équilibré par passage d'environ 10 fois son volume avec du tampon phosphate de sodium pH5, 5. Environ 10 ml d'extrait brut, de pH ajusté à 5,5 (avec du tampon phosphate dissodique 1M) est déposé en haut de la colonne. Le débit d'élution est de 30 ml/h. Des fractions de 4 ml sont collectées par le passage sur la colonne d'un gradient discontinu de concentration croissante (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 1,0 mole/l) en NaCl.

La lecture de la densité optique est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV à 280 nm. Les fractions actives subissent une caractérisation (activités coagulante et protéolytique). Les teneurs protéiques des fractions collectées sont estimées par la méthode de LOWRY *et al* (1951).

2.2.7. Etude du mode de conservation des extraits coagulants

Dans le but de suivre la stabilité des extraits coagulants de dromadaire, trois modes de conservations ont été testés à savoir la réfrigération (à + 4°C), la congélation (à - 20°C) et la lyophilisation. L'évolution des activités coagulante et protéolytique est suivie après chaque mois de conservation. Nous avons choisi de travailler sur les extraits coagulants issus de dromadaires adultes. Pour cela, trois lots d'échantillons sont préparés. Chaque lot, destiné à un mode de conservation est composé de trois échantillons. La moyenne des trois répétitions est prise en considération. (Tableau X).

Tableau X: Désignations des lots expérimentaux pour la conservation des extraits coagulants de dromadaire

N° du lot	N° de l'échantillon	Mode de conservation
Lot 1	E1R ; E2R ; E3R	Réfrigération à 4°C
Lot 2	E4C ; E5C ; E6C	Congélation à -20°C
Lot 3	E7L ; E8L ; E9L	Lyophilisation

2.2.8. Essai de fabrication de fromage frais camelin et bovin par l'utilisation des extraits coagulants de dromadaires.

Le procédé de fabrication utilisé découle d'un protocole établi par RAMET (1993) pour les fromages frais à partir du lait de dromadaire avec quelques modifications des paramètres d'emprésurage tels que le pH et la température.

Le lait qui a servi à la fabrication du fromage est un lait pasteurisé comportant 2% de matière grasse.

Le lait est réparti dans des béchers de 500ml. Après abaissement du pH à une valeur voisine de 5.8 (pH optimal des extraits enzymatiques), on ajoute 5ml de cet extrait dans chaque bécher et on laisse coaguler à une température de 42°C (température optimale de l'extrait coagulant). Dès la séparation de deux phases du lait (lactosérum et caillé) on verse le mélange sur un tissu filtrant pour faciliter l'égouttage. Le dispositif est mis dans le réfrigérateur durant une nuit. Le lactosérum qui s'égoutte est recueilli en totalité. Le poids du lait et du caillé sont notés pour servir au calcul du rendement selon l'équation suivante :

$$\text{Le rendement} = \frac{\text{le poids du caillé}}{\text{Le poids du lait}} \times 100$$

2.2.8.1. Etude de la texture du fromage

La texture peut être évaluée au moyen de techniques instrumentales (rhéologiques) ou sensorielles. Les méthodes rhéologiques dites imitatives permettent de couvrir la quasi-totalité de la définition texturale d'un produit en reproduisant partiellement la mastication humaine. Elles présentent l'avantage d'être corrélées à l'analyse tout en étant plus faciles à mettre en œuvre (LAITHIER *et al.*, 2009).

Dans la présente étude. L'analyse du profil de texture (TPA) avec des options appliquées à l'analyse du fromage (XINHUI et XIAOTING, 2009), est pratiquée pour déterminer les caractéristiques physiques des deux caillés (bovin et camelin). Avant d'entamer ces essais, les caillés sont mis hors du réfrigérateur et conservés à la température ambiante pendant 1 h avant le test. Pour l'échantillonnage, un carottier en acier inoxydable avec un diamètre interne de 23 mm a été utilisé. Chaque échantillon a été coupé à une hauteur de 20 mm et placé sur la plaque de l'analyseur de texture. Une sonde en acrylique de 10 mm de diamètre (P/0.5) a été utilisée. Chaque échantillon a été comprimé axialement à 50% de leur hauteur initiale. La vitesse d'essai, le temps, la distance et la force de déclenchement sont respectivement de 5 mm · s⁻¹, 5,0 s, 10,0 mm et 5,0 g. La dureté, l'adhésivité, la cohésion et l'élasticité ont été les paramètres calculés par l'instrument.

2.2.13.2. Evaluation organoleptique des fromages

L'acceptabilité des échantillons de fromage a été évaluée par un jury de 25 dégustateurs, composé d'étudiants, de techniciens du laboratoire et d'enseignants familiarisés avec les fromages et assez connaisseurs en qualités organoleptiques.

Les attributs de l'évaluation sensorielle : couleur de la pâte, texture, saveur et l'acceptabilité globale, ont été considérés par les membres du jury. Les fromages ont été

aléatoirement codés et servis en une seule fois pour chaque test. Il a été demandé aux membres de jury d'établir une liste de défauts.

Une Fiche de dégustation (figure 7) a été remise à chaque descripteur, où il doit noter l'intensité de perception en cochant la case correspondante. Dans la présente étude, l'évaluation des fromage est basé sur l'acceptabilité globale du dégustateur.

Texture (pate)	-Homogénéité	1	2	3	4	5	6	7	mauvaise	bonne	très bonne
	-Couleur	1	2	3	4	5	6	7	claire	moyenne	foncée
	-Fermeté	1	2	3	4	5	6	7	molle	moyenne	ferme
	-Souplesse	1	2	3	4	5	6	7	Faible	moyenne	bonne
Goût	-Acide	1	2	3	4	5	6	7	plus acide	acide	très acide
	-Amer	1	2	3	4	5	6	7	pas amer	amer	très amer
	-Salé	1	2	3	4	5	6	7	Pas salé	salé	très salé
	-Typique	1	2	3	4	5	6	7	pas typique	typique	très typique
Croute	-Dureté	1	2	3	4	5	6	7	faible	moyenne	forte
	- Couleur	1	2	3	4	5	6	7	Claire	moyenne	foncée

Figure 7 : Fiche de dégustation du fromage.

Chapitre III
Résultats et Discussion

3. Résultats et discussions

3.1. Composition physico-chimique des laits collectés

Les résultats des paramètres physico-chimiques des laits collectés à travers les régions considérées sont donnés dans le Tableau XI. Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes de trois répétitions (avec leurs variations respectives).

Tableau XI : Analyses physico-chimiques des laits de chamelles collectés dans les régions de Ghardaïa, El-Oued et Ouargla. Comparaison avec les valeurs obtenues sur le lait de vaches prélevé à Ouargla.

Origine du lait Paramètres	Lait de chamelle			Lait de vache (Ouargla)
	Ghardaïa	El-oued	Ouargla	
pH (à 25 °C)	6,55 ± 0,01	6,53 ± 0,5	6,52 ± 0,01	6,66 ± 0,05
Acidité titrable (°Dornic)	17, 5 ±0,05	17 ,6 ± 0,05	17,7 ± 0,03	16 ± 0,1
Densité (à 20 °C)	1,028± 0,02	1,028 ± 0,001	1,029 ± 0,05	1,034 ± 0,17
Matière sèche (g/l)	109,2 ± 0,05	108,90 ± 0, 22	109,83 ± 0,37	126 ± 0,20
Cendres (g/l)	9,39 ± 0,11	8,59 ± 0,15	8,76 ± 0,1	9,95 ± 0,13

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ;

La différence non significative entre la composition du lait de chamelle des différentes régions ($p > 0,05$).

3.1.1. pH et acidité

Les valeurs du pH des laits issus des trois régions de collecte sont très proches l'une de l'autre (valeur moyenne égale à 6.53). Ceci peut être dû à l'identité du climat et de la végétation dans ces milieux.

Le lait camelin serait légèrement plus acide que les laits humain et bovin qui ont des pH respectifs égaux à 7.01 et 6.6. Ceci peut être dû à une forte concentration en acides gras volatiles (YAGIL, 1985) et à la teneur relativement élevée en vitamine C du lait de dromadaire (SALEY, 1993).

Ces valeurs sont globalement similaires à celles rapportées par d'autres auteurs (ABULEHIA, 1994 ; LARSSON-RAZNIKIEWICZ et MOHAMED, 1994 ; KAMOUN, 1995; ZIA UR-RAHMAN et HAQ, 1998). Alors que d'autres auteurs (SAWAYA *et al*, 1984

; HASSAN *et al*, 1987 ; GORBAN et IZZELDIN, 1997 et ABU-TARBOUSH *et al*, 1998) signalent des tendances plus faibles (autour de 6.4) ou plus élevées (autour de 6.7).

En ce qui concerne l'acidité titrable, elle est de l'ordre de 17°D. Cette valeur se situe dans la fourchette des travaux rapportés sur le lait camelin. Certains avancent une acidité de l'ordre de 14°D (SAWAYA *et al*, 1984 ; MEHAIA, 1993a), alors que d'autres tels que SIBOUKEUR *et al* (2005) rapportent des valeurs supérieures (autour de 18°D).

Ces variations sont dues probablement au stade de lactation et au type d'alimentation car le pH ainsi que le goût du lait peuvent dépendre de la nature des fourrages et de la disponibilité en eau (GORBAN et IZZELDIN, 1997). Par ailleurs, la privation en eau se traduit par une diminution du pH qui peut atteindre une valeur de 6,3 après 7 jours de déshydratation (KOUNIBA, 2002). Cette acidité inhibe la croissance d'espèces bactériennes nuisibles et contribue ainsi à sa conservation. De plus, selon ALAIS et LINDEN, (1997) un faible changement de pH du côté acide a des effets importants sur l'équilibre des minéraux (formes solubles et insolubles) et sur la stabilité de la suspension colloïdale de caséine.

Le lait camelin, caractérisé par un effet tampon plus élevé par rapport au lait bovin (ABUTARBOUSCH, 1996), permet d'expliquer l'absence de relation directe entre le pH et l'acidité titrable.

3.1.2. Densité

La valeur de la densité des échantillons de lait camelin se situe en moyenne à $1,028 \pm 0,02$. Elle est inférieure à celle enregistrée pour le lait de vache ($1,034 \pm 0,17$) et est globalement comparable aux valeurs qui sont comprises dans l'intervalle de 1.0250-1.0380, d'après une compilation de diverses sources : FARAH (1993); DAGET et LHOST (1995); KAMOUN (1995) et LARSSON-RAZNIKIEWICZ et MOHAMED (1994)

La densité dépend directement de la teneur en matière sèche, liée fortement à la fréquence d'abreuvement. Ce qui explique la variabilité des valeurs citées par différents auteurs.

3.1.3. Matière sèche

La teneur moyenne en matière sèche totale des laits collectés est de l'ordre de $109,2 \text{ g/l} \pm 0,05$, inférieure à celle relevée pour le lait de vache ($126 \text{ g/l} \pm 0,2$). Cette teneur est assez similaire aux valeurs rapportées dans d'autres pays par ELAMIN et WILCOX (1992) et ZIA UR-RAHMAN et HAQ (1998). Néanmoins les laits collectés semblent moins riches comparativement aux teneurs plus élevées (entre 121 et 131g/l) signalées par ABULEHIA (1989); DIALLO (1989); KAMOUN (1993) et LARSSON-RAZNIKIEWICZ et MOHAMED (1998).

Selon RAMET (1998), cet écart est plus marqué en saison chaude, lorsque les animaux subissent un stress hydrique qui accroît la teneur en eau du lait. De même, YAGIL et ETZION (1980) ont noté que le passage d'un régime hydraté à un régime pauvre en eau fait chuter très sensiblement le taux de matière sèche totale de 14,3 à 8,8 %. La teneur en matière sèche du lait varie également en fonction du stade de lactation (BENGOUMI *et al*, 1994). Ainsi, le taux diminue durant le mois suivant le vêlage, puis augmente suite à l'accroissement en matière grasse et en azote (ANONYME 4, 1995).

3.1.4. Cendres

Les laits analysés donnent une valeur de l'ordre de 9,39 g/l, qui est comparable à celle trouvée par DAILLO (1989) en Mauritanie (8,83 g/l). La teneur en cendres des laits analysés est néanmoins supérieure à celles rapportées par d'autres auteurs : (6 pour LARSSON-RAZNIKIEWWICZ et MOHAMED, 1994 ; 7,6 pour FAYE *et al*, 1998 ; 7,8 pour ZIA UR-RAHMAN et HAQ, 1998 et enfin 8,1 g/l pour KAMOUN, 1998).

D'après YAGIL (1985), le taux de cendres du lait de chamelle varie dans une large mesure selon l'apport alimentaire. Il est plus faible dans le lait d'animaux déshydratés. Cette variation paraît consécutive aux quantités de lait produites (ELAMIN et WILCOX, 1992) et au stade de lactation (FARAH, 1993).

3.1.5. Teneurs en éléments nutritifs.

Afin de situer la richesse relative du lait de dromadaire collecté, comparativement au lait de référence, nous avons dosé les principaux éléments nutritifs sur les mélanges des différents laits collectés à Ghardaïa, El Oued et Ouargla (Tableau XII).

Tableau XII: Analyse des constituants du lait de chameles issu de mélanges de lait collecté dans les régions de Ghardaïa, El-Oued et Ouargla. Comparaison avec les teneurs du lait de vache prélevé à Ouargla.

Paramètres	Lait de chamelle	Lait de vache
Lactose (g/l)	35.23 ± 0,24	38.13 ± 0,34
Matière grasse (g/l)	30 ± 0,05	35 ± 0,06
Protéines totales (g/l)	33,98 g/l ± 2,64.	34 ± 2,64
Protéines sériques (g/l)	9.21 ± 0,17	7.35± 0,15
Caséines (g/l)	27,77g/l ±2,23	26.65 ±1,95
Vitamine C (mg/l)	45 ± 0.03	18 ± 0.02

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ;

La différence significative entre la composition du lait camelin et celle de lait bovin des différentes régions ($p < 0,05$).

3.1.5.1. Lactose

La teneur moyenne en lactose du lait collecté est égale à 35.23 g/l. Cette teneur est inférieure à celle du lait bovin (38.13 g/l), et beaucoup plus faible par rapport à celle du lait humain (70 g/l). Elle est aussi plus faible que celles rapportés par de nombreux auteurs à savoir GNAN et SHEREHA, (1986) avec 56.1 g/l pour les six premiers mois de lactation, KIHAL *et al.*, (1999) avec (45.1 g/l \pm 3) et MEHAIA *et al.* (1995) (44 g/l). Elle se rapproche de celles rapportées par KARUE (1994), en Arabie Saoudite, pour la race Somali (36.5g/l).

Elle est toutefois supérieure à celles rapportées par GORBAN et IZZELDIN, (1997) avec 25.6 g/l \pm 1.0. La teneur en lactose du lait camelin semble dépendre non seulement de la race mais aussi du stade de lactation et de l'état d'hydratation. Elle est faible pendant les premières heures qui suivent le vêlage et subit une augmentation de 36 % de la teneur initiale, 24 heures après. Une diminution de 37 % de la teneur initiale a été constatée en cas de déshydratation des chamelles (YAGIL et ETZION 1980 b). Ces modifications dans la teneur en lactose sont à l'origine des variations dans la saveur du lait camelin.

3.1.5.2. Matière grasse

La valeur moyenne relevée pour la teneur en matière grasse du lait de chamelle étudié est de 30 g/l \pm 0,05. Elle semble être plus faible que celles des laits bovin (35g/l \pm 0,06) et humain (45). Elle est comparable à celle rapportée pour la race Hamra (28.5 g/l selon MEHAIA *et al.*, 1995). Néanmoins, elle se situe entre des valeurs extrêmes, relevées pour la race Somali (56 g/l selon KARUE, 1994) et pour la race *Wardah* (24.6 g/l selon MEHAIA *et al.*, 1995).

Il est établi qu'en dehors de la race, le rang de la traite influe sur le taux de matière grasse. En effet, la traite du matin donne un lait relativement pauvre en matière grasse par rapport à celui des autres traites (KAMOUN, 1994).

3.1.5.3. Protéines totales

Comme indiqué dans le tableau XII, la teneur moyenne en protéines totales, égale à 33,98 g/l \pm 2,64, se rapproche de celles du lait bovin 34 \pm 2,64. Elle est beaucoup plus élevée par rapport à celle du lait humain (12 g/l).

Les références signalent que le taux protéique peut varier entre 21.5 g/l (GNAN *et al.* (1994) et 46g/l (MOHAMED *et al.* (1989).

YAGIL et ETZION (1980a) signalent que la teneur protéique atteint des valeurs comprises entre 4.6 et 5.7 % en régime hydraté ou entre 2.5 et 3.3 % en régime peu hydraté. Quant à sa composition, elle varie en fonction des stades de lactation. Selon KAMOUN (1994), les deux premiers mois de lactation se caractérisent par une diminution des taux, protéinique et

butyreux du lait camelin. Ces derniers atteignent une valeur minimale coïncidant avec le pic de lactation, puis retrouvent, en fin de lactation, un niveau comparable à celui de départ.

3.1.5.3.1. Protéines sériques

La teneur en protéines sériques des échantillons analysés est égale 9.21 ± 0.17 , ce qui représente 21 % des protéines totales. Ce taux semble être légèrement supérieure à celui des laits bovin (7.35 ± 0.15) et humain (7 g/l). Des teneurs proches sont évoquées par certains auteurs (9g/l selon ABU-LEHIA, 1987 ; 10g/l selon BAYOUMI, 1990 et 8.59 g/l, selon KIHAL *et al*, 1999). FARAH (1993) donne par contre des valeurs inférieures (7g/l). Une teneur plus élevée est rapportée par ABU-LEHIA, (1994) pour la race *Majaheem* ($11.2 \text{ g/l} \pm 0.6$).

3.1.5.3.2. Caséines

La teneur moyenne en caséines des échantillons de lait analysés est égale à $27.77 \text{ g/l} \pm 1.28$, soit 79% des protéines totales. Elle se rapproche de celle des caséines bovines (26.65g/l) et reste en revanche nettement supérieure à celle du lait de femme qui est égale à 5g/l (soit 42 % des protéines totales).

La teneur en caséines camelines enregistrée dans cette étude est similaire à celle enregistrée par KAMOUN, (1994), avec $28.8 \text{ g/l} \pm 3.5$. Par contre, elle semble être légèrement inférieure à celle rapportée par KIHAL *et al*, (1999) sur une étude réalisée en Algérie avec 24.53 g/l (soit 74.1% des protéines totales). D'un autre coté, ABULEHIA, (1987) signale des taux de caséines plus faibles (entre 19 et 23 g/l).

La différence entre les teneurs en caséines rapportées par ces auteurs revient probablement à la saison de la récolte de lait où les teneurs les plus faibles sont enregistrées en période estivale (KAMOUN, 1998).

3.1.5.4. Vitamine C

La teneur en vitamine C des échantillons analysés est égale à $45 \text{ mg/l} \pm 0.03$ bien supérieure à celle rapportée par Farah *et al* (1992) (37.4 mg/l) et MEHAIA (1994b) (24.9 mg/l).

Malgré cette variabilité, il demeure entendu que la teneur en vitamine C du lait camelin est très largement au delà du seuil relevé dans le lait bovin (qui se situe autour de 20 mg/l). Cette caractéristique rehausse davantage l'intérêt nutritionnel du lait de dromadaire d'autant que dans les régions arides ou semi arides l'apport alimentaire e, fruits et légumes est réduit.

3.1.6. Composition minérale

La détermination du détail de la composition minérale est un choix volontaire au regard des implications que ces oligoéléments sont susceptibles d'avoir sur l'activité enzymatique recherchée des enzymes coagulantes. Les résultats sont consignés dans le tableau XIII.

Tableau XIII. Composition minérale du lait de dromadaire collecté à Ouargla, El Oued et Ghardaïa ; comparaison avec les teneurs du lait de vache.

Macroéléments (mg/l)	Lait de chamelle (et origine de prélèvement)			Lait de vache
	Ouargla	El-Oued	Ghardaïa	Ouargla
Ca	1229 ± 0,5	1229,5 ± 0,25	1225,85 ± 0,13	1000-1500
Mg	107,88 ±	107,18 ± 0,41	111,31± 0,45	120 ± 0,76
Cl	1690± 0,5	1450 ± 0,5	1530 ± 0,5	1190 ± 0,5
Na	893,28 ±3,05	817,23 ± 0,51	821,74 ± 1,21	460 ± 022
K	1561,98 ±1,26	1497,67± 1,27	1561,27 ± 1,05	1450 ± 045
Oligo éléments (mg/l)				
Fe	2,39±0,005	2,32±0,005	2,35±0,005	0,4 ± 0,04
Cu	0,49±0,005	0,11±0,01	0,22±0,02	0,03 ± 0,07
Zn	3,53±0,25	3,66±0,11	2,90±0,01	3.70 ± 0,05
F	0,37±0,01	0,42±0,005	0,36±0,01	0.15 ± 0,06
Pb	1,09±0,01	1,07±0,05	0.99±0,03	0,002 ±0,03

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ;

La différence non significative entre la composition du lait de chamelle des différentes régions ($p>0,05$).

Il apparaît que globalement, les teneurs en éléments chimiques des laits des trois régions sont très rapprochées. Cela est du probablement à la ressemblance du parcours traversé par le dromadaire.

Les valeurs relatives aux macroéléments sont néanmoins assez élevées. Elles sont situées dans les limites de celles signalées dans la littérature, notamment pour le sodium, le chlore et le potassium (YAGIL et ETZION, 1980 ; SAWAYA et al, 1989 ; BENGLOUMI et al, 1994 et MIETTON et al, 1994). Ces élévations s'expliquent par la salinité considérable des sols et des eaux de boisson de la région qui est caractérisée par la présence des sebkhas et des chotts dans lesquelles les plantes dominantes sont les halophytes. D'après LASNAMI, (1986), le sel joue un grand rôle dans l'alimentation du dromadaire, il exerce sur lui un véritable tropisme. Ces éléments minéraux sont indispensables par leurs rôles physiologiques :

- le potassium est un élément dont la teneur est très importante dans le lait et son augmentation dans l'alimentation des animaux augmente le rendement laitier (RASHED, 1994) ;

- le lait demeure la source principale de calcium alimentaire. Cet élément, sous sa forme soluble et ionique, est absorbé plus efficacement par l'organisme (AMIOR *et al*, 2001). Il est essentiel à la coagulation du sang (JEAN-BLAIN, 2002). Le coefficient d'utilisation digestive du calcium chez le dromadaire est de l'ordre de 40% ce qui correspond à des valeurs plus élevée que chez les bovins. Chez les femelles allaitantes, l'assimilation est augmentée et ne paraît pas perturbée par l'état de déshydratation ;

- selon BENGOUMI *et al*, (1994), les variations des teneurs du lait en magnésium, qui joue le rôle d'activateur de plusieurs enzymes, sont essentiellement liées à l'apport alimentaire en cet élément. Comme le calcium, une grande partie de magnésium se trouve sous forme liée au sein de la micelle de la caséine.

Les analyses statistiques ont montré que les concentrations en macroéléments contenus dans les laits issus des régions de prélèvement présentent une différence non significative, excepté pour le potassium.

Par ailleurs la recherche des oligo-éléments dans les laits collectés a permis de mettre en évidence dans bien des cas des écarts entre les valeurs obtenues et celles signalées par différents auteurs.

Pour le fer, la concentration obtenue (2.39 mg/l) se situe dans la fourchette rapportée par la littérature (BENGOUMI *et al*, 1994) avec 3.41mg/l et (GORBAN et IZZELDIN,1997) avec 2.00 mg/l. Le lait bovin présente une teneur nettement plus faible (0,4mg/l). Dans le lait, le fer se trouve partiellement sous forme organique (lié avec la caséine) et une partie sous forme inorganique (ions libres). Selon JEAN-BLAIN, (2001), les teneurs en oligo-éléments et en fer varient de façon plus aléatoire en fonction de l'alimentation de la femelle.

Le taux de cuivre obtenu est de l'ordre de 0,46 mg/l. Cette teneur est supérieure à celle rapportées par BENGOUMI *et al* (1994) avec 0,11 mg/l. Cependant, elle est plus faible que celles trouvées par SAWAYA *et al* (1984) avec 1,63 mg/l et Mehaia *et al* (1995) avec 1,42 mg/l.

La concentration du cuivre dans le lait est directement liée à la teneur en cuivre dans l'alimentation du dromadaire, qui dépend à son tour de la teneur en cuivre assimilable par les plantes. Selon N'POUNA (1982), les sols salés et Sahariens ne sont pas favorables pour l'assimilation de cuivre par les plantes. Ce qui peut être une des raisons de la faible

concentration en cuivre dans les laits collectés mais qui reste toutefois supérieure à celle du lait bovin (0,03mg/l).

La teneur en zinc des laits analysés est de l'ordre de $3,53 \pm 0,25$ mg/l. Ce résultat est supérieur à ceux de BENGOUNI et *al* (1994) avec 2.87 mg/l et GORBAN et IZZELDIN (1997) avec 2.00 mg/l. Par contre, SAWAYA et *al* (1984) obtient des teneurs plus élevées estimées à 4,47mg/l. Pour cet élément minéral, le lait bovin (avec 3,70mg/l) et camelin ont des teneurs relativement similaires.

Concernant les teneurs en fluor et en plomb, estimées respectivement à 0.37 et 1,09 mg/l, elles ne sont pas plus élevées que celles rapportées par différents auteurs (ELAMIN et WILCOX, 1992 et ANONYME 5, 1995).

3.2. Qualité hygiénique et évolution des microorganismes au cours de l'entreposage réfrigéré

Outre la mesure du pH et de l'acidité titrable, la fraîcheur du lait collecté a été évaluée par l'estimation de sa charge en micro-organismes mésophiles.

L'activité métabolique des bactéries présentes dans le lait s'apprécie par la modification du potentiel d'oxydo-réduction dû au pouvoir réducteur de certaines espèces microbiennes (PETRANSXIENE et LAPIED, 1981). Ainsi, la rapidité de la décoloration du bleu de méthylène est directement proportionnelle au nombre des germes présents (LARPENT, 1997).

Le test sommaire de la réductase appliqué a montré, pour l'ensemble des échantillons analysés, que la décoloration du bleu de méthylène a lieu à des durées supérieures à 5 heures. Ce lait, qui pourrait avoir de ce fait une charge microbienne comprise entre 2×10^5 et 2×10^6 bactéries / ml (LARPENT, 1977), peut être considéré comme ayant une bonne qualité hygiénique. Notons que les échantillons du lait testé étaient congelés avant d'être analysés.

Selon LARPENT (1997), ce traitement de refroidissement retarde considérablement, la durée de réduction des colorants. FAYE et LOISEAU (2002), estiment toutefois que le refroidissement freine la croissance bactérienne mais n'élimine pas les micro-organismes présents dans le lait. Il favorise toutefois la prédominance de micro-organismes psychrotrophes, peu réducteurs.

3.2.1. Dénombrement des microorganismes psychrotrophes et recherche de *Pseudomonas* dans le lait camelin frais

Nous avons procédé dans cette étude à l'isolement et au dénombrement de la flore psychrotrophe totale et le genre *Pseudomonas* à partir des échantillons de lait cru et du lait pasteurisé soumis à l'entreposage réfrigéré.

Les résultats relatifs aux examens macroscopique et microscopique des colonies apparues sur la gélose nutritive (annexe ...) montrent que la culture apparait sous forme de colonies rondes de petite taille, de couleur blanche et d'un aspect muqueux. Les bactéries sont Gram⁻. Elles sont très nombreuses et douées d'une mobilité flagellaire visible sous microscope optique à grossissement ($\times 100$).

Ces caractères morphologiques et les différents tests biochimiques permettent d'identifier la souche isolée comme étant une souche appartenant à l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (GUIRAUD, 2003). Ce résultat est confirmé par la production de la pyoverdine sur milieu King B (KING *et al*, 1954) (photographie en annexe). Sachant que la production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate de milieu King B (GUILLAUME, 2004).

Le nombre d'UFC/ml relatif à chaque flore est porté sur le tableau XIV

Tableau XIV : Nombre d'UFC /ml de la flore Psychrotrophe totale et de *Pseudomonas fluorescens* présente dans le lait frais.

Type de microorganismes	Nombre d'UFC/ml (N)
Psychrotrophes totaux	$12,1 \times 10^4$
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7×10^4

Le pourcentage des *Pseudomonas* par rapport à la flore Psychrotrophe totale est de 37% (figure 8)

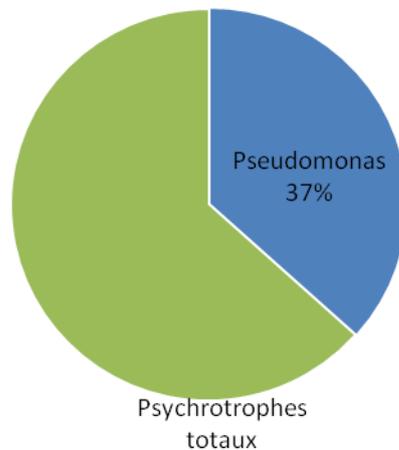


Figure 08: Part des germes *Pseudomonas* par rapport à la flore psychrotrophe totale présente dans le lait camelin frais.

Ce résultat se rapproche de celui de REINHEIMER *et al* (1990) qui déclarent que le genre *Pseudomonas* représente 51% des bactéries psychrotrophes.

La fluorescence de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* est due à la production d'un pigment appelé fluoresceïne (pyoverdine) de couleur jaune à vert. Sa température de croissance optimale se situe entre 25 et 30 °C. Sa croissance à 42 °C est négative : ce point est important pour la différencier de *Pseudomonas aerogenosa* (LERICHE *et al*, 1999).

En se référant aux travaux de Thomas (1978) relatifs à la qualité bactériologique du lait cru, nous pouvons considérer que les conditions d'hygiène lors de la collecte du lait sont satisfaisantes, puisque pour les échantillons prélevés, le nombre total de la flore psychrotrophe, est inférieur à 5.10^4 bactéries/ml. La contamination en ces germes, toujours nettement inférieure au barème préconisé ($N < 1.10^4$ bactéries/ml), permet d'assurer une bonne conservation du lait pendant 48 h à 4° C.

La contamination du lait par les bactéries psychrotrophes est un problème d'hygiène. Ces germes sont largement disséminés dans la nature. Leur présence dans le lait cru est due à des pollutions dont l'importance dépend des conditions de propreté de la traite et du matériel de collecte, de transfert et de conservation du lait, de la qualité des eaux de nettoyage et de rinçage, et du mode d'alimentation de bétail (VERON, 1987).

En plus de ces différentes sources de contamination, la prédominance de genre *Pseudomonas* dans le lait est liée à l'état sanitaire de l'animal et à l'équipement laitier (MILLIERE et VEILLET-PONCET, 1972).

Les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* sont dotées d'une grande activité métabolique (Protéolyse, lipolyse et dégradation des substances carbonées) (THIERRY, 1997). THOMAS et THOMAS, (1973), ont montré que 51 à 97 % des souches psychrotrophes isolées de laits crus sont fortement protéolytiques et SCHULTZE et OLSEN(1970) rapportent que 90 % des cultures de bactéries psychrotrophes isolées de laits ou de produits laitiers sont soit protéolytiques, soit lipolytiques et que 66 % possèdent ces deux activités.

3.2.2. Evolution de la flore psychrotrophe du lait en fonction de la durée de l'entreposage.

3.2.2.1. Entreposage à 4°C.

Le suivi de la flore psychrotrophe et de *Pseudomonas*, effectué sur les laits crus et pasteurisés pendant différentes durées d'entreposage à 4°C a montré qu'il y'a une prolifération considérable de ces germes du premier au quatrième jour.. Les résultats sont illustrés par les histogrammes représentés dans la figure 9. Notons que cette prolifération est plus importante pour les *Pseudomonas*.

En outre, il a été rapporté que la multiplication de ces deux types de microorganismes ne commence que dans les 3 ou 4 heures qui suivent la traite pour se multiplier ensuite par 100 en 48 heures à +4°C (MONSALLIER, 1994). Ces germes sont capables de se développer à des températures $\leq 5^{\circ}\text{C}$ pouvant survivre même après 48 h de conservation (PAGLIA, 1996 ; GLANSDORF, 1999).

Les résultats de notre étude concordent avec ceux obtenus par LOMBARKIA *et al*, (2002) sur le lait de vache qui concluent que la flore psychrotrophe évoluent pendant la durée de l'entreposage et son nombre augmente plus rapidement à 96 h. Toutefois, c'est le genre *Pseudomonas* qui a le plus d'importance du point de vue technologique car il est le plus apte à s'y développer et à y provoquer des altérations par la production des lipases et des protéases thermorésistantes à l'origine de la détérioration des aptitudes à la transformation du lait (PETRANSXIENNE et LAPIED, 1981).

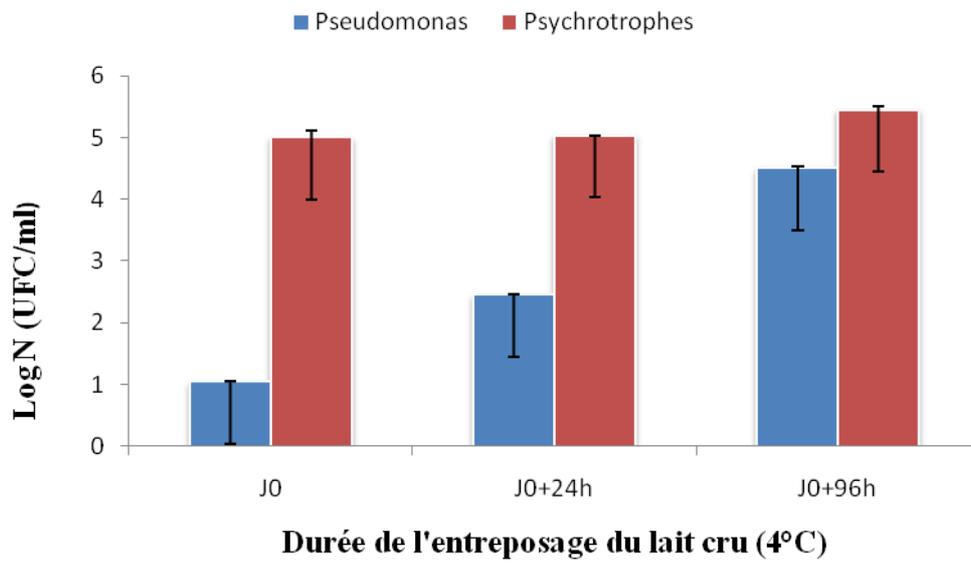
3.2.2.2. Entreposage à 7°C.

Cette étude a révélé que l'évolution du nombre des *Pseudomonas* est plus importante pendant l'entreposage du lait cru à 7°C (figure 10) par rapport aux psychrotrophes dont le nombre reste presque constant.

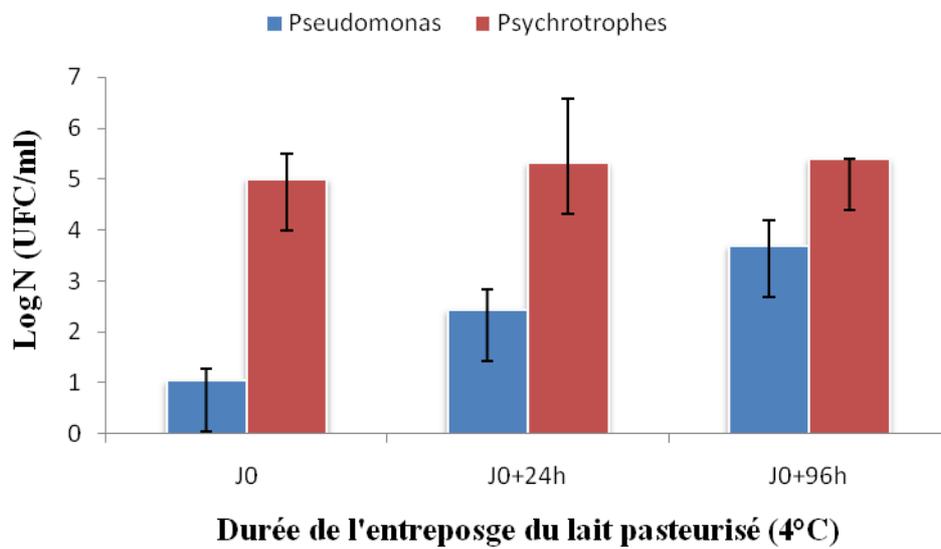
L'augmentation du nombre de *Pseudomonas* dans le lait pasteurisé à j_0+24 et j_0+96 s'explique par le fait que probablement les psychrotrophes vivant dans le lait de chamelle possèdent une résistance thermique car, à l'exception de quelques espèces thermorésistantes, la majorité sont détruits par la pasteurisation à 74°C pendant 15 secondes, voire à la thermisation (65°C pendant 20 secondes).

Les recherches ayant rapport à ces protéinases se sont concentrées sur les souches de *Pseudomonas* qui produisent des enzymes lipolytiques ou protéolytiques. Certaines possèdent les deux caractères. Lorsque leur développement est important, ces enzymes peuvent être responsables de défauts et d'altérations du lait et des produits laitiers, notamment de saveurs désagréables (LEINMÜLLER et CHRISTOPHERSEN, 1982).

Nous n'observons pas, aux températures de 4 et de 7° C, après 24 h de stockage, d'inhibition dans la multiplication cellulaire. Ces micro-organismes se développent relativement rapidement et sont en phase exponentielle de croissance après moins de 24 h à 7°C et après environ 24 h à 4° C.

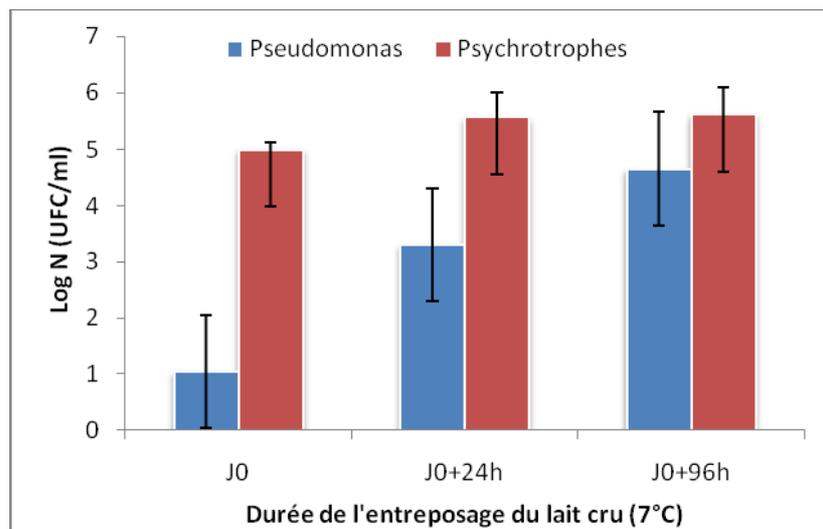


A

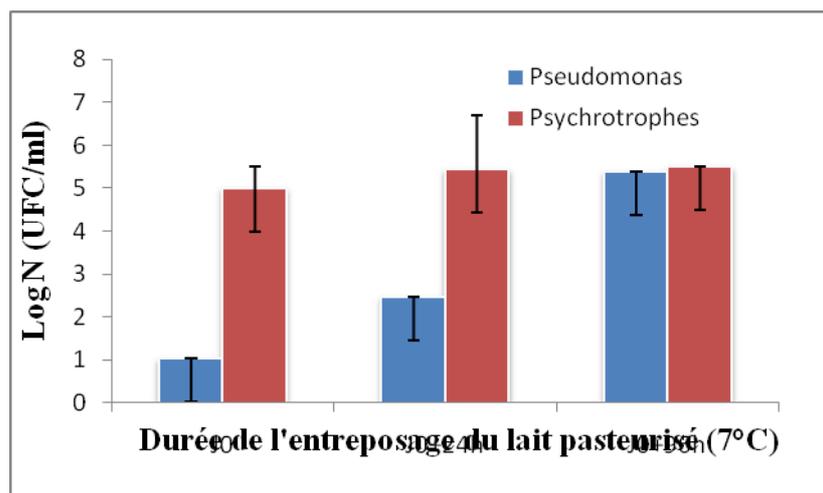


B

Figure 9 : Evolution du nombre de *Pseudomonas* et de psychrotrophes, selon la durée de l'entreposage à 4°C. A : lait cru ; B : lait pasteurisé



A



B

Figure 10: Evolution du nombre des *Pseudomonas* et de psychrotrophes, selon la durée de l'entreposage du lait pasteurisé à 7°C.

A : lait cru ; B : lait pasteurisé

3.3. Etude de la coagulation du lait camelin ; effet des extraits de caillettes de dromadaires

Comme il a été signalé précédemment, le lait camelin est réputé pour sa faible aptitude à la coagulation. Cette caractéristique assignée à sa composition qualitative et quantitative, notamment en caséines, se manifeste par des temps de floculation trop longs et par une faible consistance des gels obtenus.

Parmi les tentatives entreprises par plusieurs chercheurs pour contourner cette difficulté, il y a le choix de l'enzyme coagulante à utiliser. En effet, les extraits enzymatiques issus de caillettes bovines n'ont pas toujours donné de résultats probants, même si des essais ont montré que la pepsine présentait une bonne activité coagulante sur la caséine cameline (WANGOH *et al*, 1993). D'autres auteurs ont préconisé l'utilisation des extraits enzymatiques issus de caillettes de dromadaires.

Afin d'évaluer la portée de ces extraits sur le lait camelin, nous avons jugé opportun de procéder à leur isolement (à partir d'animaux sevrés et non sevrés) avant d'évaluer par la suite leurs activités coagulante et protéolytique.

3.3.1. Obtention des extraits

L'extraction a été menée en utilisant le protocole proposé par VALLES et FURET (1977) et destinée pour l'isolement des extraits bovins. Trois extraits (ECD1, ECD3 et ECD9) issus respectivement d'animaux âgés de 1, 3 et de 9 ans ont été obtenus.

A partir de 100g de caillette, le taux des extraits enzymatiques (ECD1, ECD3 et ECD9), obtenu (précipité humide) varie entre 22 et 26g de macération en milieu acide (HCl à 0,2 M) et à température de 42°C/60min. Le rendement est d'environ 30%.

Les taux moyens des protéines exprimés en (g/l) de ces extraits sont donnés dans le tableau XV.

Tableau XV : Quantité de protéines contenues dans chaque ECD

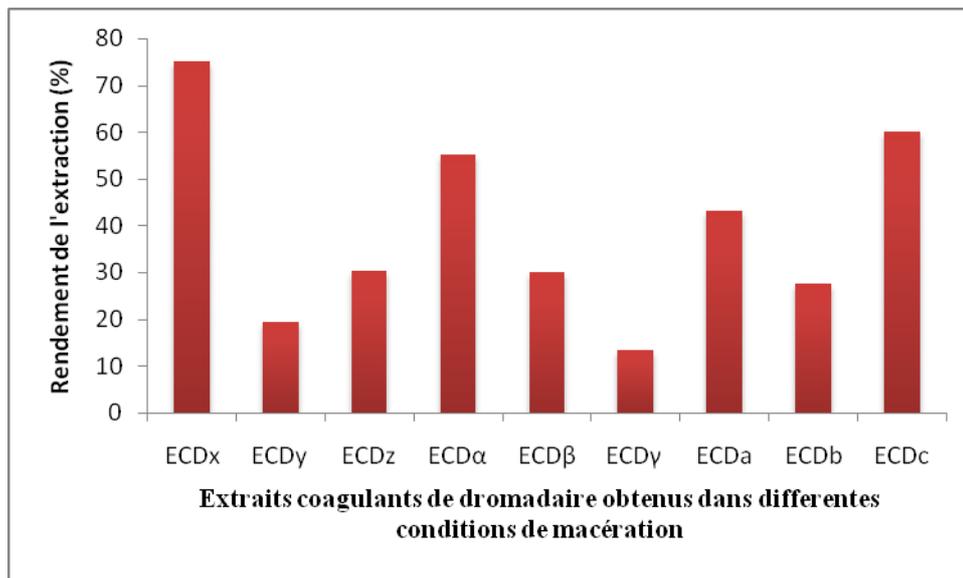
Préparation enzymatique	Taux de protéines (g/l)
ECD1	1,28 ^a ± 0.02
ECD3	1,48 ^b ± 0.02
ECD9	1,54 ^c ± 0.02

La différence de moyenne est significative (p<0,05)

Les analyses statistiques montrent que ces extraits appartiennent à des groupes différents (a,b,c).

Même si les écarts ne sont pas importants entre ces valeurs, il n'en demeure pas moins que les teneurs protéiques des extraits ont tendance à augmenter en fonction de l'âge de l'animal.

Afin d'améliorer ce rendement, en adaptant la méthode de VALLES et FURET (1977) à l'espèce cameline, des modifications ont été apportées en faisant varier les concentrations d'acide chlorhydrique et la température de macération. La figure 11 illustre les résultats obtenue avec les caillettes de dromadaires adultes (9ans).



La différence de moyenne est significative (p=0,02)

Figure 11 : Rendement de l'extraction des neuf (09) extraits coagulants de dromadaire obtenus dans différentes conditions de macération.

ECDx : extrait coagulant obtenu à T =38 °C
 ECDy : extrait coagulant obtenu à T =40 °C
 ECDz : extrait coagulant obtenu à T=43 °C.

} [HCl]= 0.2M

ECDa : extrait coagulant obtenu à T = 38 °C
 ECDb : extrait coagulant obtenu à T = 40 °C
 ECDc : extrait coagulant obtenu à T = 43 °C

} [HCl]= 0.1M.

ECDα : extrait coagulant obtenu à une [HCl]= 0.1M.
 ECDβ : extrait coagulant obtenu à une [HCl]= 0.2M.
 ECDγ : extrait coagulant obtenu à une [HCl]= 0.3M.

} T°=42 °C

3.3.2. Evaluation de l'activité enzymatique des extraits bruts

Les analyses statistiques ont indiqué que le rendement varie avec le changement des conditions et que le meilleur rendement (75%) est obtenu avec l'ECDx (T =38 °C et [HCl]= 0.2M). Ces conditions représentent approximativement le milieu physiologique naturel de l'animal. En revanche, VALLES et FURET (1977) ont obtenu le meilleur rendement (60%) pour le lait bovin à 42°C et [HCl]= 0.2M.

Les extraits bruts sont évalués à travers leurs activités coagulante et protéolytique.

3.3.2.1. Mesure de l'activité coagulante

La mesure de l'activité coagulante (exprimée en UP) des ECD a révélé que c'est celle provenant des extraits issus des caillettes de dromadaires les plus âgés ECD9 (correspondant probablement à la pepsine) qui est la plus élevée (0,360). Elle est suivie de celle de l'ECD3 (0,285) et enfin de celle l'ECD1 (0,235). Notons que pour les extraits de bovin testés, la présure donne une activité légèrement supérieure à celle obtenue avec la pepsine (0,181 contre 0,161) (tableau XVI).

**Tableau XVI: Variation de l'activité coagulante (UP)
en fonction de la nature de l'enzyme**

Préparation enzymatique	Activité Coagulante(UP)	Force de soxlet
ECD9	0,360 ^a ±0.02	80±0.25
ECD3	0,285 ^b ±0.001	63.73±0.26
ECD1	0,235 ^c ±0.0020	51.47±0.1376
pepsine bovine	0,1630 ^e ±0.002	35.56 ±0.11
Présure bovine	0,184 ^d ±0.002	40.7±0.15

La différence de moyenne est significative (p=0,01)

Les enzymes appartiennent chacune à un groupe. La valeur la plus élevée est observé pour l'ECD9. Par ailleurs la pepsine bovine est caractérisée par la plus faible activité coagulante.

3.3.2.2. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique des ECD sur les deux substrats (lait camelin et bovin) est illustrée dans le tableau XVII.

Tableau XVII : L'activité protéolytique des différentes enzymes vis-à-vis des laits camelin et bovin.

	Activité protéolytique (lait camelin)	Activité protéolytique (lait bovin)
ECD1	1,78 ^a A ± 0.020	1,54 ^a B ± 0.020
ECD3	1,18 ^b A ± 0.020	1,44 ^b B ± 0.020
ECD9	0,89^c A ± 0.020	0,84^c B ± 0.015
Ppb	0,73 ^d A ± 0.025	0,94 ^d B ± 0.020
Prb	0,78 ^e A ± 0.026	1,44 ^e B ± 0.015

La différence de moyenne est significative (p=0,01)

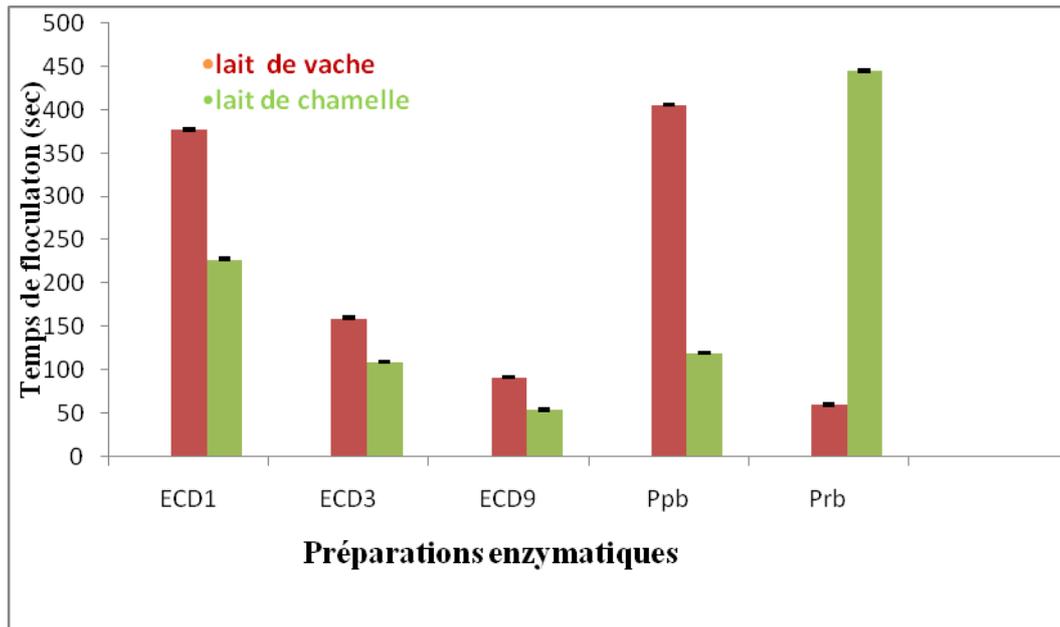
Les analyses statistiques ont révélé qu'il y'a une différence significative entre les différentes enzymes d'une part et entre les deux substrats de l'autre part.

Il est à relever dans ces valeurs que l'ECD9 est caractérisé par une activité protéolytique relativement faible qui se rapproche de celle de la pepsine bovine. Les deux laits réagissent presque d'une manière identique vis-à-vis des ECD. En revanche, la présure bovine est très protéolytique envers le lait bovin.

En industrie fromagère, on recherche toujours à ce que les enzymes coagulantes utilisées aient une activité coagulante élevée et une activité protéolytique faible (RAMET, 1997). L'ECD9 semble par conséquent, le mieux indiqué par rapport aux autres ECD et en comparaison avec la présure bovine commerciale qui est habituellement utilisée dans l'industrie fromagère.

3.3.2.3. Mesure du temps de floculation du lait traité par les extraits bruts

Les mesures effectuées montrent que le temps de floculation (**tf**) mesuré, en fonction de la nature de l'enzyme et de la nature du substrat à une température de 30°C et à pH 6 (figure 12) est inférieur à celui du lait de vache. Ce temps varie selon l'âge de l'animal. Dans les mêmes conditions d'utilisation, le **tf** enregistré pour le lait camelin suite à l'emploi de la pepsine est inférieur à celui du lait bovin. La tendance inverse est enregistrée en utilisant la présure. Ces résultats confirment les suggestions de certains auteurs qui préconisent l'emploi préférentiel de la pepsine pour coaguler le lait de dromadaire (RAMET, 1985 ; SI BOUKEUR *et al.* 2005).



La différence de moyenne est significative ($p=0,03$)

Figure 12: Variation du temps de floculation des laits camelin et bovin en fonction de l'enzyme utilisée (ECD1, ECD3, ECD9,).

ECD1=extrait de dromadaire âgé de 1an ; ECD3= extrait de dromadaire âgé de 3ans ;

ECD9=extrait de dromadaire âgé de 9ans ; Ppb= pepsine bovine ; Prp =présure bovine.

Les résultats de l'étude statistique ont montré que la nature des enzymes utilisées à un effet très significatif sur le temps de floculation ($p < 0,05$). Les enzymes forment chacune un groupe.

Afin d'évaluer l'affinité des préparations enzymatiques pour les deux substrats (lait bovin et camelin), les rapports entre le temps de floculation du lait de vache et celui du lait camelin (t_{fv}/t_{fc}) ont été déterminés. Les résultats obtenus montrent que l'affinité des ECD vis-à-vis du lait camelin est meilleure par rapport au lait bovin (le rapport $t_{fv}/t_{fc} > 1$). Cette affinité augmente avec l'âge de l'animal d'où sont extraites ces enzymes (Figure 13).

Le même suivi est réalisé pour la pepsine bovine dont le rapport (t_{fv}/t_{fc}) est largement supérieur à 1, alors que celui de la présure bovine est inférieur à 1. Ce résultat confirme que les extraits coagulants issus de caillottes de dromadaires possèdent une affinité pour le lait bovin mais cette affinité est plus importante pour le lait camelin, notamment en utilisant les ECD âgés. De plus, les résultats des essais réalisés montrent que l'affinité de la pepsine bovine est meilleure pour le lait de chamelle ce qui concordant avec les conclusions de certains travaux (EL-ABASSY et WAHBA, 1986 ; MEHAIA, 1987 ; WANGOH *et al*,

1993 ; RAMET, 1994). En revanche l'affinité de la présure bovine pour le lait camelin testé est très faible.

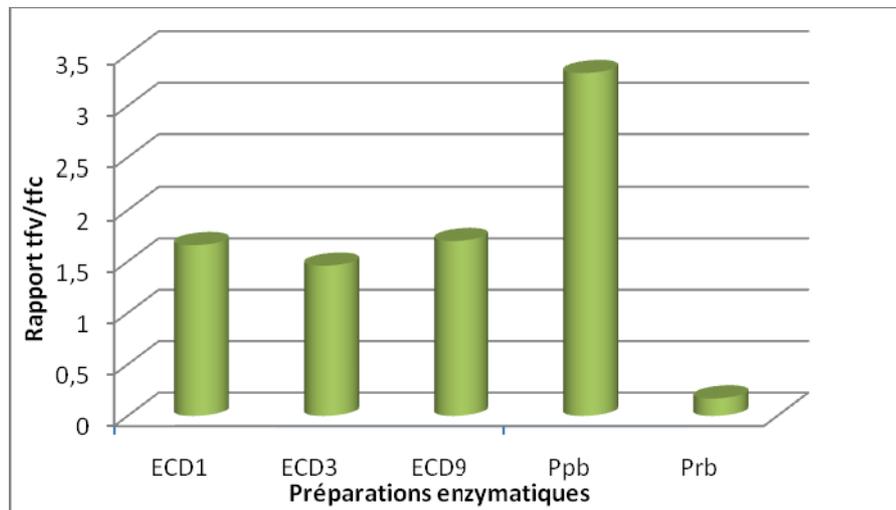


Figure 13 : Rapport tfv /tfc

Tfv=temps de floculation du lait de vache

Tfc=temps de floculation du lait de chamelle

3.3.2.4. Influence du pH de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait camelin traité par les ECD

En se basant sur les résultats des analyses de l'anova, nous pouvons dire que l'effet du pH est très significatif ($p=0.001$). L'évolution du temps de floculation du lait de chamelle, en fonction du pH (figure 14) a montré que le pH optimum de tous les ECD est de 5,8 pour l'ensemble des températures testées. Nous remarquons aussi que l'ECD9 est le moins sensible aux variations du pH par rapport aux ECD 1 et 3, notamment dans la gamme 5.8-6.3. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par CHAZARRA *et al*, (2007).

Le pH de floculation est particulièrement important à prendre en considération au niveau technologique car l'acidification favorise l'activité de l'enzyme (qui est une protéase, ayant une activité optimale généralement située autour du pH 5.5) et au même temps, elle contribue à la déstabilisation des micelles de caséines (RAMET, 1994).

3.3.2.5. Influence du pH de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait bovin traité par les ECD

Pour le lait de vache et dans les mêmes conditions d'utilisation, les résultats des analyses statistiques ont révélé que le temps de floculation le plus court pour l'ECD1 est obtenu vers un pH de 5.8 (comme pour le lait camelin). En revanche, l'optimum de l'ECD3 et de l'ECD9 se situe à 6. L'ECD1 présente un optimum au pH similaire à celui observé pour le lait camelin, alors que l'ECD9 est toujours moins sensible aux variations de pH (Figure 15).

D'après ces résultats, nous remarquons que les laits camelin et bovin réagissent différemment face aux variations du pH, ce qui semble avoir pour origine, la différence dans la composition protéinique des deux laits. En effet, l'influence du pH du lait sur le temps de floculation est sensible et apparente. Le t_f devient plus court lorsque le pH est abaissé au dessous de sa valeur normale dans le lait. De même, selon RAMET (1984), les enzymes coagulantes de fromagerie sont des protéases à caractère acide (pHi proche de 5.5) et que la caséine Kappa présente un maximum de stabilité dans l'intervalle de pH (5-6). Selon NAGERA *et al.*, (2003), le pH optimum d'hydrolyse de la caséine κ par la présure se situe entre 5,1 et 5,3.

Notons que le pH normal du lait de chamelle n'est pas très favorable à l'activité coagulante (RAMET, 1984).

L'effet du pH sur l'activité coagulante est mis à profit en fromagerie. En effet, l'emploi du lait légèrement acidifié, lorsque le type de fromage le permet, est recommandé pour réduire la quantité d'enzyme utilisée (GRENN *et al.*, 1984). L'effet de l'acidification du lait sur les propriétés du gel formé doit être pris en considération.

Cependant, si l'abaissement du pH augmente l'activité coagulante de ces protéases acides, il aura un effet comparable sur leur activité protéolytique au cours de la maturation et de l'affinage du fromage notamment pour certains types de fromage pour lesquels les valeurs du pH sont relativement abaissées au cours de ces étapes de fabrication (GRENN *et al.*, 1984). En outre, l'étude de la stabilité de la pepsine bovine porcine et de la chymosine montre que ces enzymes présentent une bonne stabilité aux valeurs de pH inférieurs à 5,5 (ANDREN *et KONING*, 1982).

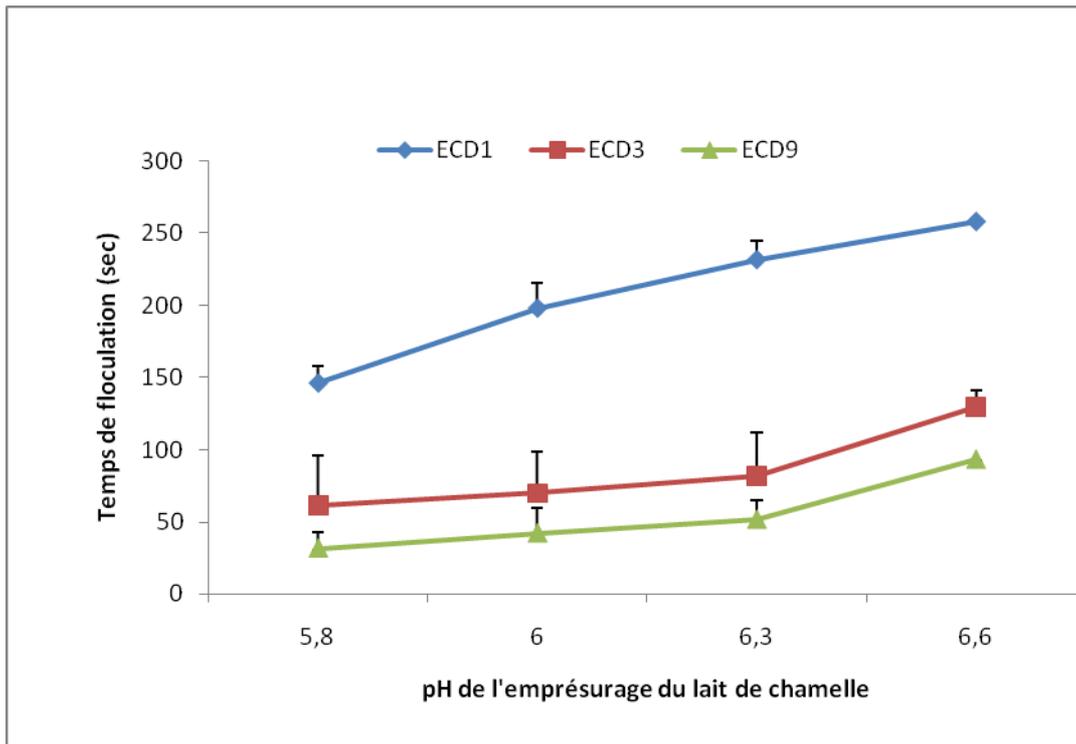


Figure 14 : Variation du temps de floculation du lait camelin par action des ECD en fonction du pH.

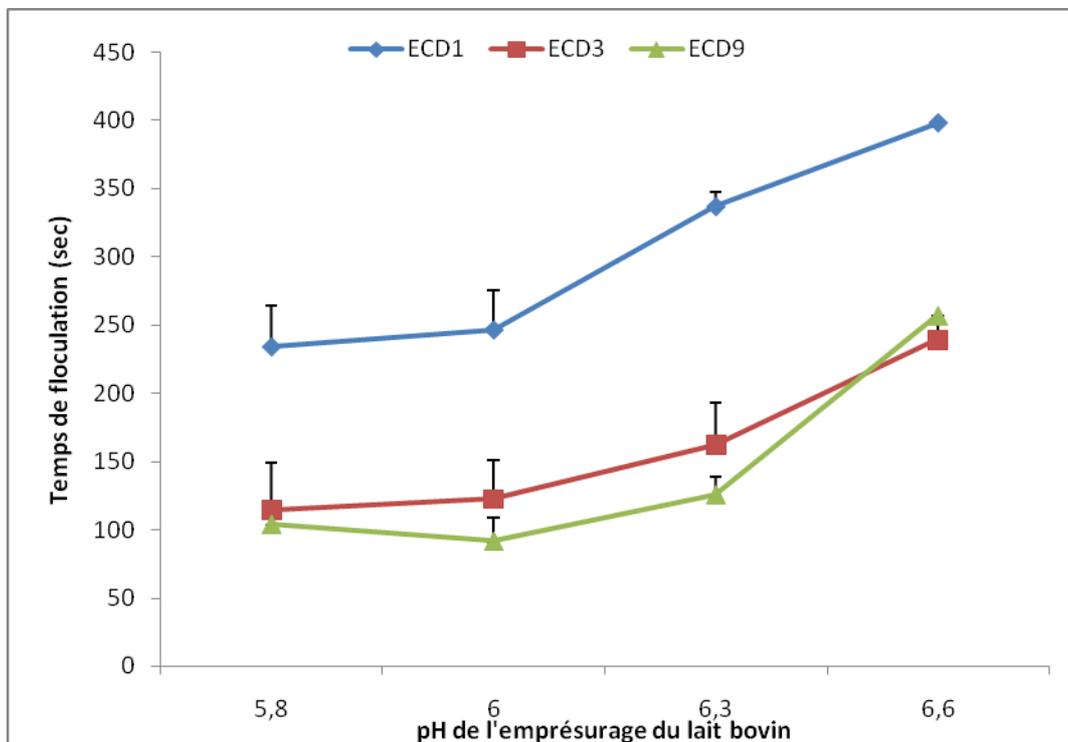


Figure 15: Variation du temps de floculation du lait bovin traité par les ECD en fonction du pH.

3.3.2.6. Influence de la température de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait camelin traité par les ECD

L'élévation de la température (mesurée entre 30 et 42° C), s'accompagne d'une diminution du temps de floculation du lait traité par les ECD. Le temps de floculation le plus court est observé pour l'ECD9 à une température de 42°C qui est optimale pour tous les ECD (Figure 16).

En pratique, la température nécessaire pour l'action des enzymes coagulantes est comprise entre 20-22°C pour les pâtes fraîches et 30-42°C pour les pâtes dures (RAMET, 1997). Au dessus de 40-50°C, il se produit une dénaturation progressive de l'enzyme qui devient complète vers 65°C (RAMET, 1984).

3.3.2.7. Influence de la température de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait de vache traité par les ECD.

Il ressort de la figure 17 que l'activité des ECD varient avec la température et que cette activité est à son optimum vers 37°C et ce quelque soit la nature de l'ECD utilisée. Le temps de floculation le plus court est obtenu avec l'ECD9. Ce dernier présente un optimum d'activité à 42°C pour le lait de chamelle. Cette variation est probablement due à la différence de la composition protéique des deux substrats.

Toutefois, il faut noter que l'effet de la température résulte de la conjugaison de deux effets, l'un sur la réaction enzymatique, l'autre sur la phase secondaire de la coagulation et qui correspond à l'étape d'agrégation. En effet, la coagulation du lait ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures ou égales à 18 °C. Cela est due à l'importance des interactions hydrophobes dans l'agrégation des micelles hydrolysées (BRINKHUIS et PAYENS, 1984 ; LUCEY, 2002).

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

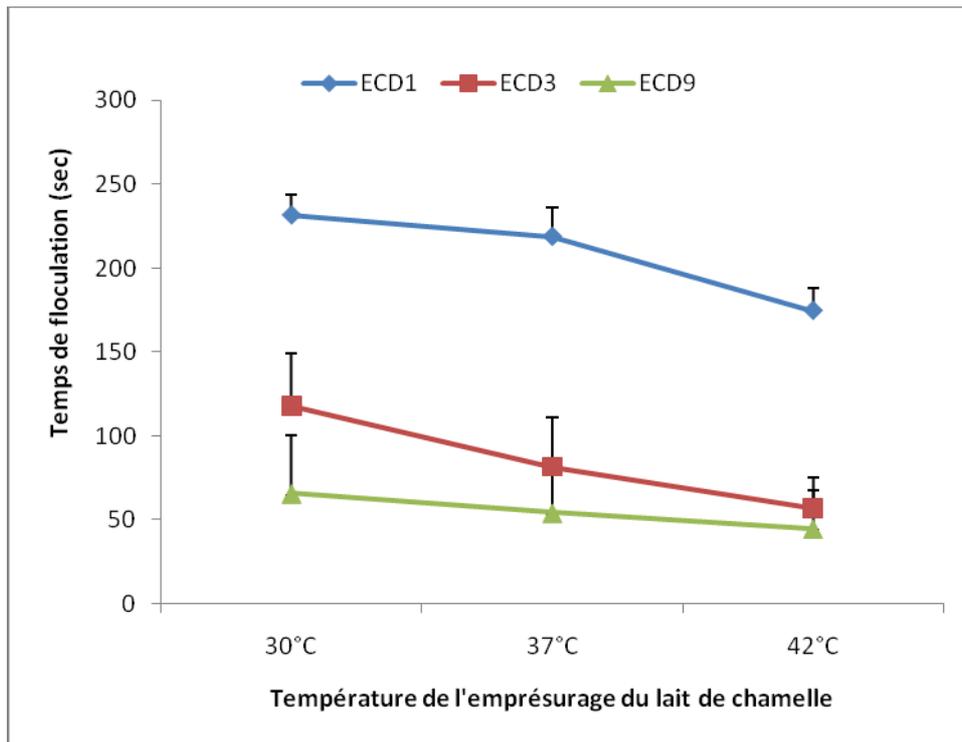


Figure 16 : Variation du temps de floculation du lait de chamelle traités par les ECD en fonction de la température.

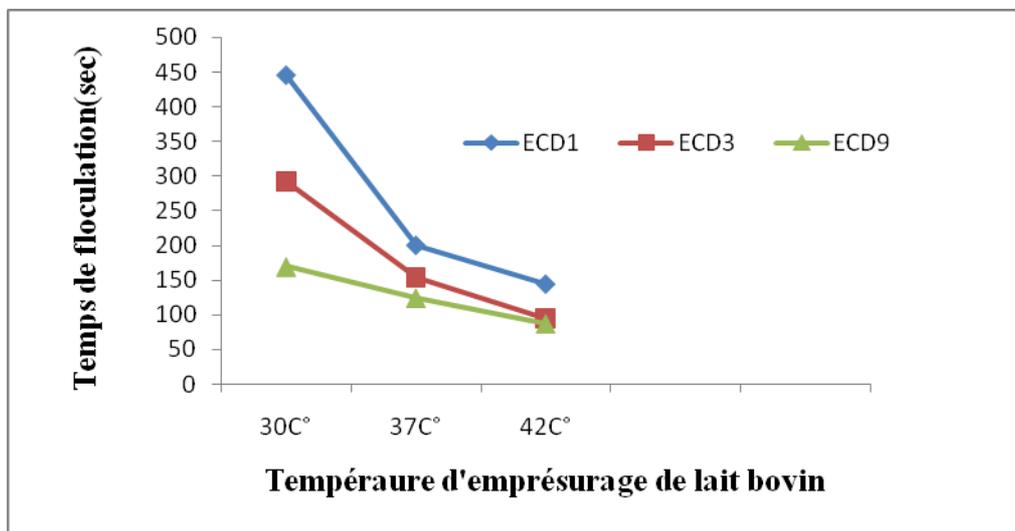


Figure 17: Variation des temps de floculation du lait de vache par les extraits coagulants en fonction de la température.

3.3.2.7. Influence de la concentration en CaCl_2 sur le temps de floculation du lait camelin traité par les ECD bruts.

Les variations du temps de floculation du lait de chamelle enregistrées pour chacun des trois extraits gastriques coagulant de dromadaires (ECD1, ECD2 et ECD3) en fonction de différentes concentrations de CaCl_2 , sont illustrées sur la figure 18.

Il apparait que ce temps, qui est influencé par la variation des concentrations en chlorure de calcium rajouté, est inversement proportionnel à ces dernières. C'est la valeur de 0,03M qui donne un temps le plus court et cela avec les trois ECD. Cependant l'ECD adulte est moins sensible aux variations des concentrations.

3.3.2.8. Influence de la concentration en CaCl_2 sur le temps de floculation du lait bovin traité par les ECD bruts.

La figure 19 montre que cette influence est similaire à celle observée pour le lait de chamelle et les courbes obtenues présentent la même allure.

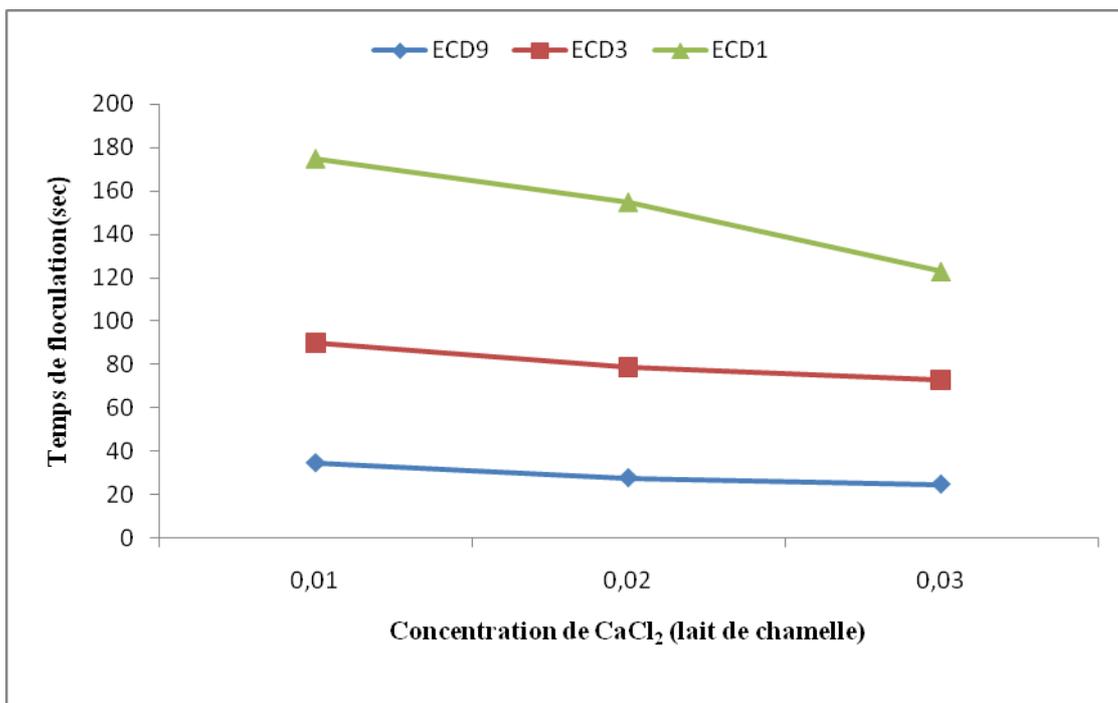


Figure 18: Variation du temps de floculation du lait camelin en fonction des concentrations de CaCl_2

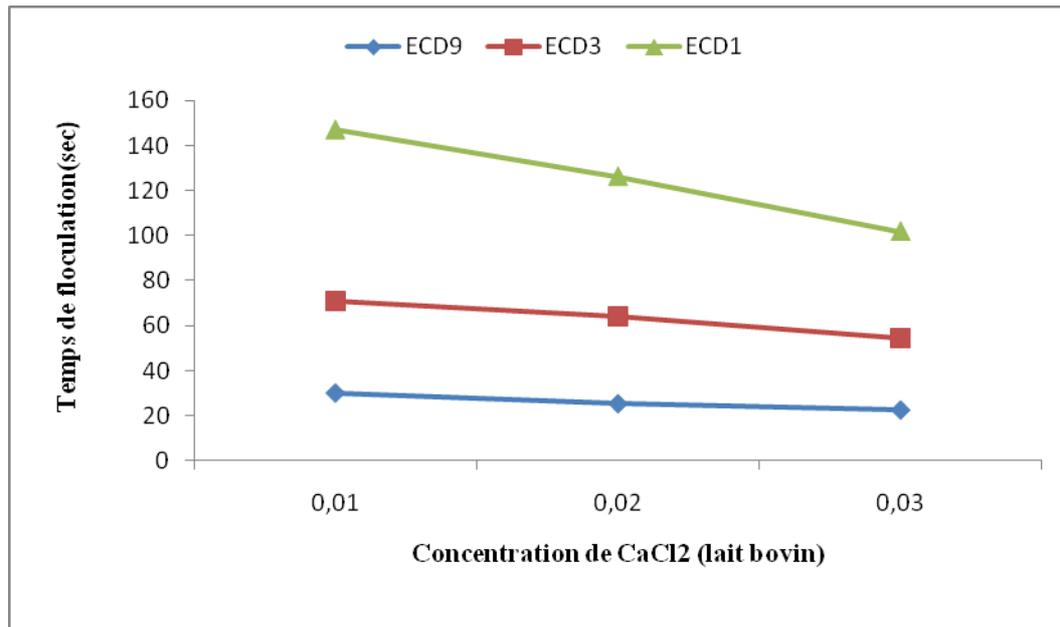


Figure 19 : Variation du temps de floculation du lait bovin en fonction des concentrations de CaCl₂

Il ressort de ces tendances que la concentration optimale de CaCl₂ pour le lait de chamelle et de vache est de 0,03M avec un temps de floculation le plus court enregistré pour le lait de chamelle traité par l'ECD9.

La présence de calcium ionisé est indispensable à l'accomplissement de la phase secondaire de la coagulation qui conduit, après protéolyse spécifique de la caséine Kappa par l'enzyme coagulante, à l'agrégation des micelles pour former un réseau constituant le coagulum (RAMET, 1985 ; RAMET, 1994).

Un lait pauvre en calcium coagule difficilement et conduit à un gel mou qui se tient mal. La teneur en calcium a en effet un impact important sur le temps de coagulation et sur la consistance du gel obtenu (RAMET, 1991)

En fromagerie, l'addition au lait de chlorure de calcium est une pratique courante à certaines saisons et/ou dans certaines régions pour corriger les insuffisances que peuvent présenter les aptitudes coagulantes des laits frais (LENOIR *et al*, 1997).

Il existe en fait une relation inverse entre la minéralisation des micelles et leur solvataion. Celle-ci est expliquée par la fixation du calcium sur les groupements chargés, ce qui entraîne une diminution de l'hydratation. Ces phénomènes concourent à l'obtention d'un gel plus ferme (REMEUF *et al*, 1989 ; REMEUF *et al*, 2001).

En effet, en raison de l'existence dans le lait de chamelle d'un équilibre salin particulier, l'ajout d'un sel de calcium apporté sous forme de chlorure ou de phosphate

monocalcique entraîne un raccourcissement très marqué du temps de coagulation et renforce la fermeté des gels (MAUBOIS et BRULE, 1982 ; RAMET, 1993).

En pratique fromagère, il convient de limiter l'ajout de sels de calcium à une concentration de 10 à 15g pour 100L de lait, ce qui entraîne une réduction du temps de coagulation de 20 à 25 pour cent par rapport à un lait non supplémenté (RAMET, 1993).

La diminution de la concentration en calcium soluble qui rend difficile la création des liaisons entre les micelles lors de la formation et le durcissement du gel. Ces manifestations conduisent à une augmentation des temps de prise, à une diminution de la fermeté du gel et enfin à un ralentissement de l'opération d'égouttage.

3.3.2.9. Comparaison des temps de floculation sur les laits bovin et camelin.

Les résultats que nous avons obtenus, suggèrent qu'il y a une affinité importante de l'enzyme extraite de caillettes de dromadaires adultes vis-à-vis des laits bovins et camelin. En revanche le temps de floculation le plus court est obtenu avec le lait camelin notamment en utilisant les ECD adultes. Ce ci est illustré par la figure 20.

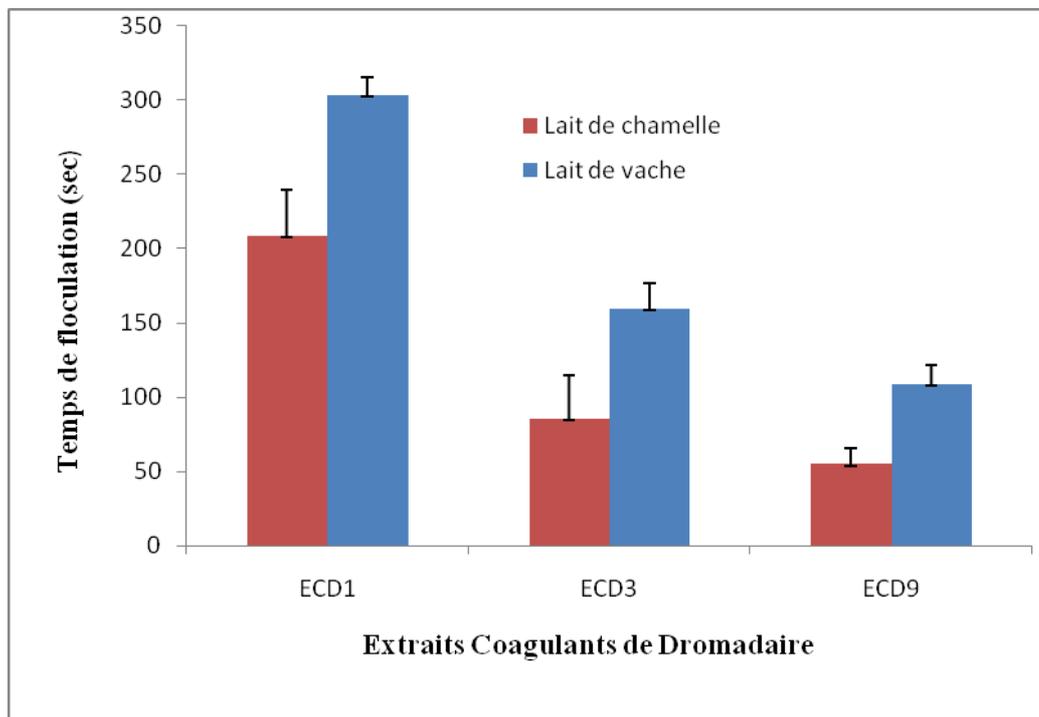


Figure 20: variation du temps de floculation des laits camelin et bovins en fonction du type d'ECD utilisé.

3.3.2.9. Influence du régime alimentaire sur le pouvoir coagulant des extraits enzymatiques bruts.

L'influence du régime alimentaire des animaux (sources de caillettes), est étudié en sélectionnant ces animaux selon le fait qu'ils soient non sevrés, à alimentation mixtes ou alors sevrés. En procédant à l'extraction par la méthode de VALLES ET FURET (1977) déjà citée, nous avons obtenus trois types d'extraits désignés : ECDNS (animaux non sevrés), ECD AM (animaux à alimentation mixte) et ECDS (animaux sevrés).

Leur activité coagulante a été calculée et les résultats sont reportés sur le tableau XVIII. L'affinité par rapport aux deux laits (camelin et bovin), en fonction de la température et le pH d'emprésurage, a été estimée par la mesure du temps de floculation de ces derniers. Les résultats sont portés sur les figures 21 et 22.

Tableau XVIII : L'activité coagulante des extraits issues des animaux à différents régimes alimentaires

Préparations Enzymatiques	Activité Coagulante (UP)
ECD NS	0.135 ^a ± 0.002
ECD AM	0.255 ^b ± 0.00
ECD S	0.410 ^c ± 0.020
Pepsine bovine (Pb)	0.123 ^d ± 0.002
Présure bovine (Prb)	0.164 ^e ± 0.002

ECD NS : Extraits Coagulants de Dromadaires Non Sevrés ;

ECD AM : Extraits Coagulants de Dromadaires à Alimentation Mixte ;

ECD S : Extraits Coagulants de Dromadaires Sevrés ;

Pb : Pepsine bovine;

Prb : présure bovine.

La comparaison des moyennes a montré que les résultats sont significatifs ($P \leq 0.05$). Ces extraits sont différents par leur pouvoir coagulant. De ce fait, ils appartiennent chacun à un groupe. D'après ces résultats, nous constatons que ce sont les extraits issus des animaux sevrés qui sont doués d'un pouvoir coagulant le plus élevé. Ceci paraît paradoxal, si nous nous basons sur les connaissances acquises sur les extraits enzymatiques issus de caillettes de bovidés. Ces extraits perdent avec l'âge leur activité coagulante et acquièrent en parallèle une activité protéolytique marquée, due à la pepsine,

Comme la présure est constituée d'un mélange de chymosine (80%) et de pepsine (20%) quand elle est issue de caillettes de jeunes ruminants nourris au lait, et que ce mélange

s'inverse (20% de chymosine et 80% de pepsine) quand l'enzyme est extraite de caillettes de bovin adultes, nous pouvons émettre les hypothèses suivantes pour justifier cette particularité :

- les extraits issus des animaux sevrés sont riches en pepsine étant donné que la pepsine seule donne d'assez bons résultats sur la coagulation du lait ;
- l'enzyme initiale (chymosine) subit des réarrangements structuraux qui lui font perdre son aptitude à dégrader les caséines (action protéolytique) alors que l'activité coagulante serait protégée.

Ces extraits sont testés sur le lait camelin et bovin à différentes températures et pH. Le temps de floculation est calculé et les résultats sont illustrés par les figures 21 et 22.

Les deux figures illustrent nettement que le temps de floculation le plus court est obtenu avec les ECD sevrés notamment pour le lait camelin et dans toutes les conditions de pH et de température. La rapidité de la floculation du lait est probablement favorisée par la pepsine que contiendrait l'extrait gastrique coagulant de dromadaires sevrés (ECDS) comme signalé par RAMET (1994) qui conclue que l'utilisation de la pepsine bovine aboutit à des temps de floculations, plus faibles du lait de chamelle, comparativement au lait de vache.

Étant donné qu'aux températures utilisées, la préparation enzymatique isolée à partir des dromadaires sevrés donne le temps de floculation le plus court, cela suggère que l'enzyme présente en abondance dans ces extraits (probablement la pepsine), exerce un effet coagulant plus intéressant sur le lait camelin. Ce résultat est en accord avec les constatations faites par WANGOHO *et al* (1993) et RAMET (1994).

Il est évident que la nature protéique du lait de chamelle présente quelques différences notables comparativement au lait de référence (dimension et nature des micelles, nature et proportion des protéines présentes, sites potentiels de coupure des caséines etc...). Il peut être admis que l'activité de la pepsine pour ce substrat soit davantage coagulante. Si c'est le cas, cette enzyme serait parmi les facteurs de réajustement à envisager pour améliorer l'aptitude du lait camelin à la transformation en fromage.

Cette perspective est d'autant plus intéressante quand on sait que des extraits contenant cette enzyme, peuvent être obtenus en quantité, vu la relative disponibilité des dromadaires adultes destinés à l'abattage.

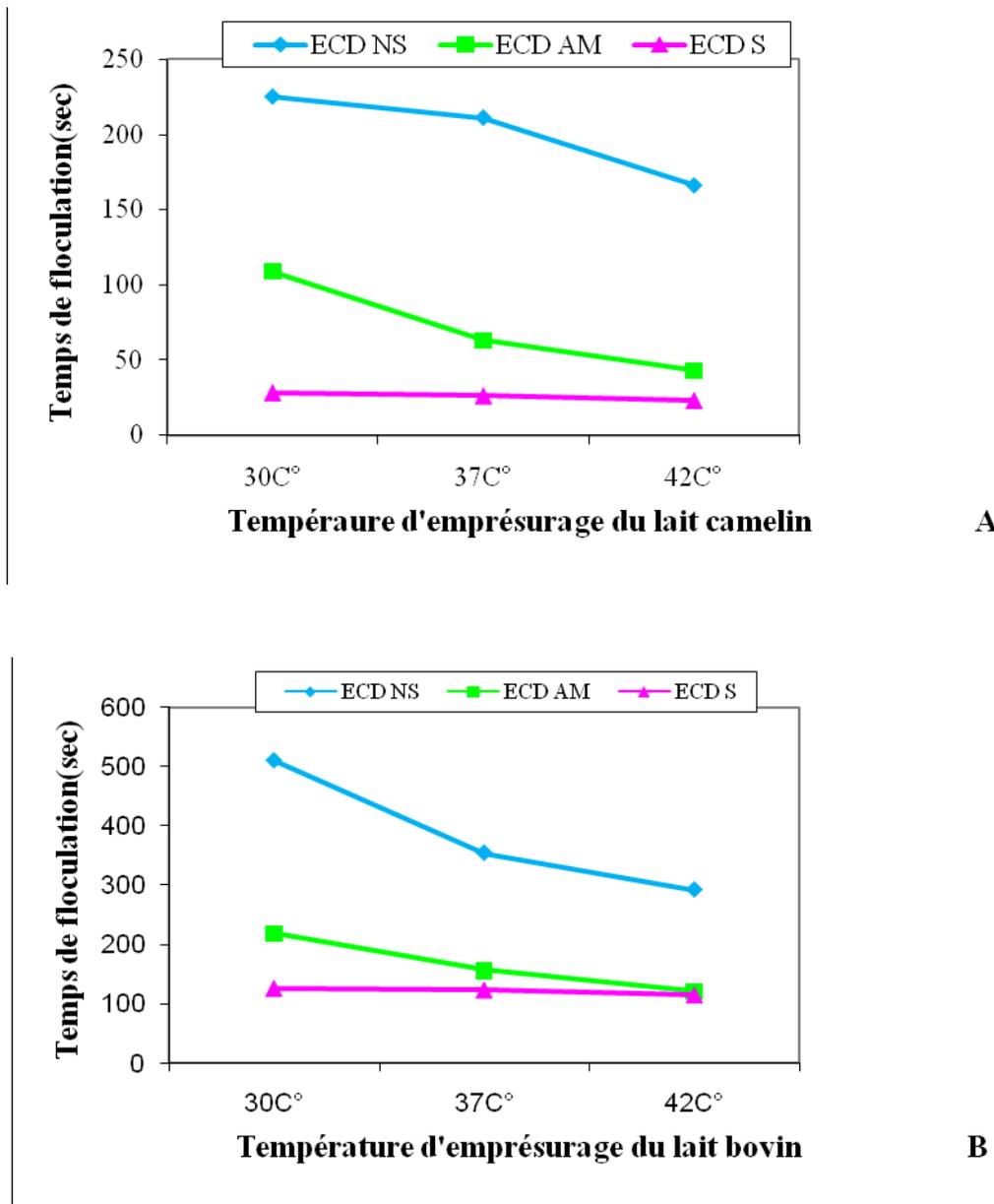


Figure 21 : Influence de la température sur le temps de floculation du lait en fonction de la nature des ECD utilisés. A (lait camelin) ; B (lait bovin)

ECD NS : Extraits Coagulants de Dromadaires Non Sevrés ;

ECD AM : Extraits Coagulants de Dromadaires à Alimentation Mixte ;

ECD S : Extraits Coagulants de Dromadaires Sevrés

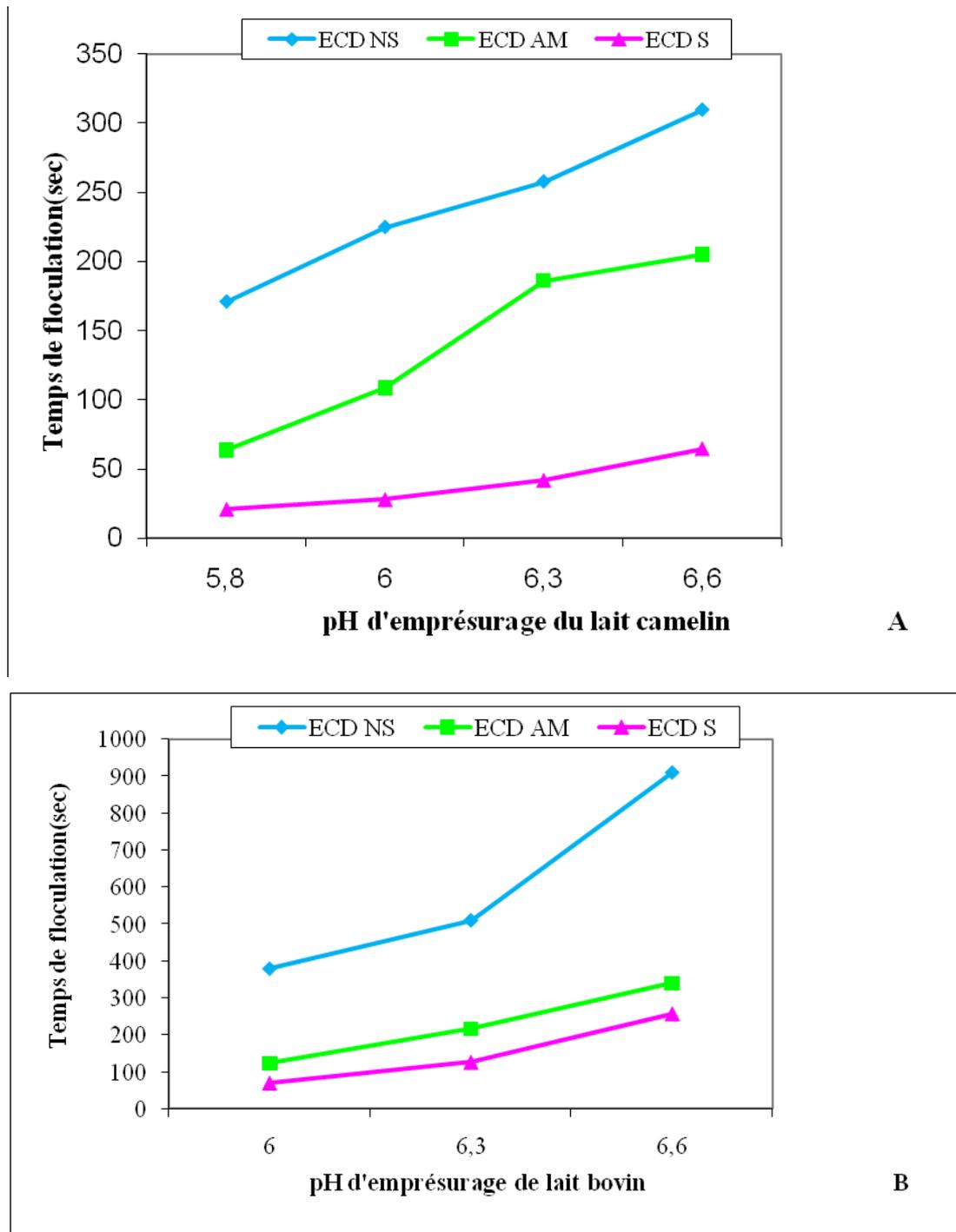


Figure 22: Influence du pH sur le temps de floculation du lait en fonction de la nature des ECD utilisés. A (lait camelin) ; B (lait bovin)

ECD NS : Extraits Coagulants de Dromadaires Non Sevrés ;

ECD AM : Extraits Coagulants de Dromadaires à Alimentation Mixte ;

ECD S : Extraits Coagulants de Dromadaires Sevrés

Par ailleurs, les nomades de l'Ahaggar (Sud de l'Algérie) fabriquent leurs fromages en utilisant exclusivement comme agent coagulant, des morceaux d'estomac issus de lapins du désert. Cet estomac renferme, comme chez tous les mammifères, de la pepsine. Ce qui conforte le statut privilégié de la pepsine pour coaguler le lait camelin.

En Egypte, EL-ABASSY (1987 cité par WANGOH *et al* (1993) et EL- BATAWY (1987) ont montré que la pepsine provenant des estomacs de dromadaires adultes, pouvait être utilisée pour produire une préparation coagulante dans des conditions acceptables d'activité et de stabilité.

Toutefois, le pH d'emprésurage influe directement sur l'activité des enzymes coagulantes de fromagerie, qui sont des protéases ayant une activité optimale située autour du pH 5,5 (RAMET, 1994). Selon les essais réalisés, une acidification du lait au pH de 5.8 améliore sensiblement les temps de floculations du lait de chamelle, incubé en présence d'extraits enzymatiques issus de caillettes de dromadaires adultes.

Par ailleurs, FARAH et BACHMAN (1987) ; MEHAIA (1992) ; RAMET (1993) ont montré l'existence d'une relation presque linéaire entre la température et l'activité des préparations coagulantes dans l'intervalle de température de 25 à 40°C. Selon DESMAZEAUD (1990), la vitesse de coagulation enzymatique du lait par la présure serait maximale entre 40 et 42°C. Cette vitesse diminue progressivement au-dessus de ce seuil (THOUVENOT, 1997). Sur la base de ces résultats, nous préconisons une température optimale de 42°C et un pH de (5.8) pour une meilleure activité des extraits enzymatiques isolés d'origine cameline.

3.4. Caractérisation et conservation de l'extrait coagulant brut

3.4.1. Purification de l'extrait coagulant de dromadaire adulte

La purification de l'extrait est réalisée par chromatographie sur DEAE-cellulose. Le pH du tampon (pH 5,5) utilisé, est supérieur au pHi des enzymes coagulants, ces dernières prennent une charge nette négative et se fixent sur les groupements positifs de la DEAE cellulose.

Le profil d'élution (figure 23) donne une seule fraction importante (éluee à 0.5 M) ayant un maximum d'activité enzymatique.

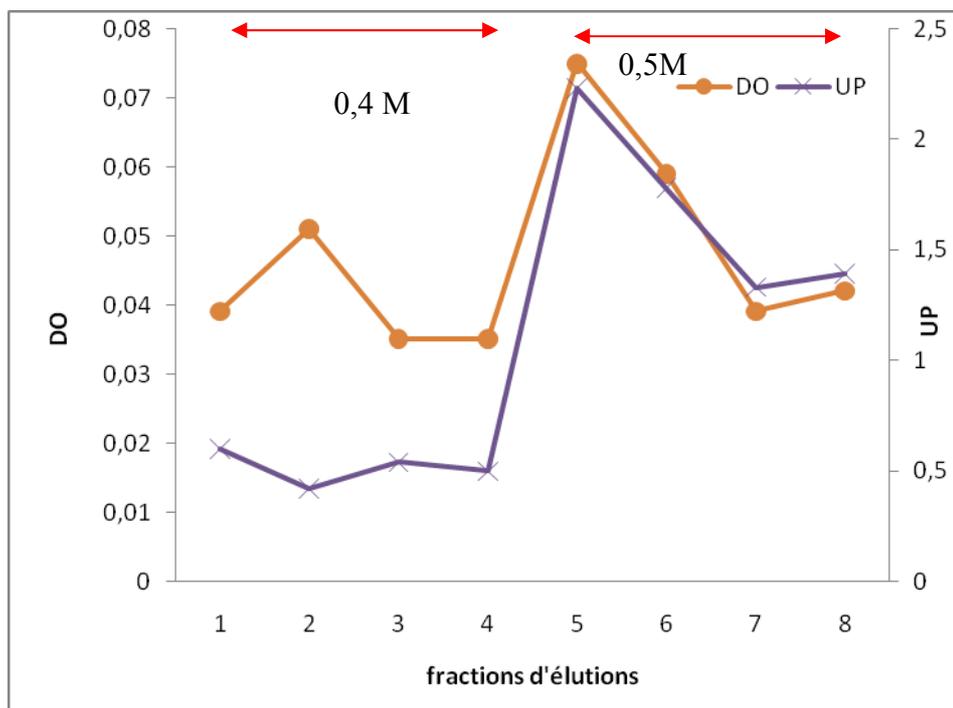


Figure 23 : Profil de séparation chromatographique de l'extrait coagulant de dromadaire adulte sur colonne (1x10cm) de DEAE-cellulose équilibrée avec le tampon phosphate, pH 5.5 ; débit d'élution : 30ml/h ; 4 ml/ fraction

Travaillant sur des extraits analogues, WANGOH *et al* (1993) signalent que le maximum d'absorption obtenu avec un tampon de concentration de 0,5 M en NaCl correspond précisément à l'activité de la pepsine. BENGANA (2001) a pu isoler la pepsine bovine en présence d'une concentration de chlorure de sodium de 0,5 M. Cependant, FOX *et al* (1975), en utilisant un tampon pipérazine, avaient élué la chyomosine (à 0,2M en NaCl) et la pepsine, (à 0,4M).

Il paraît plus probable au vu de ses résultats qui sont comparables que la fraction éluee à 0.5M corresponde à la pepsine cameline. D'autant qu'ECK et GILLES (1997) estiment que chez les animaux âgé, la teneur en pepsine est importante comparablement à la chymosine qui finit par disparaître chez un sujet adulte.

La comparaison de l'activité coagulante de l'ECD brut avec celle des fractions éluees a montré que la purification influence négativement cette activité (figure 24).

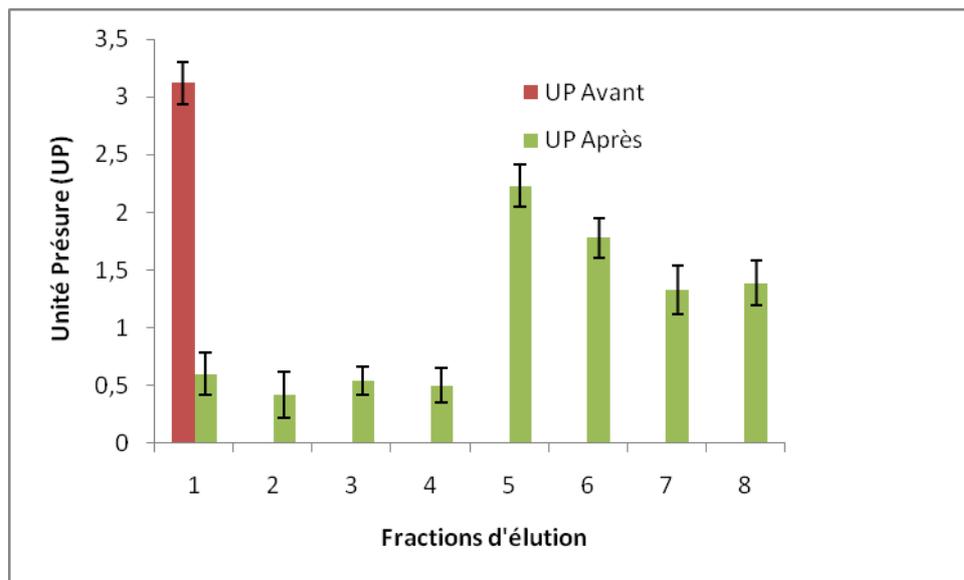


Figure 24 : Histogrammes de comparaison entre l'activité coagulante (UP) avant et après la purification de l'Extrait Coagulant de dromadaire adulte.

UP avant : unité présure avant purification
UP après : unité présure après purification

En effet, nous avons une diminution remarquable de l'UP entre l'extrait brut et les fractions purifiées qui serait pourrait être due au fait que des composés non protéiques, présents dans le milieu, sont nécessaires pour l'expression de l'activité.

3.4.2 Comportement électrophorétique en PAGE-SDS

Afin d'avoir une idée sur la nature des différences pouvant être mises en évidence entre un extrait de dromadaire provenant d'un animal non sevré et celui provenant d'un animal adulte, nous avons examiné le comportement de ces extraits en électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de Dodécyl sulfate de sodium (SDS) avec ou sans b-mercaptoéthanol. Le diagramme obtenu (figure 25) montre qu'il ya une différence assez nette entre les profils provenant des deux origines (jeune et âgé).

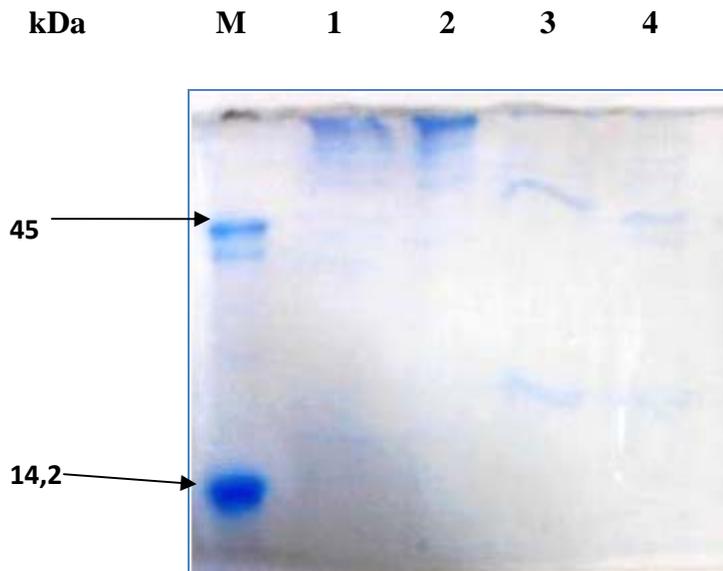


Figure 25 : Profil électrophorétique en Page-native des extraits de caillettes de dromadaires

T= 17%, C= 2,7%

M : marqueurs de taille (ovalbumine 45kDa ; α -lactalbumine 14,2 kDa)

1 : caillette de dromadaire de 3 mois avec β -ME

2 : caillette de dromadaire de 3 mois sans β -ME

3 : caillette de dromadaire de 9 ans avec β -ME

4 : caillette de dromadaire de 9 ans sans β -ME

(β -ME : β - mercaptoéthanol)

En effet, si l'extrait provenant de caillettes de dromadaires de 3 mois présente des bandes ayant des PM les plus élevés, ce n'est pas le cas des extraits issus de caillettes de dromadaire de 9 ans où nous distinguons deux bandes intenses, l'une estimée à 50 000 et l'autre 30 000 Da.

Ce résultat n'a malheureusement pas pu être confirmé avec d'autres échantillons, vu que nous disposions de très peu pour réaliser ces séparations électrophorétiques. Ce n'est que dernièrement que nous avons repris les préparations pour étudier en profondeur la nature et l'intensité des différences qu'ils pourrait y avoir entre les deux extraits enzymatiques.

3.4.3. Evolution de l'activité de l'extrait en fonction du mode de conservation

La stabilité de l'extrait coagulant a été suivie chaque mois en fonction de trois modes de conservation (réfrigération, congélation et lyophilisation) et cela pour une période de trois mois. La variation de l'activité de l'extrait coagulant de dromadaire selon le mode de conservation est illustrée sur la figure 26.

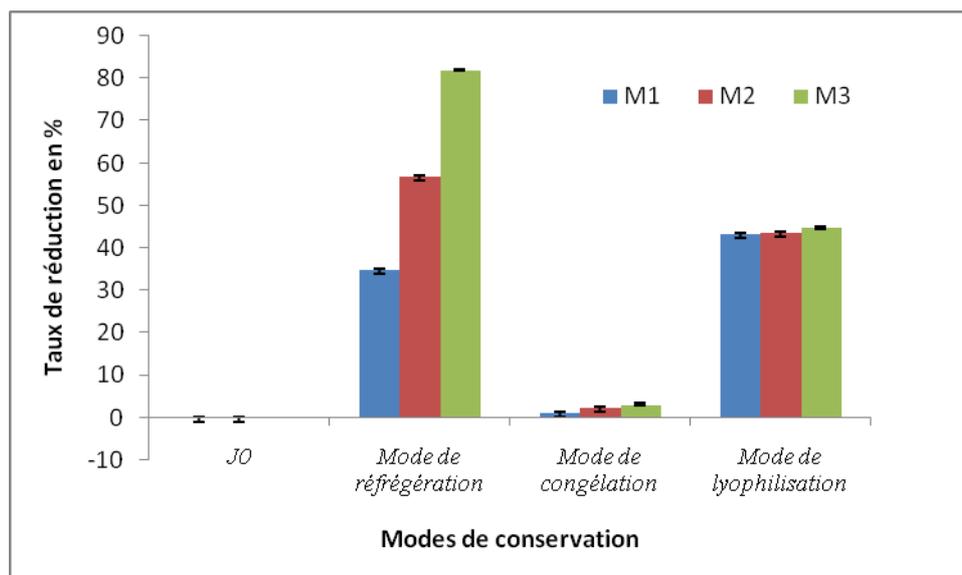


Figure 26 : Variation du taux de réduction de l'activité coagulante des extraits en fonction des modes et durées de conservation

Il apparaît que la conservation de l'activité coagulante de l'extrait est meilleure à l'état congelé qu'à l'état réfrigéré et lyophilisé. L'extrait congelé a conservé 99,8 % de son activité initiale, après 30 jours de conservation, contre 65 pour l'extrait réfrigéré et 66,4% pour l'extrait lyophilisé. La perte d'activité de l'extrait réfrigéré est notable durant le troisième mois de conservation. (Figure27).

La perte d'activité des extraits de pepsine au cours du stockage à 5-10°C a été rapportée par ELABASSY et WAHBA (1988). Cette perte varie de 14 à 100 % au cours de la conservation pendant 7 jours à pH 5,5-6,5.

La composition du milieu ainsi que la présence d'impuretés semblent influencer la stabilité de la pepsine. En effet, la pepsine purifiée conservée dans du tampon phosphate à pH 6,9 est stable à l'état réfrigéré et congelé (DONTA et VAN VUNAKIS, 1970). Toutefois, des extraits de présures préparés par simple clarification et filtration du jus macéré sont conservés jusqu'à 3 mois par réfrigération (entre 5 à 7°C), sans perte considérable d'activité, Le benzoate de sodium est additionné à raison de 1% au cours de la macération. L'extrait brut de

présure d'agneau (pH 5,3) stocké à 4°C pendant 120 jours conserve 84% de son activité coagulante initiale (CUVELLIER, 1993).

Par ailleurs, la perte d'activité des extraits lyophilisés, notée le premier mois, ne serait pas dû à la durée de conservation mais par contre au procédé lui même étant donné que l'activité résiduelle est maintenue durant les mois qui suivent (Figure 27). A ce titre, BOHAK (1970) mentionne un taux de perte d'activité enzymatique de 55 %. D'autres auteurs recommandent de ne pas lyophiliser la pepsine vue la perte considérable en activité sans préciser la teneur des pertes subies (DONTA et VAN VINAKIS, 1970).

Par ailleurs, l'addition du lactose à raison de 5% (p/v) de l'extrait apporte une amélioration de la stabilité de la pepsine au cours de la lyophilisation avec 93,25 % l'activité coagulante initiale récupérée (CARPENTER *et al.* 1993).

La concentration optimale en saccharides permettant le maximum de protection des protéines est généralement comprise entre 100 à 200 mM. A des concentrations plus élevées le sucre tend à cristalliser (CARPENTER *et al.*, 1993). Le lactose est parmi les disaccharides les plus utilisés comme agent protecteur.

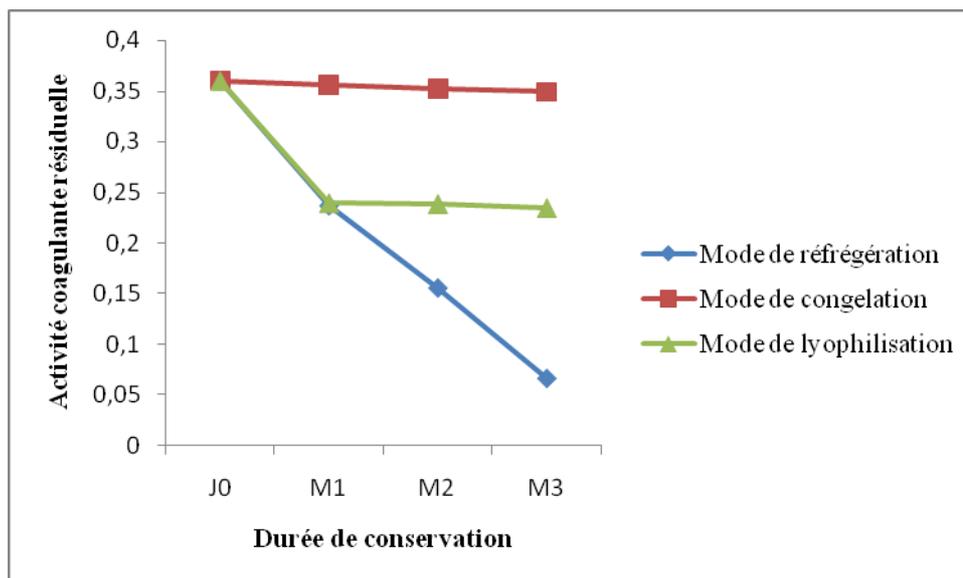


Figure 27 : Variation de l'activité résiduelle des extraits en fonction du mode et de la durée de conservation.

3.5. Etude de la protéolyse des caseines camelines

Nous avons vu précédemment que la réfrigération du lait et sa conservation pendant un temps plus ou moins long induisent le développement des bactéries psychrotrophes qui peuvent devenir constituer la flore dominante. Parmi ces bactéries, le genre *Pseudomonas* est le plus fréquent. Bien que ces bactéries soient détruites par la pasteurisation, elles peuvent sécréter auparavant des protéases exocellulaires et thermorésistantes, capables de dégrader les constituants du lait et d'occasionner des défauts en cours de stockage.

En complément, nous avons essayé de voir dans quelle mesure la protéolyse des caseines est affecté par le développement des bactéries psychrophes. Pour cela, nous avons comparé la protéolyse provoquée par les extraits coagulants de dromadaire sur le substrat caseinique frais et sur celui conservé à différentes températures et à des durées variées. La dégradation enzymatique est estimée par la mesure de l'absorbance à 280nm.

3.5.1. Activité protéolytique des extraits coagulants sur les caséines lyophilisées issues du lait de chamelle frais.

Les essais réalisés montrent (figure 28) que la protéolyse est variable selon le type de préparation. La valeur la plus faible est obtenue pour l'ECD 9 ans, suivie de celles de l'ECD3 puis de l'ECD1. De ce fait, on peut conclure que l'impact de l'activité protéolytique est relativement plus élevé dans le cas de l'extrait issu d'animaux jeunes que ceux provenant d'animaux âgés. Ceci pourrait s'expliquer par les réarrangements tridimensionnels que pourraient subir l'enzyme avec le temps et la formation de nouvelles liaisons (cas de formation de ponts S-S), à l'exemple de celles générées dans le cas d'un collagène provenant d'animaux âgés, qui limiteraient autant l'activité catalytique sur les sites de coupure potentiels.

3.5.2. L'activité protéolytique des extraits coagulants sur les caséines lyophilisées issues du lait réfrigéré à 4 et à 7°C (cru et pasteurisé).

Au vu des résultats obtenus (figures 29- 32), nous pouvons relever que l'augmentation de la protéolyse des caséines est toujours inversement proportionnelle à l'âge des animaux dont sont issus les ECD quelque soit l'origine du lait (frais, cru ou pasteurisé).

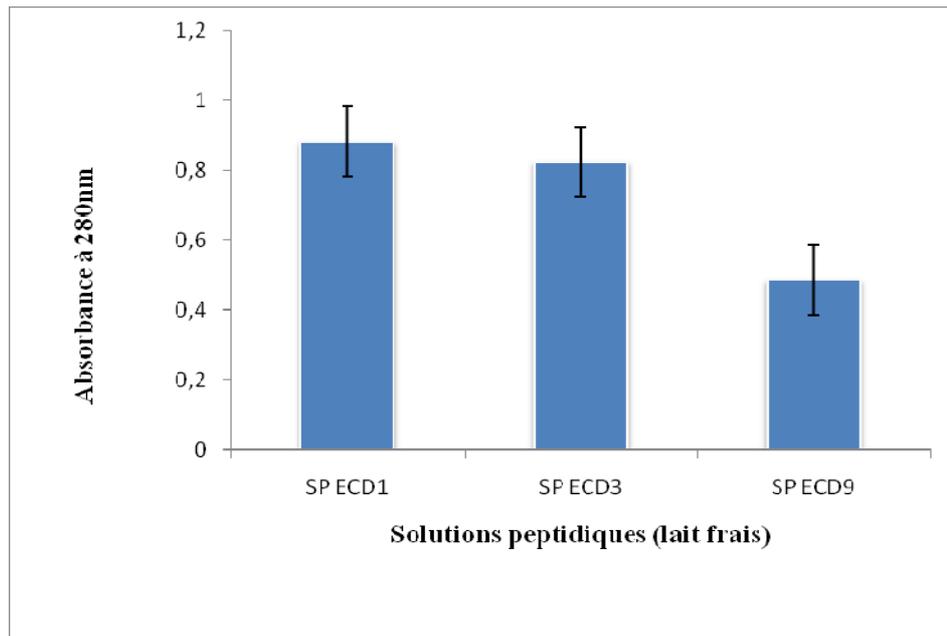


Figure 28: Variation de l'absorbance des échantillons du lait frais en fonctions des différents extraits coagulants de dromadaire.

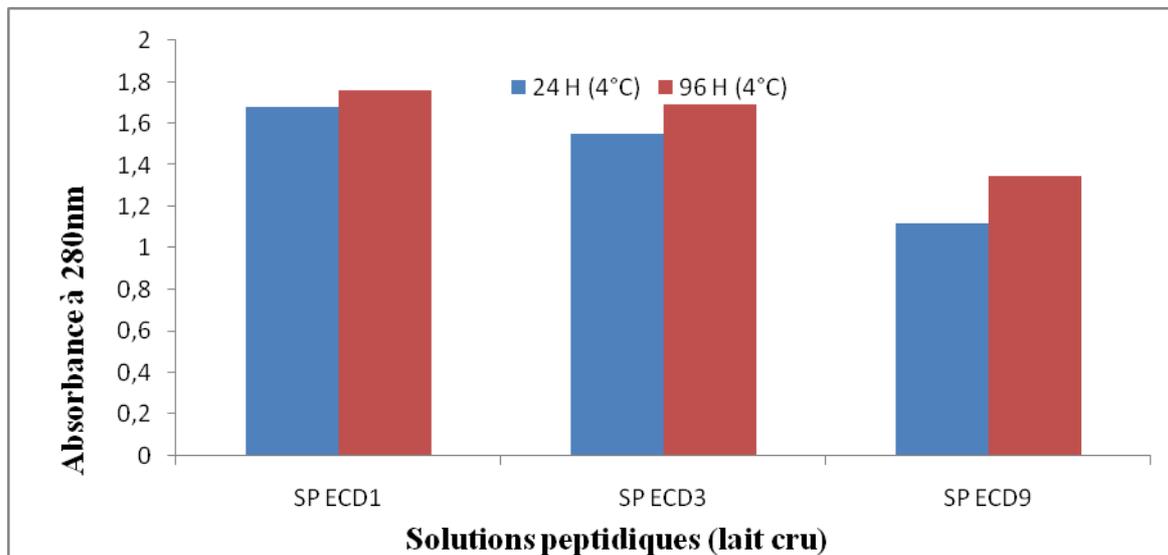


Figure 29 : Variation de l'absorbance des échantillons du lait de chamelle cru réfrigéré à 4° en fonction de la durée de conservation (24h, 96 h).

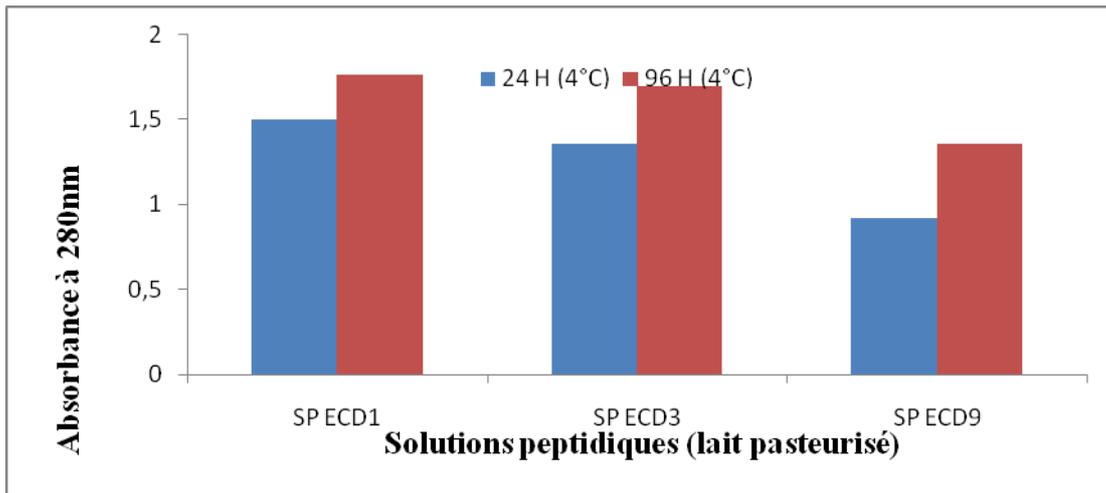


Figure 30: Variation de l'absorbance des échantillons du lait de chamelle pasteurisé porté à 4° C en fonction de la durée de conservation (24 et 96 h).

SPEC D1 : Solution peptique issue de l'hydrolyse des caséines traitées par L'ECD1

SPEC D3 : Solution peptique issue de l'hydrolyse des caséines traitées par L'ECD3

SPEC D9 : Solution peptique issue de l'hydrolyse des caséines traitées par L'ECD9

La protéolyse a augmenté dans tous les cas testés notamment après 24h de réfrigération. Ceci s'expliquerait par la prolifération des germes psychrotrophes dont l'activité protéolytique va s'ajouter à celle des extraits coagulants utilisés. Il existe peu de travaux qui permettent d'établir une corrélation valable entre le nombre des bactéries psychrotrophes et la production de protéases. LAW *et al* (1977) ne décèlent pas d'activité protéolytique avec la souche de *Pseudomonas fluorescens* AR11, pour un taux de l'ordre de $8,0 \times 10^5$ germes/ml. ADAMS *et al* (1976) constatent une dégradation du lait URT lorsque le taux de bactéries dans le lait cru excède 10^8 germes/ml.

COUSIN et MARTH (1977) observent une protéolyse dans des laits pasteurisés obtenus à partir du lait cru contenant un nombre total de *Pseudomonas* de l'ordre de $4,0 \times 10^6$ germes/ml. En fait, même si la pasteurisation fait diminuer le nombre des psychrotrophes, il peut y avoir libération d'enzymes thermorésistantes qui seront actives après ce traitement et qui risquent d'entraîner la gélification du lait (TEJADA *et al*, 2008).

Il est établi que différents défauts de saveur comme l'amertume peuvent se développer dans le lait et les produits laitiers et les déprécier fortement, voire les rendre inconsommables.

Lorsque la protéolyse s'accompagne d'une dégradation des acides aminés, elle peut provoquer un goût putride (REVILLA *et al*, 2009). Il faut observer qu'une action très discrète des protéases peut avoir un effet favorable sur le développement des bactéries lactiques en leur fournissant des peptides et des acides aminés qui leur sont nécessaire. Comme la conservation du lait bovin au froid n'est pas exempte d'inconvénients, cette disposition si elle venait à se généraliser au lait camelin, dans les centres de collecte et/ou de transformation, se heurterait à l'action protéolytique des germes psychrotrophe.

De plus, le maintien du lait à basse température provoque la solubilisation d'une partie des caséines (RICHOUX *et al*, 2009) et du phosphate de calcium (KENT *et al*, 2009) qui ont pour conséquence une réduction de la taille des micelles et leur plus grande dispersion dans le lait (DUPAS *et al*, 2009).

Ces modifications, d'ordre physico-chimique, ne sont pas sans conséquences technologiques en fromagerie où on observe :

- un allongement du temps de coagulation qui est de l'ordre de 5 à 25 % pour un lait maintenu 48 h à 3°C :
- une modification des caractères rhéologiques du coagulum. Celui-ci est plus mou et plus fragile. Il est alors moins apte aux traitements mécaniques. En outre, du fait de la fragilité du caillé, celui-ci se désagrège provoquant la formation de "fines" qui sont entraînées dans le lactosérum. La perte sous forme de poussières de caillé peut être augmentée de plus de 15 % par rapport aux mêmes fabrications en lait non refroidi (FLOURY *et al*, 2009)

Cependant, ces effets du froid sur les aptitudes fromagères sont très variables selon les laits. Ils sont en général relativement peu importants tant que la durée de conservation du lait à basse température ne dépasse pas 48 heures. Ils sont en partie réversibles et des corrections permettent de restaurer de façons assez satisfaisantes, sinon complètement, ces aptitudes (FEKADU *et al*, 2009).

3.6. Essai de fabrication d'un fromage au lait camelin en utilisant l'extrait coagulant de caillettes de dromadaire

En disposant du matériel approprié, au niveau du hall technologique du Laboratoire des sciences alimentaires d'Al Ain (Emirats arabe Unis), nous avons pu fabriquer un fromage au lait camelin en utilisant l'extrait coagulant adulte. Les conditions expérimentales optimales de cet extrait ont été respectées. Les étapes suivies dans cette fabrication sont illustrées par la figure 33



Figure 31 : Etapes suivies au laboratoire pour la fabrication d'un fromage au lait camelin en utilisant les extraits enzymatiques coagulants isolés de caillettes de dromadaire adulte (pH =5.8 ; température = 42°C).

Afin de pouvoir faire une évaluation sensorielle de ce produit, deux autres fromages ont été fabriqués. Un quatrième est utilisé comme témoin.

Ces quatre fromages sont ainsi codés :

E1= fromage commercial (utilisé comme témoin)

E2= fromage au lait bovin traité par la présure commerciale

E3=fromage au lait bovin traité par les extraits coagulants camelins

E4= fromage au lait de chamelle traité par les extraits coagulants camelins

3.6.1. Calcul du rendement fromager

Le rendement fromager a été calculé à partir de 100 ml de chaque lait. L'analyse des résultats (figure 34) montre que ces derniers sont satisfaisants, même s'ils inférieurs à ceux du lait de vache.

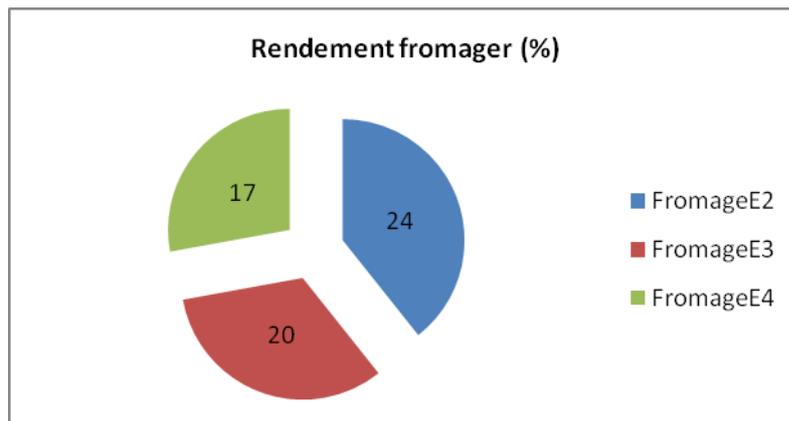


Figure 32: Variation du rendement fromager en fonction du type du lait et d'enzymes utilisés

E2 : lait bovin traité par la présure commerciale

E3 : lait bovin traité par l'extrait coagulant de dromadaire adulte

E4 : lait camelin traité par l'extrait coagulant adulte

Ces différences peuvent provenir tout autant de la moindre teneur en matière sèche du lait de dromadaire que de la plus grande importance des pertes en extraits secs dans le lactosérum (KAMOUN, 1990). Toutefois, le rendement obtenu dans cette étude (17%) est supérieur à celui rapporté par KAMOUN (1990) (12%) en utilisant la présure commerciale. Cette différence s'explique par l'existence d'une grande affinité entre l'extrait coagulant de

dromadaire et le lait de chamelle et aussi par la variabilité de cette matière selon les régions et les races.

3.6.2. Evaluation sensorielle des fromages

L'aspect blanchâtre de la pâte a été remarqué dans le fromage camelin par rapport au fromage bovin qui était un peu jaunâtre (photographie en annexe 4). Cet aspect serait dû à la faible teneur en vitamine A dans le lait camelin d'après les données bibliographiques.

D'après le jury de dégustation, le fromage au lait de chamelle (E4) est bien apprécié. Toutefois, les dégustateurs ont remarqué une certaine saveur caractéristique de ce fromage. Bien qu'aucun ferment lactique n'a été ajouté au lait de fabrication, un arôme a été senti par les dégustateurs dans les fromages E3 et E4. Le développement de cet arôme peut être attribué à une activité protéolytique et lipolytique des bactéries autochtones car, selon ARIZKAN et COLL, (1997), ces bactéries ont un effet direct sur les caractéristiques sensorielles des produits laitiers fermentés.

La rancidité est un caractère non signalé par le jury de dégustation. Ce résultat peut suggérer l'absence d'acides gras dans le lait de fabrication susceptibles d'être oxydés (LEMIEUX et SIMARD, 1994).

L'amertume non plus n'est pas signalée par le jury et aucune distinction, entre le fromage E3 et E2, n'a été relevée même du point de vue aspect général (photographie en annexe)

A rappeler que E2 est un fromage traditionnel à base du lait bovin très consommé et demandé dans la région des Mzab (Ghardaïa). Ce fromage porte le nom de Kemaria ou Takemmarit.

Les attentes du consommateur sont très précises en ce qui concerne les fromages. Cependant d'une personne à l'autre ces attentes peuvent être légèrement différentes, c'est pourquoi il est parfois difficile de dire si une texture ou une saveur est plutôt bonne ou mauvaise. Mais de manière générale, il existe des « règles » qui semblent universelles (observations de l'entourage). Cependant, il paraît logique que si ces saveurs sont présentes mais avec une perception minimale, cela ne va pas changer du tout au tout le goût de base du fromage. Il faut également qu'il y ait une harmonie dans le goût global, ainsi si un fromage ne présente que des saveurs amère et acide sans une pointe de sucré, il est peu probable qu'il corresponde au goût du consommateur. C'est pour ces raisons que lors de la dégustation, le jury, n'a pas suivi avec exactitude la fiche de dégustation qui leur a été présentée mais les dégustateurs ont donné une appréciation globale aux fromages. L'acceptabilité du fromage camelin a été évoquée à l'unanimité.

3.6.3. Etude de la texture des caillés camelin et bovin

L'étude de la texture (par utilisation de TPA : analyse du profil de texture) des caillés obtenus après la coagulation du lait camelin et bovin par l'utilisation de l'extrait coagulant de dromadaire adulte, a révélé que ces caillés sont caractérisés par les paramètres consignés dans le tableau XIX.

XIX : Paramètres mesurés de la texture des caillés bovin et camelin.

Type du caillé	Paramètres mesurés			
	Dureté (g)	Elasticité (mm)	Cohésion	Adhésivité (g.s)
Caillé bovin traité par la présure commerciale (E2)	320 ± 1.73	6.27 ± 0.017	0.41 ± 0.030	47.55 ± 3.03
Caillé bovin traité par l'extrait coagulant adulte (E3)	305 ± 1.63	6.80 ± 0.027	0.48 ± 0.025	45 ± 2.03
Caillé camelin traité par l'extrait coagulant adulte (E4)	290 ± 2.46	7.29 ± 0.021	0.45 ± 0.014	76 ± 6.33

L'analyse des données est faite avec le logiciel SPSS en faisant une analyse de variance.

D'après ces résultats, nous constatons que le caillé camelin diffère du caillé bovin pour tous les paramètres ($p < 0.01$). Cependant, hormis la dureté, tous les autres paramètres se ressemblent pour les deux caillés bovins traités différemment. L'analyse du profil de texture permet d'accéder à des grandeurs discriminante corrélées à l'analyse sensorielle (BROWN *et al*, 2003 ; EVERARD *et al*, 2006). Il faut cependant veiller à ce que les conditions de réalisation du test soient proches de l'analyse sensorielle (FOEGGEDDING et DRAKE, 2007). Les méthodes instrumentales sont ainsi intéressantes pour remplacer l'analyse sensorielle dans certaines conditions à cause de leur rapidité, de leur moindre coût et des résultats reproductibles qu'on obtient.

Les particularités du lait camelin expliquent les différences observées dans la texture des caillés bovin et camelin obtenus. Telles que la nature des caséines car ces dernières se distinguent selon leur degrés de phosphorylation et donc par leur capacité de liaison aux minéraux ce qui est considéré comme un élément fondamental de constitution de la structure et de la texture des fromages (GAUCHERON, 2005).

Par ailleurs, le caractère granuleux observé dans le fromage fabriqué peut être relié à un pouvoir tampon élevé du lait camelin (MASLE *et al*, 2001 ; MIETTON *et al*, 2004).

La composition physico-chimique particulière du lait camelin déjà citée explique aussi la différence dans la fermeté des fromages. En effet La teneur élevée en protéines sériques est reliée à des fromages moins fermes, leurs interactions avec les caséines étant modifiées (LUCHEY *et al*, 2003). La température du caillage plus élevée pourrait jouer en faveur de l'organisation du gel (CASTILLO *et al*, 2006). Le lait enrichi en calcium permettrait de maintenir en parti la structure micellaire assurant un meilleur égouttage (GASTALDI *et al*, 1994).

L'analyse des résultats montre que le texturomètre TPA permet de donner des mesures discriminantes corrélées en parti à l'analyse sensorielle au niveau de la texture. Les principaux facteurs d'influences ont pu être mis en évidences. On note en amont de la composition du fromage l'influence de la composition du lait, de la conduite de l'acidification et de la conduite de l'égouttage. Il est cependant parfois difficile de dissocier l'effet des différents facteurs car ils sont liés entre eux. Il serait ainsi intéressant de mieux les hiérarchiser de connaître l'interaction entre eux en réalisant des expérimentations en conditions contrôlées tout en ayant une meilleure compréhension des mécanismes associés.

3.6.4. Etude de la microstructure des fromages camelin et bovin

La microstructure du fromage bovin et camelin fabriqué au cours de nos essais en utilisant les extraits coagulants de dromadaire adulte a été examinée par microscopie électronique à balayage ou SEM (Scanning électron micrographe). Cette technique a révélé clairement la structure du réseau protéique des deux produits laitiers. Le réseau du caillé bovin est caractérisé par un espace plus ouvert (figure 36). En revanche la microstructure du caillé camelin a une structure compacte et uniforme (figure 37).

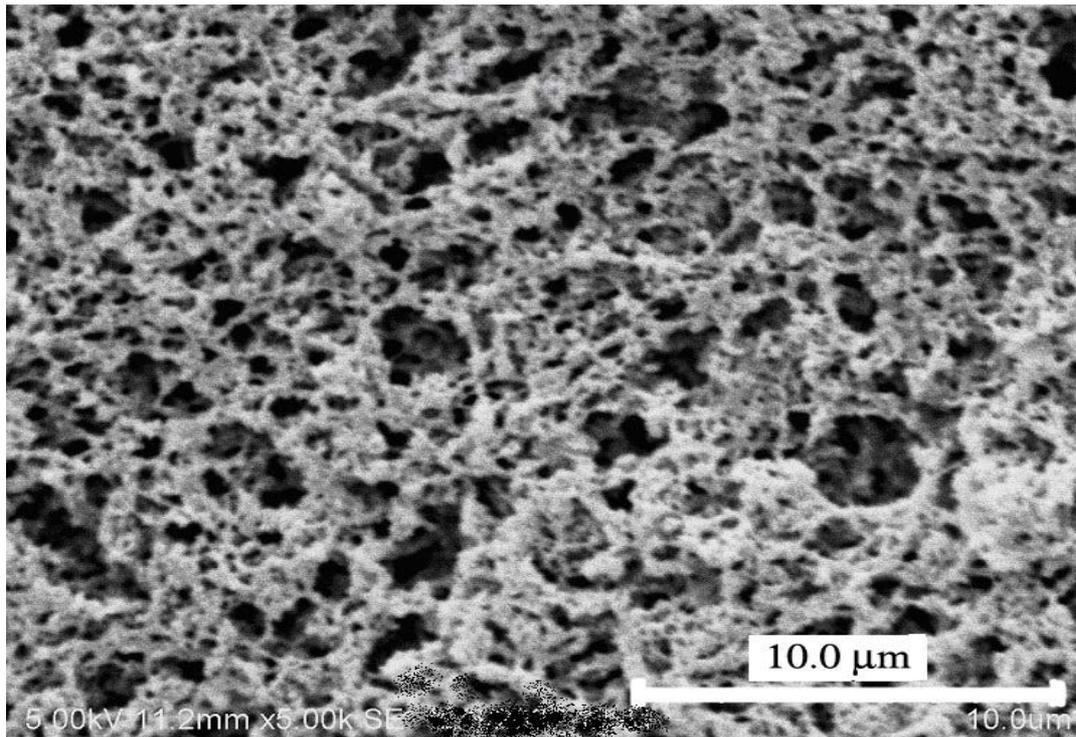


Figure 33: Microstructure du fromage bovin fabriqué **en utilisant les extraits enzymatiques coagulants isolés de caillettes de dromadaires adultes (pH =5.8 ; température = 42°C).**

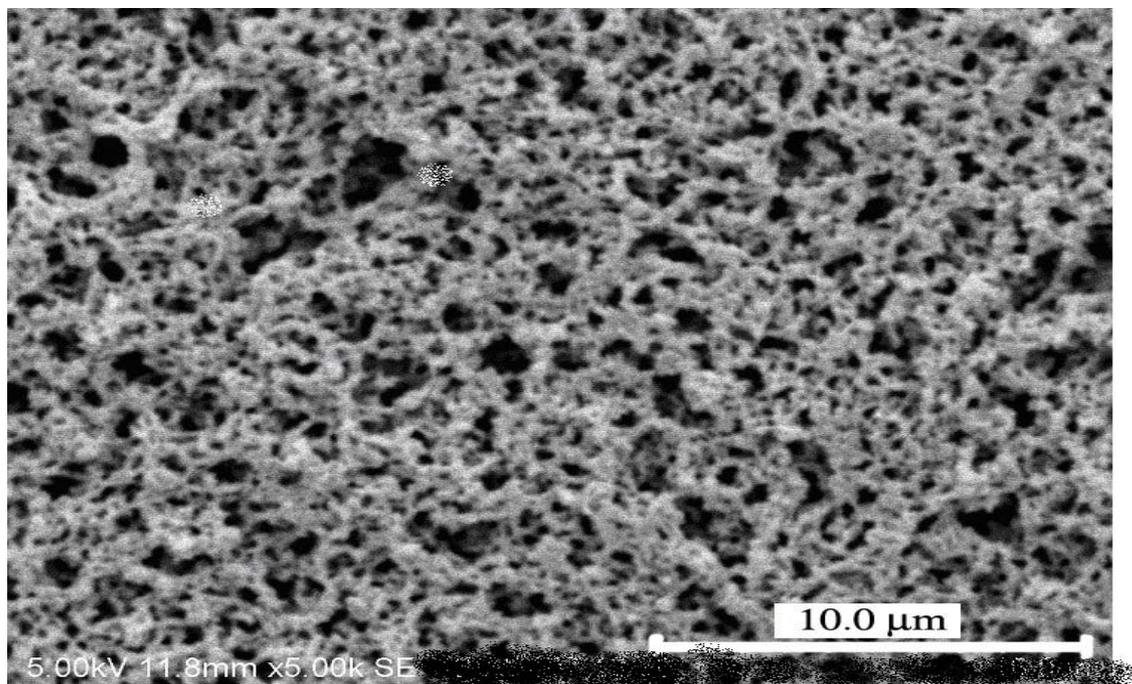


Figure 34 : Microstructure du fromage camelin fabriqué **en utilisant les extraits enzymatiques coagulants isolés de caillettes de dromadaires adultes (pH =5.8 ; température = 42°C).**

Comme il a été montré dans le fromage que la protéolyse est responsable de l'affaiblissement de la matrice protéique (ARYANA et HAQU, 2005), il s'ensuit que les variations dans la dureté et la texture observées dans les différents fromages sont probablement dues à la dégradation des caséines par les extraits enzymatiques utilisés.

Comme conclusion, l'analyse des résultats montre que les mesures instrumentales par le biais de la grandeur « dureté » permettrait d'accéder à la fermeté en bouche et à la coupe. Cette grandeur permettrait également de donner des informations sur le « sec » du produit évalué au niveau sensoriel. D'après l'étude de LAITHIER *et al*, (2009), la grandeur « dureté » est corrélée de façon moindre au fondant.

La grandeur « cohésion » permettrait d'évaluer indirectement la friabilité du produit qui lui est opposé (KIP *et al*, 2005). La grandeur « élasticité » est corrélée négativement à la friabilité.

Le plus souvent dans l'appréciation d'un fromage, la texture joue un rôle important. Par la nature des perceptions qu'elle regroupe elle mérite une place qui lui est propre entre l'apparence et la saveur. Pour les fromages, la texture contribue le plus souvent à l'expression de l'arôme : à l'extrême elle emprisonne l'arôme qui ne sera libéré que par saccades au gré de la mastication. Par ailleurs, la texture peut atténuer ou « amortir » un défaut d'arôme en l'empêchant de s'exprimer pleinement. Ainsi, dans l'appréciation des fromages, la texture occupe une place non négligeable (LAVANCHY *et al*, 1993).

Il existe également des tendances plus légères qui donnent au fromage tout son caractère. Le vocabulaire utilisé par les juges d'olfaction est alors très précis (CORNU *et al*, 2007). Les différences de saveur observées ne sont cependant pas seulement perceptibles par un jury expérimenté (DUBROEUCQ *et al*, 2002), les consommateurs sont susceptibles de percevoir les nuances de saveur des fromages et porter un intérêt au goût de celui-ci.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Le lait de dromadaire constitue une ressource alimentaire inestimable pour les populations des régions arides et semi arides de notre pays, car c'est un produit relativement riche en éléments nutritifs et qui présente en plus une disposition naturelle à la conservation supérieure à celle de tous les laits des autres espèces. Malgré ses atouts, ce lait, pour lequel les éleveurs s'empressent à l'affubler d'un certain nombre de vertus thérapeutiques, reste un produit insuffisamment exploré et présente en plus des aptitudes limitées à la transformation en produits dérivés, particulièrement en fromage.

C'est précisément pour contribuer à une meilleure connaissance de cette matière et proposer des voies à même de lui permettre d'être utilisée à grande échelle au niveau des unités laitières, que nous nous sommes orienté sur la possibilité d'amélioration de la coagulation du lait camelin en utilisant des extraits gastriques coagulants issus de dromadaires de différents âges.

Concernant les analyses préliminaires réalisées sur le lait camelin, collecté dans les régions du Sud-est Algérien, possède une bonne valeur nutritionnelle. Le pH moyen mesuré est de 6.53 une (acidité égale à 17°D), ce qui dénote de sa bonne qualité hygiénique confirmée par le test à la réductase. Sa densité est de l'ordre de 1,02, en revanche sa matière sèche est nettement inférieure à celle du lait de vache (109 contre 126 g/l). Sa composition chimique avec, particulièrement un taux de vitamine C élevé (45mg/l) et un apport protéique appréciable de l'ordre de 33g/l (avec environ 27 g/l de caséines et 7g/l de protéines sériques).

La détermination de la composition minérale du lait collecté (mesure du fer, cuivre, zinc et fluor), en raison de son implication dans l'activité des enzymes coagulantes, a fait apparaître que globalement, les teneurs en éléments chimiques des laits de ces trois régions sont très rapprochées. Les valeurs relatives aux macroéléments (calcium, magnésium, sodium ; potassium et chlorures) sont néanmoins assez élevées. Par ailleurs la recherche des oligo-éléments dans les laits collectés a permis de mettre en évidence la richesse relative de ce lait en cuivre, en zinc et en fer.

Le dénombrement de la flore psychrotrophe totale contenue dans le lait cru a montré que le genre *Pseudomonas* constitue 37% de cette flore qui est abondante dans le lait de dromadaire entreposé à 4 et 7°C pendant 4 jours. Cette constatation concerne aussi bien le lait frais que le lait pasteurisé. L'impact de cette flore sur les caséines du lait réfrigéré a été suivi. Une forte protéolyse des caséines de ces échantillons, à différentes températures durant les

quatre jours de conservation, a été constatée, confirmant la présence dominante de *Pseudomonas*, connu pour son action caséolytique spécifique.

Afin d'évaluer la portée des extraits enzymatiques coagulants issus de caillettes de dromadaires sur le lait camelin, nous avons jugé opportun de procéder à leur isolement (à partir d'animaux sevrés et non sevrés). L'extraction a été menée en utilisant le protocole proposé par VALLES et FURET (1977), que nous avons optimisé et adapté à l'espèce cameline. Trois extraits (ECD1, ECD3 et ECD9) issus respectivement d'animaux âgés de 1, 3 et de 9 ans ont été obtenus. Le rendement d'extraction le plus élevé (75%) a été obtenu à la température 38°C et à une concentration de 0,2M d'acide chlorhydrique.

La mesure de l'activité coagulante (exprimée en UP) des ECD a révélé que c'est celle provenant des extraits issus des caillettes de dromadaires les plus âgés (ECD9) qui est la plus élevée (0,360). Les autres extraits donnent 0,285 (ECD3) et 0,235 (ECD1). L'extrait adulte est aussi caractérisé par son activité protéolytique relativement faible, qui est particulièrement avantageuse en fromagerie.

La mesure du temps de floculation a permis d'affirmer qu'il y a une bonne affinité des extraits coagulants de dromadaire adultes pour le lait camelin et bovin. Les essais réalisés ont aussi montré que la réduction du temps de floculation est possible en ayant recours à ces extraits utilisés à un pH d'emprésurage voisin de 5,8 et à des températures avoisinantes 42°C.

Le suivi de la stabilité de l'extrait coagulant pendant 90 jours selon trois modes de conservation (réfrigération, congélation et lyophilisation) a montré que l'activité coagulante est mieux préservée dans les échantillons congelés (96% d'activité conservée), contre 55,3 % pour l'extrait lyophilisé et 18 % pour l'extrait réfrigéré.

Les essais de purification de l'extrait coagulant par chromatographie échangeuse d'ions sur DEA Cellulose ont révélé que la fraction active est éluée à une concentration de 0,5M de NaCl. L'activité coagulante de cette fraction purifiée a donné une valeur plus faible que celle de l'extrait brut, suggérant que l'enzyme a besoin d'un environnement « prosthétique » pour agir efficacement.

Afin d'avoir une idée sur la nature des différences pouvant être mises en évidence entre un extrait de dromadaire provenant d'un animal non sevré et celui provenant d'un animal adulte, nous avons examiné le comportement de ces extraits en électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de Dédécyl sulfate de sodium (SDS) avec ou sans β -mercaptoéthanol. Le diagramme obtenu a montré qu'il y a une différence assez nette entre les profils provenant des deux origines (jeune et âgé).

En disposant du matériel approprié, au niveau du hall technologique du Laboratoire des sciences alimentaires d'Al Ain (Emirats arabe Unis), nous avons pu fabriquer un fromage camelin de coagulation mixte en utilisant l'extrait coagulant adulte et en respectant les conditions expérimentales optimales de cet extrait. Le lait de vache a été utilisé à titre comparatif.

Le rendement fromager obtenu 17% (contre 20% pour le lait bovin) est jugé satisfaisant étant donné que le rendement rapporté par plusieurs chercheurs sur d'autres fromages, en utilisant la présure commerciale, tourne autour de 12%.

L'évaluation sensorielle effectuée par un jury de dégustateurs expérimentés a permis d'attribuer au fromage élaboré une appréciation favorable d'autant plus que l'ensemble des dégustateurs ont relevé un flaveur particulière liée à ce produit laitiers.

Cette appréciation organoleptique a été renforcée par une analyse instrumentale (analyse du profil de texture ou TPA) qui a montré que le caillé camelin diffère du caillé bovin pour tous les paramètres mesurés (dureté, élasticité, cohésion et adhésivité).

L'examen de la microstructure de ces fromages par microscopie électronique à balayage (MEB) a montré clairement que le réseau du caillé bovin est caractérisé par un espace plus ouvert, alors que le caillé camelin a une structure compacte et uniforme.

Grace à ces premiers essais de fabrication, nous avons pu montrer que le lait de dromadaire, peut bien se transformer dans les fabrications fromagères, moyennant quelques ajustement physico-chimiques mais surtout en utilisant pour la phase de coagulation des extraits enzymatiques issus de caillettes de dromadaires adultes.

Ce résultat est prometteur d'autant que la disponibilité et le coût de cette matière ne se pose pas.

Cependant, il nous paraît nécessaire de développer des approches plus exhaustives en terme d'échantillonnage, de phénotypage protéique et de caractérisation plus poussée de cet extrait coagulant avant d'envisager une utilisation industrielle à court ou à moyen terme, surtout que le potentiel de lait produit n'est pas négligeable et qu'il peut cristalliser autour de lui un personnel d'emploi non négligeable entre les techniciens fromagers et les revendeurs.

*Références
Bibliographiques*

- ABDEL-RAHIM A.G. (1987).** The chemical composition and nutritional value of camel (*Cameus dromedarius*) and goat (*Capra bircus*) milk. *World Revue of Animal Production*, **23** (1), 9-11.
- ABU-LEHIA I. H. (1987).** Composition of camel milk. *Milchwissenschaft*, **42**, 368-371.
- ABU-LEHIA I. H. (1989).** Physical and chemical characteristics of camel milk fat and its fractions. *Food Chemistry*, **34**, 261-271.
- ABU-LEHIA I. H. (1994).** Recombined camel's powder. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- ABU-TARABOUSH H. M. (1996).** Comparison of associative growth and proteolytic activity of yoghurt starters in whole milk from camels and cows. *Journal of Dairy Science*, **79**(3), 366-371.
- ADAMOU A. (2008).** L'élevage camelin en Algérie: quel type pour quel avenir ? *Secheresse*, **19**(4), 253-260
- ADAMS D. M., BARACH J. T. and SPECK M. L. (1975).** Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Dairy Science*, **6**, 828-834.
- ADRIAN J. et FRANGNE R. (1986).** Science Alimentaire. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- ADRIAN J. et FRANGNE R. (1991).** Synthesis and availability of niacin in roasted coffee. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **289**, 49-59.
- AGRAWAL R. P., BUDANIA S., SHARMA P., GUPTA R. and KOCHAR D. K. (2007a).** Zero prevalence of diabetes in camel milk consuming Raica community of northwest Rajasthan, India. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **76**, 290 -296.
- ALAIS C. (1974).** Le refroidissement du lait et son comportement en fromagerie. In : « Science du Lait », Sepaic, Paris.
- ALAIS C. (1984).** Les bactéries lactiques : les levains ; in : « Science du Lait. Principes des Techniques Laitières », Sepaic, Paris.
- AL-AWADI F.M and SRIKUMAR T.S. (2001).** Trace elements and their distribution in protein fractions of camel milk in comparison to other commonly consumed milks. *Journal of Dairy Research*, **68**(3) 463-469.
- AL-RUQAIE I.M., EL-NAHHAL H.M. and WAHDAN A.N. (1987).** Improvement in the quality of the dried fermented milk product « oggtt ». *Journal of Dairy Science*, **54**, 429-435.

- ANDREEVA N.S. and RUMSH L.D. (2001).** Analysis of crystal structures of aspartic proteinases : on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Science*, **10**, 2431-2450.
- ANDREN A. (2002).** Rennets and coagulants; In : “Encyclopedia of Dairy Science”, Roginski H., Elsevier
- ANDREN A. and DE KONING P.J. (1982).** Changes in immunologically and enzymatically active centres of some milk clotting enzymes. In : « Utilisation des enzymes en technologies alimentaires » Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- ANIFANTAKIS E. (1976).** Influence d'une présure d'agneau sur la qualité du fromage Kefalotyri. *Lait*, **551**, 76-83.
- ANONYME-1 (2009).** Atelier lait de chamelle. Rapport FAO.
- ANONYME-2 (2006).** Evolution des effectifs du cheptel de 1990 à 2005. Direction des Statistiques Agricoles, Ministère de l'Agriculture, Algérie
- ANONYME-3 (2006).** Review of the literature on pastoral economics and marketing. North Africa.
- ANONYME-4. (1980).** Lait et produits laitiers : méthodes d'analyses. Recueil des normes Françaises, 1^{ère} édition, AFNOR, Paris.
- ANONYME-5. (1993).** Contrôle de la qualité des produits alimentaires ; lait et produits laitiers. Norme Françaises, AFNOR, Paris.
- ANONYME-6. (1986).** Contrôle de qualité des produits laitiers. Recueil de normes Françaises. Paris, AFNOR.
- ANONYME-7 (1995).** Le lait et produits laitiers dans la nutrition humaine. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), Rome.
- ANSON M. L. AND MIRSKY A.E. (1932).** The estimation of pepsin with hemoglobin. *Journal of Genetic and Physiology*, **16**,59-63.
- ANTONINI J. et RIBADEAU DUMAS B. (1971).** Isolement, purification et propriétés de deux zymogènes gastriques bovins, propriétés des protéases correspondants. *Biochimie*, **53**,321-329.
- ARDALI-MAATOUK Z. (1991).** Comparaison de la composition en caséines et de l'aptitude fromagère du lait de vache et du lait de dromadaire. Thèse de Doctorat de l'INPL de Nancy, France.
- ARYANA K.J. and HAQUE Z.Z. (2005).** Texture and microflora of vallagret cheese during maturation. *International Journal of Dairy Technology*, **58** (1), 47-50

- ATTIA H., KHEROUATOU N., FAKHFAKH N., KHORCHANI T. and TRIGUI N. (2000a).** Dromedary milk fat : biochemical, microscopic and rheological characteristics. *Journal of Food Lipids*, **7**, 95-112.
- ATTIA, H., KHEROUATOU, N., NASRI, M. and KHORCHANI, T. (2000b).** Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. *Lait*, **80**, 503-515.
- AUTY M.A.E., O'KENNEDY B.T., ALLAN-WOJTAS P. and MULVIHILL D.M., (2005).** The application of microscopy and rheology to study the effect of milk salt concentration on the structure of acidified micellar casein systems. *Food Hydrocolloids*, **19**, 101-109.
- BARBANO D. M. and RASMUSSEN R. R. (1992).** Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. *Journal of Dairy Science*, **75**, 1-12.
- BARBOUR E. K., NABBUT N. H., FRERICHS W. M. and AL NAKHLI H. M. (1984).** Inhibition of pathogenic bacteria by camel's milk: Relation to whey lysozyme and stage of lactation. *Journal of Food Protection*, **47**, 838-840.
- BAYOUMI S. (1990).** Studies on composition and rennet coagulation of camel milk. *Kieler Milchwirtschaft Forschungberichte*, **42**, 3-8.
- BEERENS H. et LUQUET F. M. (1987).** Guide Pratique d'Analyse Microbiologique des Laits et Produits Laitiers. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- BEG O.U, VON BAHR-LINDSTROM H., ZAIDI Z.H. and JORNVALL H. (1985).** The primary structure of α -lactalbumin from camel milk. *European Journal of Biochemistry*, **147**, 233-239.
- BEG O.U., VAN BAHR-LINDSTROM H., ZAIDI Z.H. and JORNVALL H. (1986a)** .Characterization of a camel milk protein rich in proline identifies a new β -casein fragment. *Regulatory peptides*, **15**, 55-62.
- BEG O.U., VAN BAHR-LINDSTROM H., ZAIDI Z.H. and JORNVALL H. (1986b).** A camel milk whey protein rich in half-cystine. Primary structure, assessment of variations, internal repeat patterns and relationships with neurophysin and other active polypeptides. *European Journal of Biochemistry*, **147**, 233-239.
- BELDARRAÍN A., ACOSTA N., MONTESINOS R., MATA M., and CREMATA J. (2000).** Characterization of *Mucor pusillus* rennin expressed in *Pichia pastoris*: enzymic spectroscopic and calorimetric studies. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **31**, 77-84.
- BEN AISSA M. (1989).** Le dromadaire en Algérie. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires*, (2), 19-28.

- BENGOUMI M. 1992.** Biochimie clinique du dromadaire et mécanismes de son adaptation à la déshydratation. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, IAV Hassan II, Rabat, Maroc.
- BENGOUMI M., FAYE B. et TRESSOL J-C. (1994).** Composition minérale du lait de chamelle du sud marocain. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux, animaux laitiers", 24-26- octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- BENKERROUM N., MEKKAOUI M., BENNANI N. and HIDANE K. (2004).** Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Dairy Technology*, **57**(1), 39–43.
- BERGERE J.L. et LENOIR J. (1997).** Les accidents de fromagerie et les défauts des fromages ; in : « Le Fromage » ed. Eck, Technique et Documentation, 3^{ème} éd. Lavoisier, Paris.
- BERRIDGE N. J. (1945).** The purification and crystallization of rennin. *Biochemic Journal*, **39**, 179-186.
- BERRIDGE N.J. (1955).** Purification and assay of rennin. Methods ; in : "enzymology, 2" , ed., Perlmann G.E. and Lorand L , Acad.Press Inc., New York.
- BERRY E.D. and FOEGEDING P.M. (1997).** Temperature adaptation and growth of microorganisms. *Journal of Food Protection*, **60**, 1583- 1594
- BOHAK Z. (1969).** Purification and characterisation of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *Journal of Biological Chemistry*, **17**, 4638-4648
- BOHAK Z. (1970)** Chicken pepsinogen and chicken pepsin in "Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes". Ed., Perlmann G.E. and Lorand L , Acad. Press Inc., New York.
- BOURDIER J.F. et LUQUET F.M. (1981).** Dictionnaire Laitier. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- BRIGNON G., CHTOUROU A. and RIBADEAU-DUMAS, B (1985).** Does β -lactoglobulin occur in human milk? *Journal of Dairy Science*, **55**, 249-254.
- BROWN J.A., FOEGEDIND E.A., DAUBERT C.R., DRAKE M.A. and GRUPERTZ M. (2003).** Relationships among rheological and sensorial properties of young cheeses. *Journal of Dairy Science*, **86**, 3054-3067.
- BRULE G. et LENOIR J. (1987).** La coagulation du lait ; in: « Le Fromage » ed. Eck et Gillis, Technique et Documentation., 3^{ème} éd., Lavoisier, Paris.
- BYLER M.D., FARRELL M.H.JR. and SUSI H. (1988).** Raman spectroscopic study of casein structure. *Journal of Dairy Research*, **51**, 341-363.
- CANTISANI A., NAPOLITANO L., GIUFFRIDA M.G. and CONTI A. (1990).** Direct identification and characterisation of llama (*Lama glama L.*) whey proteins by

- microsequencing after western blotting. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **21**, 227-236.
- CARPENTER J., F., PRESTRELSKI, S., J. and ARAKAWA, T. (1993).** Separation of freezing and drying induced denaturation of lyophilized proteins using stress specific stabilization. *Archives of biochemistry and biophysics*, **303** (2), 456-464.
- CASTILLO, M., LUCEY, J.A., WANG, T. and PAYNE, F.A. (2006).** Effect of temperature and inoculum concentration on gel microstructure, permeability and syneresis kinetics cottage cheese type gels. *International Dairy Journal*, **16**, 153–163.
- CAYOT P. et LORIENT D. (1989).** Structure Techno Fonctions des Protéines du Lait. Lavoisier, Paris.
- CHANDRASENA L. G. , EMMANUEL B., and GILANPOUR H. (1979a).** A comparative study of glucose metabolism between the camel (*Camelus dromedarius*) and the sheep (*Ovis aries*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **62**, 837-840.
- CHAZARRA S., SIDRACH L., LOPEZ-MOLINA D. and RODRIGUEZ-LOPEZ J.N. (2007).** Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, **17**, 1393–1400
- CHEFTEL J.-C., CUQ J. L. et LORIENT D. (1985).** Protéines Alimentaires : Biochimie, Propriétés Fonctionnelles, Valeur Nutritionnelle et Modifications Chimiques. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- CHEHMA A. (2004).** Productivité pastorale et productivité laitière en Algérie. Lait de chamelle pour l’Afrique. FAO ; *Production et Santé Animale*, **2**, 43-51.
- CHOW R. B. and KASSELL B. (1968).** Bovine pepsinogen and pepsin. I- Isolation, purification and some properties of the pepsinogen. *The Journal of Biological Chemistry*, **243**(8), 1718-1724.
- COLLIN J.C., GRAPPIN R. et LEGREAT Y. (1977).** Etude de la méthode de mesure, selon BERRIDGE, du temps de coagulation du lait additionné d’une solution enzymatique. *Revue Laitière Française*, **355**, 389-394
- COLLOMB M., BUTIKOFER U., SPAHNI M., JEANGROS B. et BOSSET J.O. (1999).** Composition en acides gras et en glycérides de la matière grasse du lait de vache en zones de montagne et de plaines. *Sciences des Aliments*, **19**, 97-110.
- CORDESSE R., INSETA M. and GAUBERT J.L. (1992).** Intake and digestibility of four forages, by lambs and sheep. *Annales de Zootechnie.*, **41**, 91-92.
- COUSIN M.A. and MARTH E.H. (1977).** Cheddar Cheese Made from Milk that was precultured with Psychrotrophic bacteria. *Journal of Dairy Science*, **60** (7), 1048–1056.
- CREEN M.L. and FOSTER P.M.D. (1984).** Comparison of the rates of proteolysis during ripening of cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants *Journal of Dairy Research*, **41**, 269-282.

- CUVELLIER G.F. (1993).** Production des enzymes in : « Biotechnologie » ed. Coord Scriban, Technique et Documentation, 4^{ème} éd., Lavoisier, Paris.
- DAGET P. et LHOSTE P. (1995).** Ethnologie animale ; in : « Pastoralisme, Troupeaux, Espaces et Sociétés », éd., Hatier, Paris.
- DALGLEISH D.G. (1982).** The enzymatic coagulation of milk In: « Developements in dairy chemistry proteins» ed. P.F Fox, Applied Science Publishers Ltd, London et New York.
- DALGLEISH D.G. (1997).** The enzymatic coagulation of milk In: «Advanced in Dairy Chemistry proteins» ed., P.F.Fox, Blackie and Son Ltd, Scotland.
- DALGLEISH D.G. (1998).** Casein micelles as colloids: Surface, structure and stabilities. *Journal of Dairy Science*, **81**, 3013-3018
- DALGLEISH D.G. SPAGNUOLO P.A. and GOFF H.D. (2004)** A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy *.International dairy journal*, **14**, 1025-1031
- DARDILLAT C., DULPHY J.P., JOUANY J.P., KAYOULI C., LEMOSQUET S., (1994).** Comparison of in sacco degradation and physic-chemical characteristics of gastric fermentor in camelids and ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society and Physiology*, **3**, 3-21.
- DAVE R.I., MC MAHON D.J., OBERG C.J. and BROADBENT et J.R. (2003).** Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of mozzarella cheeses made using direct acidification. *Journal of Dairy Science*, **86**, 114-116.
- DELFOUR A., JOLLES J., ALAIS, C. and JOLLES P. (1965).** Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionine residue and of the N-Terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communication.*, **19**, 452-455.
- DESMAZEAUD M.J. (1990).** Les enzymes utilisées en industrie laitière ; in : « Lait et Produits Laitiers: Vaches- Brebis- Chèvre. » Technique et Documentation, 2^{ème} éd., Lavoisier, Paris.
- DESMAZEAUD M. (1997).** Les enzymes utilisées en industrie laitières ; in : « Laits et produits laitiers » ed.Coord. Luquet, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris
- DESAL H.K., PATEL J.N. and PANDYA A.J. (1982).** Composition of camel milk. *Gujarat Agricultural University Research Journal*, **2**, 131-132.
- DIALLO B. (1989).** L'élevage du dromadaire en Mauritanie. Options Méditerranéennes – Série Séminaires (02), 29-32.
- DUHAIMAN A. S. (1988).** Purification of camel's milk lysozyme and its lytic effect on E. coli and Micrococcus lysodeikticus. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **91**, 793–796.

- DULPHY J.P., JOUANY J.P., MARTAIN-ROSSET W. et THERIEZ M., (1994).** Aptitudes comparées de différentes espèces d'herbivores domestiques à ingérer et digérer des fourrages distribués à l'auge. *Annales de Zootechnie*, **43**,11-32.
- DUPAS C., ADT I., COTTAZ A., BOUTROU R., MOLLÉ D., JARDIN J., JOUVET T. and DEGRAEVE P. (2009).** A chromatographic procedure for semi-quantitative evaluation of caseinphosphopeptides in cheese. *Dairy Science and Technology*, **89**,519-529
- ECK A. et GILLIS J.C. (1997).** Le Fromage. 3^{ème} éd., Technique et Documentation, Lavoisier, Paris
- EL-ABASSY F. and WAHBA H. (1986).** Studies on camel pepsin 2-manufacture of Domiati cheese with camel pepsin. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **14**, 187-194.
- EL-AGAMY E.I. (2000a).** Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors : a comparison with cow's and buffalo. *Food Chemistry*, **68**, 227-232.
- EL-AGAMY E.I. (2000b).** Physico-chemical, molecular and immunological characteristics of camel calf rennet : a comparison with cow's and buffalo rennet. *Journal of Dairy Research*, **67**, 73-81.
- ELAGAMY E.I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C.P. and ASSAF R. (1992).** Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal of Dairy Research*, **59**, 169-175.
- EL-AGAMY E. I., NAWAR M., SHAMSIA S. M., AWAD S. and HAENLEIN G. F. W. (2009).** Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children? *Small Ruminant Research*, **82**, 1-6.
- EL-AMIN F.M. and WILCOX C.J. (1992).** Milk Composition of Majaheim camels. *Journal of Dairy Science*, **75**, 3155-3157.
- EL-BATAWY M.A., AMER S.N. and IBRAHIM S.A. (1987).** Camel Abomasum as a source of rennet substitute. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **15**, 93-100.
- EL-ZUBEIR I. E. M. and JABREEL M. S. O. (2008).** Fresh cheese from camel milk coagulated with Camifloc. *International Journal of Dairy Technologie*, **61**, 90-95.
- EMA A.N. and TULPULE S. S. (1980).** Some observations on the gross anatomy and histology of the one-humped camel (camelus dromedarius). Gastrointestinal studies. *Anatomy Histology and Embryology*, **9**, p. 180.
- EMMONS D. B., BECKETI D. C. and BINNS M. (1990a).** Milk-Clotting Enzymes. 1. Proteolysis During Cheese Making in Relation to Estimated Losses of Yield. *Journal of Dairy Science*, **73**, 2007-2015.
- EMMONS D. B. and BINNS M. (1990b).** Cheese yield experiments and proteolysis by milk-clotting enzymes. *Journal of Dairy Science*, **73**, 2028-2043.

- ERNSTROM C.A. and WONGT N.P. (1983).** Milk clotting enzymes and cheese chemistry; In : "Fundamentals on dairy chemistry" ed. B.H. Webb, A.H. Johnson and J.A. Alford, 2nd éd., the Avi publishing Company Incorporated, New York.
- ERSKINE P.T., COATES L., MALL, S., GILL, R.S, WOOD S.P. MYLES D.A. and COOPER J.B. (2003).** Atomic resolution analysis of the catalytic site of an aspartic proteinase and an unexpected mode of binding by short peptides. *Protein Science*, **12**, 1741-1749.
- EVERARD C.D., O'DONNELL C.P., O'CALLAGHAN D.J., HOWARD T.V., SHEEHAN E.M. and DELAHUNTY C.M. (2006).** Relationships between sensory and rheological measurements of texture in maturing commercial Cheddar cheese over a range of moisture and pH at the point of manufacture. *Journal of Texture Studies*, **37**, 361-382.
- FAMELART M-H., GAUVIN G., PÂQUET D. and BRULÉ G. (2009).** Acid gelation of colloidal calcium phosphate-depleted preheated milk. *Dairy Science and Technology*, **89**, 335-348
- FARAH Z. (1993).** Composition and characteristics of camel milk. *Journal of Dairy Research*, **60**, 603-626.
- FARAH Z. (1996).** Camel Milk Properties and Products. Swiss Centre for Development Cooperation in Technology and Management, SKAT, Switzerland.
- FARAH Z. and FARAH-RIESEN M. (1985).** Separation and characterization of major components of camel milk casein. *Milchwissenschaft*, **40**, 669-671.
- FARAH Z. and BACHMAN M.R. (1987).** Rennet coagulation properties of camel milk. *Milchwissenschaft*, **42**, 689-692.
- FARAH Z. and RÜEGG M. W. (1989).** The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure*, **8**, 211-216.
- FARAH Z., STRIEFF T. and BACHMANN M.R. (1989).** Manufacture and characterization of camel milk butter. *Milchwissenschaft*, **44**, 412-416.
- FARAH Z., RETTENMAIER R. and ATKINS D. (1992).** Vitamin content of camel milk. *International Journal of Vitamins and Nutrition. Research*, **62**, 30-33.
- FARRELL H.M.JR., BROWN E.M. and KUMOSINSKI T.F. (1993).** Three dimensional molecular modeling of bovine caseins. *Food Structure*, **12**, 235-250.
- FAYE B. (1997).** Guide de l'Élevage du Dromadaire. 1^{ère} Ed. (CIRAD-EMVT), Montpellier, France
- FAYE B. (2003).** Performances et productivité laitière de la chamelle : les données de la littérature. Atelier sur la filière laitière cameline en Afrique, 5-8 Novembre, Niamey.

- FAYE B. et TISSERAN D. (1988).** Problèmes de la détermination de la valeur alimentaire des forages par le dromadaire. Séminaire sur la digestion, la nutrition et l'alimentation du dromadaire, 28-29 février, Ouargla.
- FAYE B. et LOISEAU G. (2002).** Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité. Actes de l'atelier international : « Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement », 11-13 décembre, Montpellier, France.
- FEDERICI F. (1982)** Comparative study of some properties of a new milk-coagulating enzyme and two commercial rennets ; in : « Utilisation des enzymes en technologie alimentaire », Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- FERRANTI P., MALORNI A., NITTI G., LAEZZA P., PIZZANO R., CHIANESE, L. and ADDO F. (1995).** Primary structure of ovine α s1-casein : Localisation of phosphorylation sites and characterisation of genetics variants A, C, and D. *Journal of Dairy Research*, **62**, 281-296.
- FEUILLAT M. et LE GUENNEC S. (1976).** Contribution à l'étude de la protéolyse des laits réfrigérés et incidences sur le rendement d'une fabrication de fromages à pâte molle. *lait*, **558**, 521-536
- FLOURY J., ROUAUD O., LE POULLENNEC M. and FAMELART M.H. (2009).** Reducing salt level in food : Part 2. Modelling salt diffusion in model cheese systems with regards to their composition. *Food Science and Technology*, **42** (10), 1621-1628.
- FOEGEDING E.A. and DRAKE M.A. (2007).** Sensory Analysis of Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, **90**, 1611-1624.
- FOLTMAN B., PEDERSON V.B., KAUFFMAN D. and WYBRANT G. (1979).** The primary structure of calf chymosin. *Journal of Biological Chemistry*, **254**, 8447-56.
- FOLTMANN B. (1971).** The biochemistry of prorennin and rennin (chymosin), in : "Milk Proteins, Chemistry and Molecular Biology", Academic Press, New York.
- FONTOURA R., CORRALO SPADA J., TERRA SILVEIRA S., TSAI S.M. and BRANDELLI A. (2009).** Purification and characterization of a antimicrobial peptide produced by *Pseudomonas* sp. Strain 4B. *Word Journal of Microbiology Biotechnology*, **25**, 205-213.
- FOX J. H., TOPEL J. L. and HUCKMAN M. S. (1975).** Use of computerized tomography in senile dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **38**, 948-953.
- GARNIER J. and RIBADEAU DUMAS B. (1970).** Structure of the casein micelle. A proposal model. *Journal of Dairy Research*, **37** (3), 493-505
- GAST M., MAUBOIS J.L. et ADDA J. (1969).** Le lait et les Produits Laitiers au Ahaggar. Centre de Recherches Anthropologiques, Préhistoriques et Ethnologiques Paris, France.

- GAUCHERON F. (2005).** The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, **45**, 473-483.
- GAUCHER I., PIOT M., BEAUCHER E. and GAUCHERON F. (2007).** Physico-chemical characterization of phosphate- added skim milk. *International Dairy Journal*, **17**, 1375-1383.
- GLANSDORFF N. (1999).** Les bactéries venues du froid. *La recherche*, **317**, 77-80.
- GNAN S.O. and SHERIHA A.M. (1986).** Composition of Libyan camel milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, **41**, 33-35.
- GNAN S.O., MOHAMED M.O., SHEREHA A.M. and IWEGBE A.O. (1994a).** Antimicrobial activity of camel's milk. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- GORBAN A.M.S. and IZZELDIN O.M.(1997).** Mineral content of camel milk and colostrum. *Journal of Dairy Technology*, **64**, 471-474.
- GORBAN A. M. S. and IZZELDIN O. M. (1999).** Study on cholesteryl ester fatty acids in camel and cow milk lipid. *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 229-234.
- GORBAN A. M. S and IZZELDIN O. M. (2001).** Fatty acids and lipids of camel milk and colostrum. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **52**(3), 283-287.
- GORDIN S. and ROSENTHAL I. (1978)** .Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *Journal of food Protection*, **41**(9), 684-688.
- GOUDA J., EL ZAYAT A. and EL-SHABRAWY S.A. (1984).** Electron microscopy study on the size distribution of caseins micelles, fat globule membrane of camel milk. *Annals of Agricultural Science. Ain Shams University, Egypt*, **29** (2), 755-762.
- 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^{ème} éd., Lavoisier, Paris.
- GREEN M.L. and FOSTER P.M.D. (1974).** Comparison of the rates of proteolysis during ripening of cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *Journal of Dairy Research*, **41**, 269-282
- GREEN M.L., VALLER M.J. and KAY J. (1984).** Assessment of the suitability for cheddar cheese making of purified and commercial chicken pepsin preparations. *Journal of Dairy Research*, **51**,331-340.
- GROSCLAUDE F., MAHE M.F. et RIBADEAU-DUMAS B. (1973).** Structure primaire de la caséine α 1 et de la caséine β bovine. *Journal of Biochemistry*, **40**, 323-324.

- GUILLAUME B. (2006).** Étude des propriétés physico-chimiques de la lactoferrine et de son fractionnement par procédés membranaires. Doctorat en Sciences et Technologie des Aliments. Université de Laval, Québec.
- GUILLOU, H., PELISSIER, J.P., et GRAPPIN, R. (1986).** Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Lait*, **66**,143-175.
- GUIRAUD J. P. (1998).** Microbiologie Alimentaire. Dunod, Paris.
- GUYOMARC'H F., GUEGUINER C., LAW A.J.R., HORNE D.S. and DALGLEISH D.G. (2003).** Role of the soluble and micelle-bound heat-induced protein aggregates on network formation in acid skim milk gels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 7743-7750.
- HAGA M., YAMAUCHI K. and AOYAGI S. (1983).** Conformation and some properties of bovine α_2 group casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, **47**, 1467-1471.
- HAMBRAEUS L. (1982).** Nutritional aspects of milk proteins. *Journal of Food and Nutrition*, **39**, 1-13.
- HAMMADI M. (2003).** Caractérisation, modulation nutritionnelle et implication du système IGF dans la fonction de reproduction chez la chamelle (*Camelus dromedarius*). Thèse de Doctorat, Université de Gent, Belgique.
- HANNON J.A, LORTAL S., TISSIER J. and FAMELARD M.H. (2009).** Limited ripening of low-fat UF-cheese due to CaPO_4 barrier? *Dairy Science and Technology*, **89**, 555-568.
- HASSAN A.A., HAGRASS A.E., SORYAL K.A. and EL SHABRAWY S.A. (1987).** Physico-chemical Properties of camel milk during lactation period in Egypt. *Egyptian Journal of Food Science*, **15** (1), 1-14.
- HEANEY R. P. (2008).** Vitamin D and calcium interactions: functional outcomes^{1,2,3,4}. *The American Journal for Clinical Nutrition*, **88** (2), 541-544.
- HENRI L., (1987).** Chameau et dromadaire en Afrique du Nord et en Sahara. Edition office national des approvisionnements et des services agricoles (ONAPSA), Alger.
- HERRIOTT R.M. (1938).** Isolation, crystallization and properties of swine pepsinogen *Journal of Genetic and Physiology*, **21**, 501-540.
- HILL R.J. and WAKE R.G. (1969).** Amphiphile nature of κ -casein as the basis for its micelle stabilizing property. *Nature*, **221**, 635-639.

- HOAGLAND D.P., UNRUH J.J., WICKHAM E.D. and FARRELL JR.H.M. (2001).** Secondary structure of bovine α_2 -casein: theoretical and experimental approaches. *Journal of Dairy Science*, **84**, 1944-1949.
- HOLT C. (1992).** Structure and stability of bovine casein micelle. *Advanced Protein Chemistry*, **43**, 63-15.
- HORBOE M., ANDERSEN P.M. and FOLTMANN B. (1974).** The activation of bovine pepsinogene . *The journal of biological chemistry*, **249**, 4487-4491.
- HORNE D.S. (1998).** Casein interaction: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, **8**, 171-177.
- HORNE D.S. (2002a)** Caseins-molecular properties caseins micelle formation and structure ; in : « Encyclopedia of Dairy Science », Elsevier, New York.
- HORNE D.S. (2002b).** Casein structure, self assembly and gelation Current opinion. *Colloid and Interface Science*, **7**, 456-46.
- HURTAUD C., RULQUIN H., DELAITE M. AND VERITE R. (1995).** Appréciation de l'aptitude fromagère des laits de vaches individuels. Tests d'aptitude fromagère et rendement fromager de fabrication. *Annales de Zootechnie*. **44**, 385-398.
- HYNES E.R., MEINARD C.A., SABBAG N., CATTARIO T., CANDIOTI M.C. and ZALAZAR C.A, (2001)** Influence of milk clotting enzymes concentration on the α_1 -casein hydrolysis during soft cheeses ripening. *Journal of Dairy Science*, **84**, 1335-1340.
- JARDALI Z. (1994).** Comparaison de la composition en caséines et de l'aptitude fromagère du lait de vache et du lait de dromadaire. Thèse de Doctorat Vandœuvre-lès-Nancy, France.
- JENKINS T.C. (1993).** Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, **76**, 3851-3863.
- JOFFIN J.N. et LEYRAL G. (2006).** Microbiologie technique Tome 1: Dictionnaire des techniques. Collection Biologie Technique, Technique et Documentation, 4ème éd., Lavoisier, Paris.
- KAMOUN M. (1994).** Evolution de la composition du lait de dromadaire durant la lactation : conséquences technologiques. Actes du Colloque, « Dromadaires et chameaux, animaux laitiers » 24-26 octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- KAMOUN M. (1995).** Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. *Option Méditerranéenne*, **13**, 81-103.
- KAMOUN M. et BERGAOUI R. (1989).** Un essai de production et de transformation de lait de dromadaire en Tunisie. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **42**, 113-115.

- KAPPELER S., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998).** Sequence Analysis of *Camelus dromedaries* milk caseins. *Journal of Dairy Research*, **65**, 206-222.
- KAPPELER S.R., FARAH Z. and PUHAN Z. (1999a).** Alternative splicing of lactophorin mRNA from lactating mammary gland of the camel (*Camelus dromedarius*). *Journal of Dairy Science*, **82**, 2084-2093.
- KAPPELER S.R., FARAH Z. and PUHAN Z. (2003).** 5'-flanking Regions of camel milk genes are highly similar to homologue regions of other species and can be divided into two distinct groups. *Journal of Dairy Science*, **86**, 498-508.
- KARRAY-LAADHAR N. (2006).** La matière grasse de dromadaire : microstructure, composition et propriétés cristallographiques et thermiques. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de Sfax, Sfax, Tunisie.
- KARRAY N., LOPEZ C., LESEIR P. and OLLIVON M. (2004).** Dromadary milk fat : thermal and structural properties ; 1. crystalline forms obtained by slow cooling. *Lait*, **84**, 399-416.
- KARUE C. N. (1998).** The dairy characteristics of the Kenyan camel. In Bonnet P. (Ed.), Actes du colloque, Dromadaires et chameaux, animaux laitiers/Dromedaries and camels, milking animals, CIRAD Publishing, Nouakchott, Mauritania.
- KAY R.N.B. and MALOIY G.M.O. (1989).** Digestive secretions in camels. *Options Méditerranéennes, série séminaires*, **2**, 83-87.
- KAYAGEMA T. and TAKAHASHI K. (1976).** Pepsinogene and pepsin from gastric mucosa of Japanese monkey. *Journal of Biochemistry*, **79**, 455-468.
- KAYOULI C., JOUANY J.P. and BEN AMOR J. (1991).** Comparison of microbial activity in the forestomach of dromedary and the sheep measured in vitro and in sacco on mediterranean roughages. *Animal Feed Science and Technology*, **33**, 237-245.
- KAYOULI C., JOUANY J.P., DEMEYER D.I., ALI-ALI A., TAOUEB H. and DARDILLAT C. (1993).** Comparative studies on the degradation and mean retention time of solid and liquid phases in the forestomachs of dromedaries and sheep fed on low quality roughages from Tunisia. *Animal Feed Science and Technology*, **40**, 345-355.
- KEIM S. and HINRICHS J. (2003).** Rheological characteristics of milk protein gels : influence of stabilising bonds. 3rd International Symposium on food rheology and structure, 09 Fevrier, Zurich.
- KHEROUATOU N. (2004).** La micelle du lait camelin : caractérisation physico-chimique, rhéologique, biochimique et technofonctionnelle. Thèse de Doctorat, ENIS, Sfax, Tunisie,
- KIHAL M., CHEKROUN A., BENSOLTANE A., KHEROUA O. and SAIDI D. (1999).** Characterization of Algeria raw camels' milk : proteins content and native lactic acid bacteria, 1^{ères} Journées sur la Recherche Cameline, 25 au 27 mai, ITAS, Ouargla, Algerie

- KIM S. Y., GUASEKARAN S. and OLSON N.F. (2004).** Combined use of chymosine and protease from *Cryphonectria parasitica* for control of meltability and firmness of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **87**, 274-283
- KIP P., MEYER D. and JELLEMA R.H. (2006).** Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal*, **16**(9), 1098–1103.
- KNOESS K. H. (1977).** Le chameau producteur de viande et de lait. *Revue mondiale de zootechnie*. 22,39-44.
- KNOESS K.H., MAKJDUN A.J., RAFIG M. and HAFEEZ M. (1986).** Milk Production Potential of the Dromadary with special reference to the province of Penjab. *World Animal Review*, **57**, 11-21.
- KOGA D. and HAYASHI K. (1976).** Activation process of pepsinogen. *Journal of Biochemistry*, **79**, 549-558.
- KONUSPAYEVA G., LOISEAU G. et FAYE B. (2004).** La plus-value « santé » du lait de chamelle cru et fermenté: L'expérience du Kazakhstan. *Rencontre Recherche Ruminants*, **11**,47-50.
- KONUSPAYEVA G., FAYE B. and LOISEAU G. (2009).** The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data. *Journal of Food Composition and Analysis*, **22**, 9-5101.
- KONUSPAYEVA G., LEMARIE E., FAYE B., LOISEAU G. and MONTET D. (2008).** Fatty acid and cholesterol composition of camel's (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedaries* and hybrids) milk in Kazakhstan. *Dairy Science and Technology*, **88**, 327-340.
- KOUNIBA A. (2002).** Caractérisation et valorisation du lait de chamelle (tableau et figure). Institut agronomique et vétérinaire HASSAN II Rabat, Maroc
- KWAN K.K. et SKURA B.J. (1985).** Identification of Proteolytic Pseudomonads Isolated from Raw Milk. *Journal of Dairy Science*, **68**(8), 1902–1909
- LAEMMLI U. K. and FAVRE M. (1973).** Maturation of the head of the bacteriophage T4. 1. DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology*. **80**, 575-599.
- LAITIER C., CHATELIN Y.M., DOUTART E., BARRUCAND P., DUCHESNE C., MORGE S., BARRAL J., CUVILLIER D., MINARD L. et LEROUX V. (2009).** Evaluation et maîtrise de la texture des fromages frais de chèvre à coagulation lactique. *Rencontre Recherche Ruminants*, **16**, 143-146.
- LAKEMOND C.M.M. and VAN VLIET T. (2008).** Acid milk gels: the gelation process as affected by preheating pH. *International Dairy Journal*, **18**, 574-584.

- LARPENT J.P. (1997).** Analyse des croûtes de fromage ; in : « Microbiologie Alimentaire ». Technique et Documentation, 1^{ère} éd., Lavoisier, Paris.
- LARPENT J.P., COPIN M.P., GERMONVILLE A., JACQUET M. et THETAS J.L. (1997).** Microbiologie du lait et des produits laitiers ; in : « Microbiologie Alimentaire ed. Larpent, Technique et Documentation, 1^{ère} Ed., Lavoisier, Paris.
- LARSSON K.I., ANDREN A., GEURTST J., DE ROOS A.L. and WALSTRA P. (1997).** Association of chymosine with artificial casein micelles as influenced by micelle composition and pH. *International Dairy Journal*. **7**, 43-46.
- LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. and MOHAMED M.A., (1986).** Analysis of the casein content in camel (*Camelus dromedaries*) milk. *Swedish Journal of Agriculture Research*, **13**, 16-18.
- LARSSON-RAZNIKIEWICZ M., MOHAMED M.A., (1998).** Camel's (*Camelus dromedaries*) milk: properties important for processing procedures and nutritional value. Actes du Colloque : «Dromadaires et chameaux animaux laitiers», 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- LASNAMI K. (1986).** Le dromadaire en Algérie, perspective d'avenir. Thèse de Magister en Sciences agronomique, Institut National Agronomique d'El-Harrach. Alger.
- LAW A.J.R., BANKS J.M., HORNE D.S., LEAVER J., WEST I.G. (1994).** Denaturation of the whey protein in heated milk and their incorporation into Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, **49**, 63–67.
- LECLERCQ-PERLAT M.N., BUONO F., LAMBERT D., LATRILLE E., SPINLER H.E., CORRIEU G. (2004).** Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *Journal of Dairy Research*, **71**, 346–354.
- LEFEBVRE-CASES E., GASTALDI E., VIDAL V., MARCHESSEAU S., LAGAUDE A., CUQ J.L. and TARODO DE LA FUENTE B. (1998).** Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. *Journal of Dairy Science*, **81**, 932-938.
- LE GRAET Y. AND BRULE G. (1993).** Les équilibres minéraux du lait : influence du pH et de la force ionique. *Lait*, **73**, 51-60.
- LERICHE V. D., CHASAING B. , CARPENTIER B. (1999).** Behavior of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, **51**, 169-182.
- LÖNNERDAL B. (1985).** Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *American Journal of Clinial Nutrition*. **42**, 1299-1317.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951).** Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, **193**, 265-275.

- LUCEY J.K. (2002)** .Rennet coagulation of milk; in : « Encyclopedia of Dairy Science ». Elsevier, New York.
- LUCEY J.L. and FOX P.F. (1993)**. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. *Journal of Dairy Science*, **76**, 1714-1724.
- LUCEY J.A. and SINGH H. (1998)**. Formation and physical properties of acid milk gels. *Food Research International*, **30** (7), 529-542.
- LUCEY J.A., JOHNSON M.E. and HORNE D.S. (2003)**. ADSA invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, **86**, 2725-2743
- MAGJEED N.A. (2005)**. Corrective effect of milk camel on some cancer biomarkers in blood of rats intoxicated with a flatoxin B1. *Journal of the Saudi Chemical society*, **9** (2), 253–263
- M., BOULARES M., BEN MOUSSA O., KAROUI R. and HASSOUNA M. (2012)**. The effect of refrigerated storage of raw milk on the physicochemical and microbiological quality of Tunisian semihard Gouda-type cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, **65** (2), 250–25.
- MARCHIN S., PUTAUX J.L., PIGNON F. and LÉONIL J. (2007)**. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by Cryo-TEM and SAXS/USAXS". *The Journal of Chemical Physics*, **126**, 95-101.
- MASLE I. et MORGAN F. (2001)**. Aptitude du lait de chèvre à l'acidification par les ferments lactiques - Facteurs de variation liés à la composition du lait. *Lait*, **81**,561-569.
- MATIEU J. (1998)**. Initiation à la physicochimie du lait, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- MAUBOIS J. L et BRULE G. (1982)**. Modification de la teneur en protéines du lait de fabrication. *Lait*, **62**, 351-373
- MCMAHON D.J. and BROWN R.J. (1990)**. Developpement of surface functionality of casein particles as the controlling parameter of enzymic milk coagulation. *Colloids and Surfaces*, **44**, 263-279.
- MEHAIA M.A. (1987c)**. Studies on camel milk casein micelles; treatment with soluble and immobilized chymosin. *Milchwissenschaft*, **42**, 706-708.
- MEHAIA M.A. (1992)**. Studies on camel milk coagulation using soluble and immobilized pepsin. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **20**, 31-40.
- MEHAIA M. A. (1993a)**. Fresh soft white cheese (Domiaty-Type) from camel milk: composition, yield, and sensory evaluation. *Journal of Dairy Science*, **76**, 2845-2855.

- MEHAIA M.A. (1993b).** Composition, yield and organoleptic evaluation of the fresh Domiati cheese made from a mixture of camel and cow Milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, **48**, 74-77.
- MEHAIA M.A. (1994b).** Vitamin C and riboflavin content in camels milk: effects of heat treatments. *Food Chemistry*, **50**, 153-155.
- MEHAIA M.A. (1994c).** Effect of milk and calcium concentration and pH on rennet coagulation time of UF camel milk. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **22**, 297-306.
- MEHAIA M.A. and AL-KANHAL M.A. (1989).** Studies on camel and goat milk proteins: Nitrogen distribution and amino acid composition. *Nutrition Reports International*, **39**, 351-357.
- MEHAIA M.A., HABLAS M.A., ABDEL-RAHIM K.M. and MOUGY S.A. (1995).** Milk composition, Wada and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food chemistry*, **52**, 115-122.
- MERCIER J.C., GROSCLAUDE F. et RIBADEAU-DUMAS B. (1971).** Structure primaire de la caséine α S1 B bovine. Séquence complète. *European Journal of Biochemistry*, **23**, 41-51
- MERCIER J.C., GROSCLAUDE F. et RIBADEAU-DUMAS B. (1973).** Structure primaire de la caséine κ bovine. Séquence complète. *European Journal of Biochemistry*, **35**, 222-235.
- MICHAEL ESKIN N.A. (1990).** Biochemistry of food, 2nd edition, Academic press, New York
- MIETON B., GAUCHERON F. et SALAUN MICHEL F., (2004).** Minéraux et Produits Laitiers. Editions Technique et Documentation Lavoisier, Paris.
- MIETTON B., DESMAZEAUD M., DE ROISSARD H. et WEBER F. (1994).** Transformation du lait en fromage; in : « Bactéries lactiques II » Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- MILLIERE J. B. et VEILLET-PONCET L. (1979).** Détermination de la flore bactérienne caséolytique psychrotrophe des laits crus réfrigérés. *Lait*, **59**, 581-582.
- MIRANDA G. et GRIPON J.C. (1986)** Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait. *Lait*, **66** (1), 1-18.
- MOHAMED M.A. (1990).** Characterization of casein and preliminary trial of cheese-making properties. Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Sweden.
- MOHAMED M.A., MURSAL,A.I. and LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. (1989).** Separation of a camel milk casein fraction and its relation to the coagulation properties of fresh milk. *Milchwissenschaft*, **44**, 278-280.
- MOHAMED M.A., LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. and MOHAMED M.A. (1990).** Hard cheese making from camel milk. *Milchwissenschaft*, **45**, 716-718.

- 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.
- N'POUNA H. (1982).** Etat de quelques oligo-éléments (Fe, Mn, Zn, Cu) dans certains types de sols du Hodna (wilaya de M'sila). Thèse ingénieur en agronomie, Institut National Agronomique d'Alger, 1-45.
- NAJERA A.J., et RENOBALLES M. and BARRON L.J.R. (2003).** Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet clotting properties of milk; a multifactorial study. *Food Chemistry*, **80**, 345-352.
- O'KEEFFE A.M., FOX P.F and DALY C. (1976).** Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, **43**, 97-107.
- O'KEEFFE A.M., FOX P.F and DALY C. (1978).** Proteolysis in cheddar cheese: Role of coagulant and starter bacteria. *Journal of Dairy Research*, **45**, 465-477.
- OCHIRKHUYAG B., CHOBERT, J.M., DALGALARRONDO, M., CHOISSET, Y. and HAERTLE, T. (1997).** Characterization of caseins from Mongolian Yak, Khainak and Bactrian camel. *Lait*, **77**, 601-613.
- OCHIRKHUYAG, B., CHOBERT, J.M., DALGALARRONDO, M., CHOISSET, I.Y. and HAERTLE, T. (1998).** Characterization of whey proteins from Mongolian Yak, Khainak, and Bactrian Camel. *Journal of food Biochemistry*, **22**, 105-124.
- ONO T. and OBATA T. (1989).** A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits. *Journal of Dairy Research*, **56**, 453-461.
- ÖZER HB, ROBINSON R.K. and GRANDISON A.S. (2003).** Textural and microstructural properties of urfa cheese (a white-brined Turkish cheese). *International Journal of Dairy Technology*, **56** (3), 171-176.
- PAYENS T.A. (1989).** The enzyme- triggered coagulation of casein micelles. *Advances in Colloid and interface Science*, **30**, 31-69
- PETRANSXIENE D. et LAPIED L. (1981).** La Qualité Bactériologique du Lait et des Produits Laitiers : Analyses et Tests. Technique et documentation, Lavoisier, Paris.
- PIGNON F., BELINA G., NARAYANAN T., PAUBEL X., MAGNIN A. and GÉSAN-GUIZIOU G. (2004).** Structure and rheological behavior of casein micelle suspensions during ultrafiltration process. *The Journal of Chemical Physics*, **121**(16), 8138-8146.
- POULIOT M., POULIOT Y., BRITTEN M., MAUBOIS J.L. and FAUQUANT J. (1994).** Study of the dissociation of β -casein from native phosphocaseinate. *Lait*, **74**, 325-332.
- QUAN S., TSUDA, H. and MIYAMOTO T. (2008).** Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130B4 from

- camel milk in Inner Mongolia, China. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **88**, 2688-2692.
- RAMCHANDRAN L. and SHAH N. P. (2009).** Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic, angiotensin-I-converting enzyme and α -glucosidase-inhibitory activities as well as on textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *Dairy Science and Technology*, **89**, 583–600.
- RAMET J.P. (1985).** Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudia-Arabia. Mission Report, FAO.
- RAMET J.P. (1987).** La préparation du caillé, in : « Le Fromage » ed. Eck, 2^{ème} édition Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- RAMET J.P. (1989).** L'aptitude fromagère du lait de dromadaire. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **42**, 105- 111.
- RAMET J.P. (1990).** Processing of Dairy Production from Camel Milk. Mission Report, FAO.
- RAMET J.P. (1991).** La transformation en fromage du lait de dromadaire. *Revue Mondiale de Zootechnie*, **67**, 21-28.
- RAMET J.P. (1993).** La technologie des fromages au lait de dromadaire (Camelus dromedarius). Etude FAO, production et santé animale, 113, Rome.
- RAMET J.P. (1994).** Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication de fromage au lait de dromadaire. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- RAMET J.P. (1997).** Les agents de la transformation du lait ; in : « Le fromage » éd. Eck et Gillis. Technique et Documentation, 3^{ème} éd., Lavoisier, Paris.
- RAO M. B., TANKSALE A.M., GHATGE M. S, and DESHPANDE V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**(3), 597-635.
- RASHED M.N. (1994).** Trace elements in camel's milk from Aswan city and desert (Egypt). Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre 1994, Nouakchott, Mauritanie,
- RASMUSSEN L.K., HOJRUP P. and PETERSEN T.E. (1992).** Localisation of two interchain disulfide bridges in dimmers of bovine α 2-casein. Parallel and antiparallel alignments of the polypeptides chains. *Europeen Journal of Biochemistry*, **203**, 381-386.
- RESTANI P., GAIACHI A., PLEBANI A., BERATTA B., CAVAGNI G., FIOCCHI A., POIESI C., VELONA T., UGAZIO A.G. and GALLI C.L. (1999).** Cross reactivity between milk proteins from different animal species. *Clinical and Experimental Allergy*, **29**, 997-1004.

- RIBADEAU-DUMAS B. and GARNIER J. (1970).** Structure of the casein micelle. The accessibility of the subunits to various reagents. *Journal of Dairy Research*, **37**, 269-278.
- RIBADEAU-DUMAS B. and GRAPPIN R. (1989).** Milk protein analysis. *Lait*, **69**, 357-416.
- RIBADEAU-DUMAS B., BRIGON G., GROSCLAUDE F. and MERCIER J.C. (1972).** Structure primaire de la caséine α_2 et β bovines. Séquence complète. *European Journal of Biochemistry*, **25**, 505-514.
- RICHARD D., HOSTE C. and PEYRE DE FABREGUES B. (1984).** Le dromadaire et son élevage. Cirad-Iemvt, Maisons-Alfort, France.
- RICHARDSON G.H. (1975).** Dairy industry in: "Enzymes in food Processing"; G. Reed ,2nd edition, Academic press, New York.
- RICHOUX R., AUBERT L., NORMAND M., PRIVAT P. and IBARRA D. (2009).** Influence of cryogenic cooling of cheese curd on yield and quality of semi-hard cheeses. *Dairy Science and Technology*, **89**, 177–185.
- RICHTER C., TANAKA T. and YADA R.Y. (1998).** Mecanism of activation of the gastric aspartic proteinases : pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochemistry Journal*, **335**,481-490
- RODIER J. (1984).** Les analyses de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 7^{ème} éd., Bordas, Paris.
- ROEFS S.P.F.M. and VAN VLIET T. (1990).** Structure of acid casein gels 2. Dynamic measurements and type of interaction forces. *Colloids and Surfaces*, **50**, 161-175
- ROSS R. P., STANTON C., HILL C., FITZGERALD G.F. and COFFEY A. (2000).** Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science & Technology*, **11**, 96 - 104.
- RUTAGWENDA T, LECHNER-DOLL M. , SCHWARTZ H.J , SCHULTKA W. and VON ENGELHARDT W. (1990).** Dietary preference and degradability of forage on a semi-arid thornbush savannah indigenous ruminants, camels and donkeys. *Animal Feed Science and Technology*, **35**, 179-192.
- SAIMA I., ARAIN M. A., KHASKHELI M. and MALIK A. H. (2003).** Study on the effect of processing on the chemical quality of soft unripened cheese made from camel milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, **2** (2), 102- 105.
- SALEY M. (1993).** La Production Laitière du Dromadaire. CIRAD, Ed Maison-Alfort, Paris.
- SANNY C.G., HARTSUCK J.A., and TANG G. (1975).** Conversion of pepsinogen to pepsin *The Journal of Biological Chemistry*. **250**(7), 2635-2639.

- SAWAYA W. N., KHALIL J. K., AL-SHALHAT A. and AL-MOHAMMAD H. (1984).** Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *Journal of Food Science*, **49**, 744-747.
- SCHMIDT-NIELSEN K. (1964).** Desert Animals: Physiological Problems of Heat and Water. Clarendon Press, Oxford.
- SCHMIDT D. (1980).** Colloïdal aspects of casein. *Netherland Milk Dairy Journal*, **34**, 42-64.
- SCHMIDT D.G. (1982).** Association of caseins and casein micelle structure. In Developments of Dairy Chemistry-1. Proteins. Applied Science Publishers, London and New York.
- SEPULVIDA P., MARCINISZUN J., IANE LIU J.R. and TANG D J. (1975).** Primary structure of porcine pepsin III-Amino acid sequence of a cyanogen bromide fragment, CB2A and the complete structure of porcine pepsin. *Journal of Biological Chemistry*, **250** (13), 5082-5088.
- SHAMET K.M., BROWN R. J. and Mc MAHON D.J. (1992).** Proteolytic activity of some milk clotting enzymes on caseins. *Journal of Dairy Science*, **75**(6), 1373-1379.
- SHARMANOV T. and ZHANGABYLOV K. (1991).** Medicinal Properties of Koumis and Shubat). Gylym, Moscou,
- SHARMANOV T.S., KADYROVA R.K., SHLYGINA O.E. and ZHARKSYLKOVA R.D. (1978).** Changes in the indicators of radioactive isotope studies of the liver of patient with chronic hepatitis during treatments with whole camel's milk and mare's milk. *Voprosy Pytaniya*, **1**, 9-17.
- SIBOUKEUR O., MATI A. et HESSAS B. (2005).** Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camelin (*camelus dromedarius*) : utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. *Cahiers Agricultures*, **5**, 473-478.
- SIDIKOU I.D., REMY B., HORNICK J.L., LOSSON B., DUQUESNOY N., YENIKOYE A. et BECKERS J. F. (2005).** Le pepsinogène et la prochymosine des bovins : connaissances actuelles, applications et perspectives dans la stratégie de lutte contre les verminoses gastrointestinales. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **149**, 213-228.
- SMITHWELL N. (1995).** Psychrotrophic bacteria in pasteurized milk : problems with shelf life. *Australian Journal of Dairy Technology*, **50**, 28-31.
- SOUSA M.J. and MALCATA F.X. (2002).** Advances in the role of a plant coagulant (*Cuanara cardanculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait*. **82**,151-170.
- SOUSA M.J., ARDO Y. and MCSWEENEY P.L.H. (2001).** Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Journal of Dairy Science*, **11**, 327-345.

- ST-GELAIS D. et TIRARD-COLLET P. (2002).** Fromage, in : « Science et technologie de la transformation du lait », coordonnateur Vignola C.C, Fondation de technologie laitière du Québec.
- TANFORD C. (1968).** Protein denaturation, in : “Advances in Protein Chemistry”. Anfinsen, Academic Press, New-York.
- TCHORBANOV B. and LLIEV I. (1993).** Limited enzymatic hydrolysis of casein in the presence of ethanol. *Enzyme Microbial and Technology*, **15**, 974-978.
- TEJADA L., ABELLÁN A., CAYUELA J.M., MARTÍNEZ- CACHA A., FERNÁNDEZ-SALGUERO J. (2008).** Proteolysis in goats’ milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*, **18**,139–146.
- THOMAS S. B. and THOMAS B. F. (1973).** Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk collected raw milk. *Dairy Industry*, **38** (1), 11-15.
- THOMPSON M.P., TARASSUK N.P., JENNESS R., LILLEVIK H.A., ASHWORTH V.S. and ROSE D. (1965).** Nomenclature of the proteins of cow’s milk. Second revision. *Journal of Dairy Science*, **48**, 159-169.
- THOUVENOT C. (1997).** Le fromage et le lait, in : «Le Fromage » ed. Eck 3^{ème} éd., Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- TITAOUINE M., (2006).** Considération zootechnique de l'élevage du dromadaire dans le Sud-est algérien : Influence du sexe et de la saison sur certains paramètres sanguins. Thèse de Magister en sciences vétérinaires. Faculté des Sciences Vétérinaires, Université de Batna, Algérie.
- TOPISIROVIC L., KOJIC M., FIRA D., GOLIC N., STRAHINIC I. and LOZO J. (2006).** Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **112**, 230-235.
- TRANCOSO I., ROSEIRO L., B. MARTINS A P.L. and TRANCOSO M.A. (2009)** Validation and quality assurance applied to goat milk chemical composition: Minerals and trace elements measurements. *Dairy Science and Technology*, **89**, 241–256.
- TRUJILLO A.J., GUAMIS B., LAENCINA J. and LOPEZ M.B. (2000).** Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. *Food chemistry*, **71**, 449-457.
- TUBESHA Z .A. and AL-DELAIMY K.S. (2003).** Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolated of *Mucor*. *International Journal of Dairy Technology*, **56**(4), 237-241.
- VALLENAS A., CUMMINGS J. F. and MUNNELL J. F. (1971).** Agross study of the compartementalized stomach of two new world camelids, the lama and guanaco. *Journal of Morphology*, **134**, 399-424.

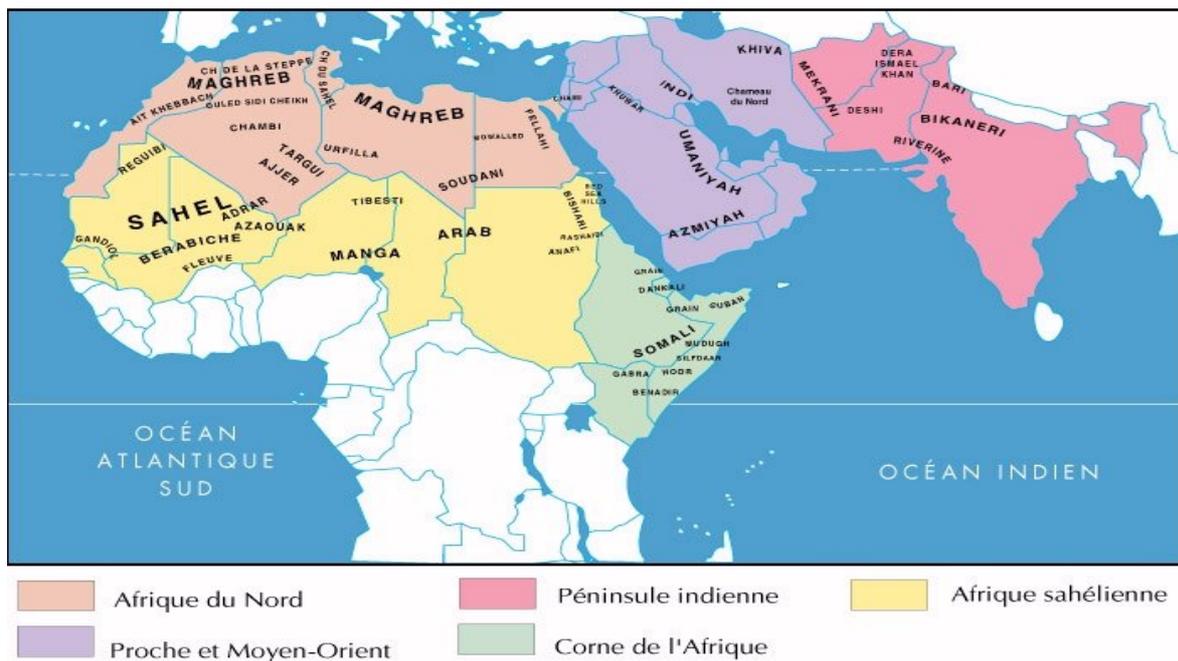
- VALLES E. et FURET J.P. (1977).** Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine ; méthodes d'extraction. *Lait*, **61**, 601-617.
- VEILLET-PONCET L (1974).** La flore bactérienne indologène aéro-anaérobie des laits pasteurisés conditionnés (cas particulier *d'Aeromonas*). *Lait*, **54**, 537-552.
- VERON M. (1987).** Pseudomonadaceae ; in : « Bactériologie médicale » ed. Le minor L., Médecine-Sciences, Flammarion, Paris.
- VESSELY C. R., CARPENTER J.F. AND SCHWARTZ D. K. (2005).** Calcium-Induced Changes to the Molecular Conformation and Aggregate Structure of β -Casein at the Air-Water Interface. *Biomacromolecules*, **6** (6), 3334-3344.
- VIA FRANCK S.G., BONFOH B., GARBA M., ILOU I., KAMIL H. et FAYE B. (2003).** Valorisation du lait de chamelle au Sahel : Opération "fromages camelins" dans le Tadsit (Niger) et à Tombouktou (Mali). Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger.
- VILOTTE S.L. and SOULIER S. (1992).** Isolation and characterization of the mouse **alpha-lac** encoding gene: interspecies comparison, tissue-and stage-specific expression. *Genetic*, **119**, 287- 292.
- WALSTA P. (1990)** .On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, **73**, 1965-1979.
- WALSTRA P., (1999).** Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, **9**, 189-192.
- WALSTRA P., BLOOMFIELD V.A., WEL G J, and JENNESS R. (1981).** Effect of chymosin action on the hydrodynamique diameter of casein micelles. *Biochimica and Biophysica Acta*, **669**, 258-259.
- WANGO J., FARAH Z. and PUHAN Z. (1993).** Extraction of rennet and its comparison with calf rennet extract. *Milchwissenschaft*, **48**, 322-325.
- WANGO J., FARAH, Z and PUHAN Z. (1998).** Composition of milk from three camel (*Camelus dromedarius*) breeds in Kenya during lactation. *Milchwissenschaft*, **53**, 136-139.
- WAUGH D. F., SLATTERY C.W., CREAMER L. K. (1971).** Binding of cations to caseins. Site binding, Donnan binding, and system characteristics. *Biochemistry*, **10** (5), 817-823
- WILKINSON M.G. et KILCAWLEY K.N (2004).** Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy journal*, **15**, 817-830.

- WONGT. N.P. (1983).** Cheese chemistry in fundamentals of dairy chemistry. The Avi Publishing Company Inc. 2nd Edition, New York.
- XINHUI ZHAO et XIAOTING ZHENG (2009).** A primary study on texture modification and proteolysis of mao-tofu during fermentation. *African Journal of Biotechnology*, **8**(10), 2294-2300.
- YAGIL R. (1982).** Camels and Camel Milk. FAO, *Animal Production and Health*, **26**, 1-69.
- YAGIL R. (1985).** The Desert camel; comparative physiological adaptation. Ed Karger, Basal.
- YAGIL R. and ETZION Z. (1980).** Effect of drought condition on the quality of camel milk. *Journal Dairy Research*, **47**, 159-166.
- YAGIL R., SARAN A. and ETZION Z. (1984).** Camel milk for drinking only. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **78**, 263-266.
- YAGIL R., ZAGORSKI O. and VAN CREVELD C. (1994).** Science and Camel's Milk Production. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- YAMAMOTO A. (1975).** Proteolytic enzymes; in : "Enzymes in food processing", Reed G. 2nd Edition,. Academic Press. New York.
- ZALAZAR, C.A, (2001).** Influence of milk clotting enzymes concentration on the α s1-casein hydrolysis during soft cheeses ripening. *Journal of Dairy Science*. **84**, 1335-1440.
- ZIA-UR-RAHMAN and STRATEN M. V. (1998).** Milk production and composition in lactating camels injected with recombinant bovine somatotropin. Actes du colloque, « Dromadaires et chameaux, animaux laitiers » 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

Annexes

Annexe 01: Localisation de dromadaire dans le monde (carte CIRAD-EMVT, 1999)

Localisation des principales races de dromadaires



Annexe 02: Aires de distribution du dromadaire en Algérie. (Sources : BEN AISSA, 1988)



Annexe n° 03: Attribution de noms relatifs à l'âge du dromadaire chez les nomades (LASNAMI K., 1986).

AGE (ANS)	APPELLATION		CARACTERISTIQUE
	FRANÇAIS	ARABE	
01	Le houar	حوار	Le chameleon tête encore sa mère
02	L'ibn Makhad	ابن ماخذ	Tête mais complète sa ration en broutant
03	L'idn Laboun	ابن لبون	Ne tête plus, reste près de sa mère
04	Le Hag (ou le Hig)	الحاق	Il a son format d'adulte. La femelle commence à rechercher le mâle.
05	Le Jedaâ	جدعي	Il perd ses dents de lait.
06	Le Theni	ثاني	Il a 2 dents adultes à la mâchoire inférieure.
07	Le Rebaâ	ربعة	Il a 4 dents adultes
08	Le Sedassi	سدسي	Il a 6 dents adultes
09	Le Garaâ	قرعي	IL a 2 crochets à la mâchoire supérieure.

Annexe 04 : Caractéristiques de quelques plantes consommées par le dromadaire (ANONYME, 1965)

Nom	Saison de consommation				Sol	Famille	Plante annuelle vivace
	Print	Été	Aut.	Hiver			
(<i>Atriplex halimus</i>) Guettaf القطاف		X	X	X	Salé	Salsolacées	vivace
(<i>Artemisia herba alba</i>) Chih الشيح		X	X	X	Limoneux rocailleux	Composées	vivace
(<i>Stipa tenacissima</i>) Halfa الحلفاء			X	X	Sablo-limoneux	Graminées	vivace
(<i>Aristida pungens</i>) Drin الدرين		X	X	X	Sableux	Graminées	vivace
(<i>Astragalus armatus</i>) Kedad القداد		X	X	X		Papillonacées	vivace
(<i>Anabasis articulata</i>) Adjrem العجرم					Salé	Salsolacées	vivace
(<i>Lygeum sportum</i>) Sennagh /لسناخ			X	X	Souvent momeux	Graminées	
(<i>Pistachia atlantica</i>) Bettoum البطم = Pistachier		X	X		Lit d'oued (rocailleux)	therebentacées	vivace
(<i>Ziziphus lotus</i>) Sderre السدررة = Jujubier		X	X	X	Lit d'oued (rocailleux)	Rhamnacées	vivace
(<i>Arthrophytum</i>) Remth الرمث							
(Surtout <i>Diplataxis</i>) Acheb العشب	X					Crucifères	annuelle

Annexe 05 : Exemple d'une fiche de renseignement utilisée dans cette étude

A/ Auprès de l'éleveur

Date : 10/0 5/2009.

Localisation : Ouargla.

Race(population) : SAHRAOUI.

Effectif : 515.

Nombre de mâles : 73.

Nombre de femelles : 442.

Nombre de femelles ayant mis bas : 127.

Epoque de mis bas : Mars à Avril 2009.

Age moyen du troupeau : de 5 mois à 31an.

Type d'élevage : extensive.

Alimentation : pâturage naturel.

Abreuvement : **En été :** 1jour sur deux.

En Hiver : tout les 10-15 jours.

Etat sanitaire : bon

Vaccination : 1 fois/an.

Consultation vétérinaire : 1 fois/an.

Production laitière :

Quantité du lait / jour : 5-7 litres/chamelle.

Nombre de traites /jour : 2 fois.

Destination du lait : consommation à l'état frais.

B/ Au niveau de l'abattoir communal

Age de l'animal : 9ans

Sexe : male

Localisation : Ouargla.

Type d'élevage : extensive.

Alimentation : pâturage naturel.

Vaccination : 1 fois/an.

Etat sanitaire : bon

Race (population) : Sahraoui.

Annexe 06 : Structure primaire des caséines (α s1, α s2, β , κ) du lait de dromadaire (Kappeler *et al.*, 1998).

Caséine α s1

ArgProLysTyrProLeuArgTyrProGluValPheGlnAsnGluProAspSerIleGlu
GluValLeuAsnLysArgLysIleLeuGluLeuAlaValValSerProIleGlnPheArg
GlnGluAsnIleAspGluLeuLysAspThrArgAsnGluProThrGluAspHisIleMet
GluAspThrGluArgLysGluSerGlySerSerSerSerGluGluValValSerSerThr
ThrGluGlnLysAspIleLeuLysGluAspMetProSerGlnArgTyrLeuGluGluLeu
HisArgLeuAsnLysTyrLysLeuLeuGlnLeuGluAlaIleArgAspGlnLysLeuIle
ProArgValLysLeuSerSerHisProTyrLeuGluGlnLeuTyrArgIleAsnGluAsp
AsnHisProGlnLeuGlyGluProValLysValValThrGlnProPheProGlnPhePhe
GlnLeuGlyAlaSerProTyrValAlaTrpTyrTyrProProGlnValMetGlnTyrIle
AlaHisProSerSerTyrAspThrProGluGlyIleAlaSerGluAspGlyGlyLysThr
AspValMetProGlnTrpTrp

Caséine α s2

LysHisGluMetAspGlnGlySerSerSerGluGluSerIleAsnValSerGlnGlnLys
PheLysGlnValLysLysValAlaIleHisProSerLysGluAspIleCysSerThrPhe
CysGluGluAlaValArgAsnIleLysGluValGluSerAlaGluValProThrGluAsn
LysIleSerGlnPheTyrGlnLysTrpLysPheLeuGlnTyrLeuGlnAlaLeuHisGln
GlyGlnIleValMetAsnProTrpAspGlnGlyLysThrArgAlaTyrProPheIlePro
ThrValAsnThrGluGlnLeuSerIleSerGluGluSerThrGluValProThrGluGlu
SerThrGluValPheThrLysLysThrGluLeuThrGluGluGluLysAspHisGlnLys
PheLeuAsnLysIleTyrGlnTyrTyrGlnThrPheLeuTrpProGluTyrLeuLysThr
ValTyrGlnTyrGlnLysThrMetThrProTrpAsnHisIleLys

Caséine β

ArgGluLysGluGluPheLysThrAlaGlyGluAlaLeuGluSerIleSerSerSerGlu
GluSerIleThrHisIleAsnLysGlnLysIleGluLysPheLysIleGluGluGlnGln
GlnThrGluAspGluGlnGlnAspLysIleTyrThrPheProGlnProGlnSerLeuVal
TyrSerHisThrGluProIleProTyrProIleLeuProGlnAsnPheLeuProProLeu
GlnProAlaValMetValProPheLeuGlnProLysValMetAspValProLysThrLys
GluThrIleIleProLysArgLysGluMetProLeuLeuGlnSerProValValProPhe
ThrGluSerGlnSerLeuThrLeuThrAspLeuGluAsnLeuHisLeuProLeuProLeu
LeuGlnSerLeuMetTyrGlnIleProGlnProValProGlnThrProMetIleProPro
GlnSerLeuLeuSerLeuSerGlnPheLysValLeuProValProGlnGlnMetValPro
TyrProGlnArgAlaMetProValGlnAlaValLeuProPheGlnGluProValProAsp
ProValArgGlyLeuHisProValProGlnProLeuValProValIleAla

Caséine κ

GluValGlnAsnGlnGluGlnProThrCysPheGluLysValGluArgLeuLeuAsnGlu
LysThrValLysTyrPheProIleGlnPheValGlnSerArgTyrProSerTyrGlyIle
AsnTyrTyrGlnHisArgLeuAlaValProIleAsnAsnGlnPheIleProTyrProAsn
TyrAlaLysProValAlaIleArgLeuHisAlaGlnIleProGlnCysGlnAlaLeuPro
AsnIleAspProProThrValGluArgArgProArgProArgProSerPheIleAlaIle
ProProLysLysThrGlnAspLysThrValAsnProAlaIleAsnThrValAlaThrVal
GluProProValIleProThrAlaGluProAlaValAsnThrValValIleAlaGluAla
SerSerGluPheIleThrThrSerThrProGluThrThrThrValGlnIleThrSerThr
GluIle

Annexe 07 : Composition en acides aminés (en %) des caséines du lait de chamelle et de vache (LARSSON-RAZNIKIEWICZ et MOHAMED, (1986)

Acide Aminé	Caséine β		Caséine κ		Caséine α s1		Caséine α s2	
	chamelle	Vache	chamelle	vache	chamelle	Vache	chamelle	Vache
Ala	2,9	2,4	4,8	8,3	3,0	4,5	2,9	3,9
Arg	1,9	1,9	2,7	3,0	4,9	3,0	1,8	2,9
Asp	3,8	4,3	6,2	7,1	9,1	7,5	6,5	8,7
Cys	0,0	0,0	0,6	1,2	0,0	0,0	1,0	1,0
Glu	19,5	18,7	17,7	16,0	20,9	19,6	21,8	19,3
Gly	1,2	2,4	2,2	1,2	2,3	4,5	1,9	1,0
His	1,8	2,4	1,9	1,8	2,3	2,5	2,7	1,4
Ile	5,7	4,8	6,9	7,1	6,2	5,5	5,3	5,3
Leu	10,8	10,5	7,2	4,7	8,0	8,5	5,1	6,3
Lys	5,9	5,3	5,6	5,3	7,3	8,0	10,6	11,6
Met	2,9	2,9	1,5	1,2	1,7	2,5	1,6	1,9
Phe	3,8	4,3	3,6	2,4	2,7	4,0	5,1	2,9
Pro	18,3	16,7	14,4	11,8	8,4	8,5	5,1	4,8
Ser	6,1	7,7	6,3	7,7	8,0	8,0	6,7	8,2
Thr	5,0	4,3	7,1	8,9	4,9	2,5	8,0	7,2
Tyr	2,5	1,9	3,6	5,3	4,6	5,0	5,7	5,8
Trp	0,0	0,5	0,7	0,6	1,0	1,0	2,2	1,0
Val	8,0	9,1	7,1	6,5	4,8	5,5	6,1	6,8

Annexe 08 : Estomac complet d'un dromadaire (1) ; la caillette de dromadaire (2)



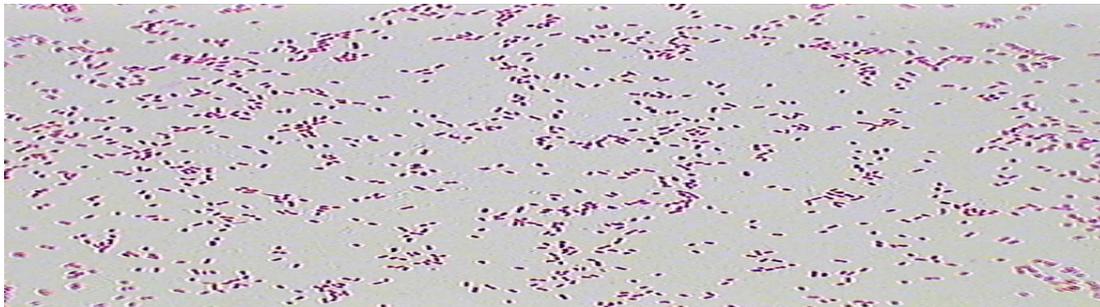
1) Estomac complet de dromadaire

2) Caillette de dromadaire

Annexe 09: Les observations macroscopiques de la flore psychrotrophe (à droite) et de la flore pseudomonas (à gauche) présentes dans le lait camelin



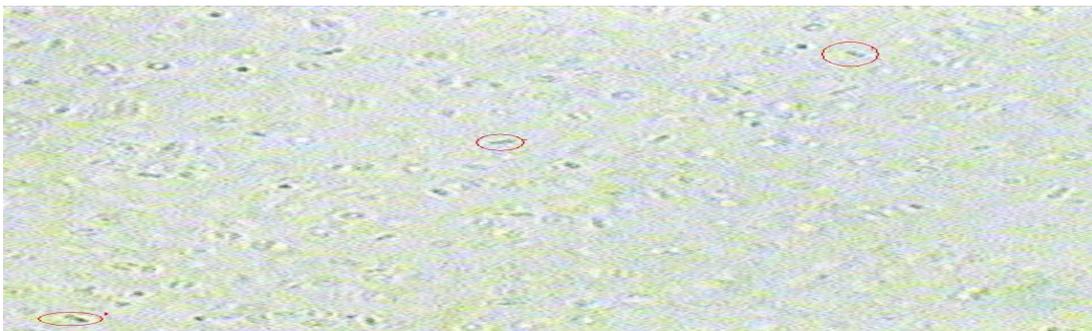
Annexe 10 : Les observations microscopiques de la flore psychrotrophe et de la fore pseudomonas présentes dans le lait camelin photographies (1-3)



Photographie 1 : Observation microscopique des Psychrotrophes (coloration de Gram X100)

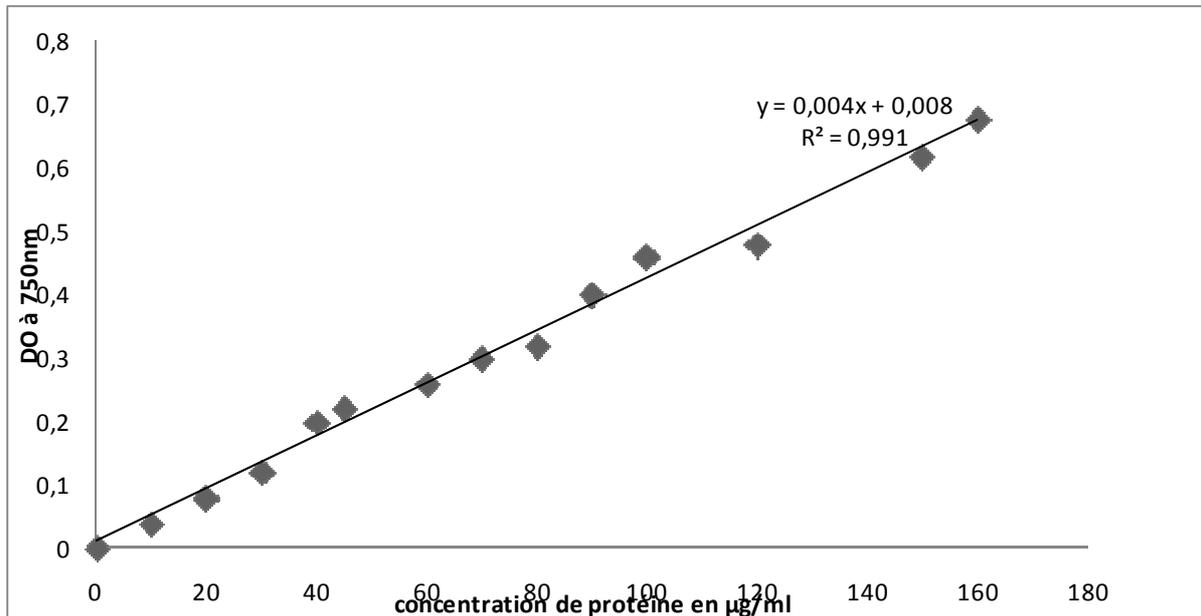


Photographie 2 : Observation microscopique de pseudomonas (coloration de GramX100)



Photographie 3: Observation microscopique des pseudomonas à l'état frais (X100)

Annexes 11 : courbe d'étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY, (l'albumine sérique bovin (BSA) est utilisée comme protéine de référence).



Annexe 12 : les caillés et les lactosérums issus de la coagulation des laits de chamelle (à gauche) et de vache (à droite) traités par les ECD



Annexe 13 : Fromage type Kemaria de la région de Mzab (Ghardaia) ; Algerie



Photographie 1 : Fromage E2 ; Kemaria traitée par la présure commerciale



Photographie 2 : Fromage E3 ; kemaria traitée par les extraits coagulants de dromadaire

Publications

Comparative study of milk clotting activity of crude gastric enzymes extracted from camels' abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk

Boudjenah-Haroun Saliha¹, Laleye C. Louis^{2*}, Moulti-Mati Farida³,
Si Ahmed Saliha³, Mahboub Nasma¹, Siboukeur Oum Elkhir¹ and
Mati Abderrahmane³

¹Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université K. Merbah de Ouargla, Algérie; ²Faculty of Food and Agriculture, Department of Food Science, P.O. Box 17555, Al Ain, United Arab Emirates University, United Arab Emirates; ³Laboratoire de Biochimie Appliquée et de Biotechnologie (LABAB), Université M. Mammeri de Tizi Ouzou, Algérie

Abstract: Coagulation of camel milk for the production of cheese has been proved to be difficult by the use of the available commercial rennets, chymosin and pepsin. Therefore this study focused on the use of crude gastric enzymes extracted from the abomasum of camels (*Camelus dromedarius*) at different ages (1, 3 and 9 years old). The non-purified gastric enzyme extracts from camels (GEC) at different ages were characterized for their protein content, clotting and proteolytic activities and were also compared with those of bovine rennet and pepsin. The conditions of milk clotting by the GEC were optimized at different pHs 5.8, 6.0, 6.3, 6.6 and temperatures 30, 37 and 42°C. The flocculation time of bovine and camel milk by all the enzymes studied were reported. The data showed that the GEC from the older camels gave the best results significantly ($P \leq 0.05$) for both milk clotting activity and flocculation time of both bovine and camel milk compared with the other tested enzyme preparations. The optimum flocculation time was obtained at pH 5.8 and 42°C for the camel milk and at pH 6.0 and 37°C for bovine milk.

Key words: Camel, (*Camelus dromedarius*), camel milk cheese, Gastric enzyme extract, coagulation

دراسة لمقارنة النشاط التخثري لإنزيمات المنفحة المستخلصة من معدة الإبل في أعمار مختلفة والإنزيمات التجارية على حليب الأبقار والنوق

بودجيناه-هارون صاليجا¹, لالي سي. لويس², ماولتي - ماتى فريدا³, سي احمد صليحا³, محبوب نسما¹,
سيبوكور اووم الخير¹ و ماتى عبد الرحمن³

¹مختبر حماية النظم الإيكولوجية في المناطق القاحلة وشبه القاحلة، كلية العلوم، قسم علم الأحياء، جامعة ك. Merbah ورقلة، الجزائر، ²كلية الأغذية والزراعة، قسم علوم الأغذية، ص. المربع 17555، العين، جامعة الإمارات العربية المتحدة، الإمارات العربية المتحدة، ³مختبر الكيمياء الحيوية التطبيقية والتكنولوجيا الحيوية (Labab)، جامعة محمد معمرى تيزي وزو، الجزائر

المخلص: لقد أثبتت الدراسات صعوبة تخثر حليب النوق باستخدام الإنزيمات المستخلصة من الغشاء المبطن لمعدة العجل المتوفرة تجاريا والمكونة من الرنين و الكيموسين و الببسين لإنتاج الجبن. لذلك ركزت هذه الدراسة على استخدام الإنزيمات المعدية المخترة المستخلصة من معدة الإبل في أعمار مختلفة (1 و 3 و 9 سنوات). لقد تم تقدير المحتوى البروتيني ونشاط التخثر والتحللي للبروتين للإنزيمات الخام المستخلصة من الإبل ومقارنتها مع الإنزيمات التجارية (الرنين والببسين) المستخلصة من منفحة الأبقار. تم دراسة تخثر الحليب على درجات حموضة مختلفة (5.8 – 6.0 – 6.3 – 6.6) وحرارة مختلفة (30 – 37 – 42 م) لتحديد الظروف المثلى بقياس زمن التخثر. بينت النتائج أن الإنزيمات المستخلصة من الإبل المسنة أفضل من حيث النشاط التخثري وزمن التخثر لحليب النوق والأبقار مقارنة بالإنزيمات الأخرى. الزمن التخثري الأمثل لحليب النوق يكون على حموضة 5.8 ودرجة حرارة 42 م وبالنسبة لحليب الأبقار على حموضة 6.0 ودرجة حرارة 37 م.

*Corresponding Author, Email: llaleye@uaeu.ac.ae

Received 10 March 2011; Revised 25 April 2011; Accepted 26 April 2011

Introduction

In the Sahara desert of Algeria, the camel has a unique potential for milk production and efficiency, and exploits fragile habitats. It is the main milk source not only for nomadic herders, but also for the rural population living in dry lands where there are, in general, inadequate dairy products resources (Wilson, 1984).

Camel milk is used fresh, fermented or after butter extraction, but only rarely as cheese. Camel milk is technically more difficult to process than milk from other animals. However, satisfactory cheese can be made when cheese-making procedures are adapted to camel milk's particular characteristics (Ramet, 2001).

To prepare fermented milk, containers made of calabashes, clay pots, plant fiber vessels or hollowed wood vessels are smoked by burning chips of *Olea African* or *Acacia busia*. The daily residual fresh milk without starters is poured into the container, and acidification is allowed to develop for a few days, from natural flora in milk, and/or growing on the sides of the vessel (Farah et al., 1990).

The milk is often left undisturbed often in a covered container to protect it from dust, for 24 – 48 hours until it becomes sour. The ambient temperature is normally between 25 and 35°C. Due to the spontaneous nature of the fermentation, this traditional method results in a product with varying taste and flavor and often of poor hygienic quality. To improve this spontaneous traditional fermentation, controlled fermentation using mesophilic lactic acid bacteria starter culture has been developed and successfully introduced in camel milk processing plants in different eastern African countries (Farah et al., 1990).

The overall composition of camel's milk is similar to cow's milk, yet some differences exist in the molecular composition of proteins, lipids and minerals balance. Casein fractions which account for 60% of total proteins in camel's milk have been isolated and found to be homologous with the ones in cow's milk. However, the profile of casein fractions in

camel's milk is very different from the ones in cow's milk. It is characterized by a low amount of k-casein which makes only 5% of the total casein compared with about 13.6% in bovine casein (Farah, 1993).

Bovine chymosin is the preferred enzyme in the cheese making process, since specificity for k-casein is high, general proteolytic activity, especially with regard to milk proteins, is low, and optimal activity is achieved at mildly acidic conditions (Bayoumi, 1990). Camel milk is not sensitive to coagulation with bovine chymosin, most likely due to major variations between the primary k-casein structures of the two species (Sørensen et al., 2010).

Most attempts to make cheese from camel's milk revealed major difficulties in getting the milk to coagulate. With the same amount of calf rennet, the coagulation time of camel's milk is twice or three times longer than that of cow's milk. The action of rennet on camel's milk leads to coagulation in the form of flocks, with no firm coagulum (Mohamed, 1990). Due to technical difficulties of camel's milk coagulation, several researchers are now focusing on the functional and coagulation properties of the camel's milk proteins (Farah and Bachmann, 1987; El-Agamy, 2000a; El-Agamy, 2000b; Laleye et al., 2008), and also on the fragile and weak coagulum and poor yield of camel milk cheese (Farah and Ruegg, 1989; Mehaia, 1993; El-Zubeir and Jabreel, 2008). Bovine chymosin is the most used enzyme in cheese manufacturing due its specificity for κ -casein. The coagulation phase, which is the most important phase leading to the curd formation, has been tested using different type of enzymes such as rennet, pepsin and microbial enzymes (Bayoumi, 1990; Mehaia, 1993; Wangoh et al., 1993). Wangoh et al. (1993) reported that the coagulation of camel's milk by calf rennet was primary due to the pepsin content of calf rennet.

Recently, Kappeler et al. (2006) reported and characterized a recombinant camel chymosin. This new recombinant camel

enzyme showed a high clotting activity for raw camel milk, while raw camel milk could not be clotted with bovine chymosin.

In addition to animal rennets (Mohanty et al., 2003), natural coagulants from vegetable sources such as *Cynara cardunculus*, *Ficus carica*, *Arctium minus* and *Solanum dohium* are also used traditionally in some parts of the world (Robinson and Wilbey, 1998). However, a few limited studies reported that gastric enzymes extracted from camel have the potentiality to coagulate camel's milk (Wangoh et al., 1993; Ramet, 1994; El-Agamy, 2000a; Siboukeur et al., 2005;). Therefore, the purpose of this study was to optimize the extraction conditions of the gastric enzymes from the abomasum of camels at different ages and to determine and optimize the flocculation time based on pH and clotting temperatures.

Materials and Methods

Materials

Abomasal tissues

The camel abomasal tissues were obtained from camel slaughterhouse of Ouargla, Algeria. The abomasums were obtained from camels of different ages (1, 3 and 9 years). The abomasal tissues were cleaned with running water, defatted, cut into slices, packaged in plastic bags and frozen at -18°C.

Commercial enzymes

Bovine pepsin in powder form and bovine rennet containing 80% chymosin and 20% pepsin were purchased from Texel-Poulenc (France).

Milk samples

Camel milk was collected early morning from a free range camel herd (*Camelus dromedarius*), breed Sahraoui, in good health, living in the South-East Ouargla region (Algeria) whereas cow milk was obtained from an intensively-farmed cow population in the Ouargla region, Algeria. The milk samples were collected in sterile bottles and delivered in a cooler with ice to the laboratory (Laboratory of Ecosystems Protection in Arid and Semi-Arid Regions, Department of Biology, Merbah-Ouargla University, Algeria).

Methods

Extraction of gastric enzymes from camel abomasal tissues

The method of crude gastric enzymes extraction from bovine abomasal tissue as described by Valles and Furet (1977) was used with minor modifications. The steps involved were: 1) soaking of a known weight of sliced abomasal tissue in 1.25 volume of 0.2 M HCL at 42°C temperature for 60 minutes followed by filtration through a paper filter; 2) clarification of the extract using 1% (V/V) of 1M solution of Al₂SO₄ and 5% of 1M solution of Na₂SO₄ heated to 42°C. After filtration a yellowish clarified solution was obtained; 3) concentration: a double solution of saturated NaCl containing 1% (w/w) of concentrated HCl was added to the known weight of the abomasal tissue. After mixing, the mixture was put to rest for one hour, centrifuged at 2,100 g for 20 minutes, the supernatant was discarded and the wet weight of the filtrate pellet was recorded, followed by adding 10% (w/v) of distilled water. The pH of the concentrated filtrate was adjusted to 5.5 with Na₂HPO₄ at 42°C. The extracted camels' gastric enzymes obtained were assigned the labels GEC 1 for camels aged 1-2 years old; GEC 3 for camels aged 3-6 years old and GEC 9 for camels aged more than 9 years. The fresh GECs were analyzed, whereas some samples were stored at 4°C with the addition of 10% (v/v) of thymol and 10% NaCl for preservation purpose.

Protein analysis of GECs

The method of Lowry et al. (1951) was used to determine the protein content of the gastric enzyme extracts of camels. The amount of proteins (g/ml) was obtained using a standard curve based on bovine serum albumin (BSA).

Clotting activities of GECs

The method of Berridge (1952) was used. The main steps were as following.

The standard substrate, 10% (w/v) of low heat milk powder in CaCl₂ (0.01M) solution was prepared, and the pH was adjusted to 6.5 with 0.1 N NaOH). The GEC 1ml/10ml of

standard substrate was added and mixed manually and incubated in a water bath at 30°C. After thoroughly mixing three times, the “zero” clotting time started. The clotting activity equation as reported by Berridge (1952) in rennet units (RU) was used:

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

RU : rennet unit

V : volume of standard substrate (ml)

Q : volume of GEC (ml)

Tc : time of clotting (sec)

Clotting strength

The clotting activity of GECs was also reported in clotting strength of Soxhlet (F) based on the equation of Bourdier and Luquet, (1981).

$$F = RU/0.0045$$

F : Clotting strength of Soxhlet

Proteolytic activity

The method of Bergere and Lenoir (1997) for the proteolytic activity of GECs was used. In addition the clotting activity was optimized by using the method of Shamet et al. (1992).

Coagulation of camel milk by GECs

Camel and bovine milk coagulation was carried out by using the method of Ramet (1997). However, the flocculation time was measured visually by the method of Lenoir et al. (1997) at different pHs and temperatures.

Optimization of the flocculation time

The flocculation time (ft) of camel and bovine milk was optimized at four different pHs (5.8, 6.0, 6.3 and 6.6) and at three different temperatures (30, 37 and 42°C). The flocculation time was measured in a test tube containing 10 ml of milk with the addition of 1 ml of enzyme (in this case the GEC) and 0.01 M CaCl₂ (Lenoir et al. 1997) adjusted to the desired pH with 0.1 M HCl and incubated at the desired temperature.

Statistical analysis

All experiments were performed with three replicates each. All data were reported as means with standard deviations. An analysis of variance (ANOVA) was applied to assess differences among the “Gastric Enzyme Extract from Camels” (GEC) and the commercial enzymes by using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software version 18.0. Means comparison was carried out using a t-test when comparing two means. P values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results and Discussion

Characterization of crude gastric extract enzymes (GECs)

The protein average in g/l of the GECs was 1.26, 1.48, and 1.54 for GEC1, GEC3 and GEC9 respectively. Means were significantly different at $P \leq 0.05$; however, there was an increase in protein content with the age of the camels (Table 1).

Table 1. Protein content of GECs.

Gastric enzyme extracts	Protein content (g / l)
GEC 1	1.28 ^a ± 0.02
GEC 3	1.48 ^b ± 0.02
GEC 9	1.54 ^c ± 0.02

Means followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$.

GEC 1: Gastric enzyme extract of 1 year old camel; GEC 3: Gastric enzyme extract of 3 years old camel; GEC 9: Gastric enzyme extract of 9 years old camel.

Clotting activity

The clotting activity was the highest for the GEC 9 (older camels) at 0.360 RU compared to the GEC 3 at 0.285 RU and GEC 1 at 0.235 RU. In addition, the commercial bovine rennet had higher clotting activity at 0.184 RU compared to the commercial bovine pepsin at 0.163 RU; however the clotting activity for all GECs at different ages and the two commercial enzymes, rennet bovine and pepsin bovine, were significantly different at $P \leq 0.05$ (Table 2).

Table 2. Change in clotting activity (rennet unit: RU) and strength of Soxhelt (F) according to the nature of the enzymatic preparations.

Enzymatic preparations	Clotting activity (RU)	Strength of Soxhelt (F)
GEC 1	0.235 ^a ± 0.002	51.47 ± 0.13
GEC 3	0.285 ^b ± 0.001	63.73 ± 0.26
GEC 9	0.360 ^c ± 0.02	76.61 ± 0.25
Pepsin bovine (Pb)	0.1630 ^d ± 0.002	35.56 ± 0.11
Rennet bovine (Rb)	0.184 ^e ± 0.002	40.7 ± 0.15

Means followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$.

GEC 1: Gastric enzyme extract of 1 year old camel; GEC 3: Gastric enzyme extract of 3 years old camel; GEC 9: Gastric enzyme extract of 9 years old camel

Proteolytic activity

The proteolytic activities of GECs and commercial enzymes were measured in both camel and bovine milk whereas all data were significantly different ($P \leq 0.05$) (Table 3). The proteolytic activity of each of the GECs was higher than those of the commercial enzymes in both milks. GEC 9 showed a lower proteolytic activity than GEC 1 and GEC 3. Moreover, GEC 9's activity was closer to that of the bovine pepsin. The proteolytic activity of GEC 9 was 0.89 in camel milk and 0.85 in bovine milk

compared to the proteolytic activity of bovine pepsin of 0.73 and 0.94 in camel milk and bovine milk respectively. In cheese production, the desired enzyme should have high clotting activity and low proteolytic activity (Ramet, 1997). GEC 9 could be considered as a good source of enzyme for cheese making compared to GEC 1 and GEC 3. The high clotting activity and low proteolytic activity as shown by GEC 9 are a pre-requisite for an acceptable rennet substitute (Fox, 1969; El-Agamy, 2000a) particularly for making cheese from camel milk.

Table 3. Proteolytic activity of the enzymatic preparations on camel milk and bovine milk.

Enzymatic preparations	Proteolytic activity (Camel milk)	Proteolytic activity (Bovine milk)
GEC 1	1.78 ^{aA} ± 0.020	1.54 ^{aB} ± 0.020
GEC 3	1.18 ^{bA} ± 0.020	1.44 ^{bB} ± 0.020
GEC 9	0.89 ^{cA} ± 0.020	0.84 ^{cB} ± 0.015
Pepsin bovine (Pb)	0.73 ^{dA} ± 0.025	0.94 ^{dB} ± 0.020
Rennet bovine (Rb)	0.78 ^{eA} ± 0.026	1.44 ^{eB} ± 0.015

Means followed by different letters (small caps in column and capital caps in row) are significantly different at $P \leq 0.05$.

GEC 1: Gastric enzyme extract of 1 year old camel; GEC 3: Gastric enzyme extract of 3 years old camel; GEC 9: Gastric enzyme extract of 9 years old camel.

Except for the bovine rennet (Figure 1), the time required to reach the flocculation of camel milk was shorter than that of bovine milk. These results are in agreement with those of Kappeler et al., (2006). In addition the flocculation time decreased with the age of camels from which the GECs were extracted. In the same experimental conditions, the flocculation time of bovine pepsin was shorter for camel milk than for cow milk, but higher than GEC 9. This finding is in agreement with other researchers who reported that the use of bovine pepsin could coagulate camel milk (Ramet, 1994, Siboukeur et al., 2005). In order to define the

affinity of the enzyme preparations to the two substrates (camel and cow milk), the ratio between the flocculation time of bovine milk and camel milk (ftb/ftc) was determined. Figure 2 shows that the GECs demonstrated an affinity for both substrates with a ratio over 1.0 compared to 0.17 for the bovine rennet. The latter has less affinity for camel milk. The ratio for the bovine pepsin was the highest at 3.32, indicating that this enzyme could be suitable for camel milk coagulation, as reported by other researchers (El-Abassy and Wahba, 1986; Mehaia, 1987; Wangoh et al., 1993; Ramet, 1994).

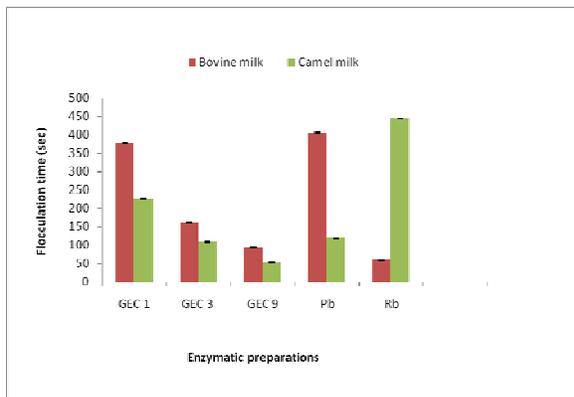


Figure 1. Effect of the enzymatic preparations on the flocculation time of bovine and camel milk.

GEC 1: Gastric enzyme extract of 1 year old camel; GEC 3: Gastric enzyme extract of 3 years old camel; GEC 9: Gastric enzyme extract of 9 years old camel; Pb: Pepsin bovine; Rb: Rennet bovine.

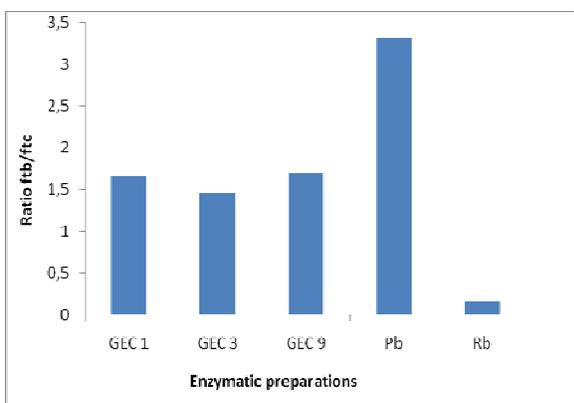


Figure 2. Effect of the enzymatic preparations on the ratio of flocculation time of bovine milk (ftb) and camel milk (ftc).

GEC 1: Gastric enzyme extract of 1 year old camel; GEC 3: Gastric enzyme extract of 3 years old camel; GEC 9: Gastric enzyme extract of 9 years old camel; Pb: Pepsin bovine; Rb: Rennet bovine.

Effect of pH on the flocculation time

Milk clotting activity was influenced by the pH of the milk at the renneting stage. All enzyme preparations exhibited almost a linear curve with an increased pH from 5.8 to 6.6. The optimum pH for clotting camel milk for all GECs was at 5.8, and the flocculation time increased with the age of the Camels (GEC1, GEC3 and GEC9). Also it appeared that GEC 9 was less affected by the increased pH (Figure 3). The pH of the milk for rapid flocculation is very important during cheese making since the

acidification by the lactic acid bacteria helps the enzyme activity in which the enzyme is a protease having an optimum activity around pH 5.5. This contributes to the destabilization of the casein micelles (Ramet, 1994). In regards to bovine milk (Figure 4), the optimum pH for GEC 3 and GEC 9 was 6.0. GEC 1 showed a similar pH at 5.8 with both camel and bovine milk. Figure 4 shows that both GEC 3 and GEC 9 were less sensitive to pH variations. Based on these results, bovine and camel milk appear to behave differently in function of the pH at renneting, probably due to the difference in the protein fractions of the two milks. In fact, Chazarra et al. (2007), Lenoir et al. (1997) found that the effect of pH of milk on flocculation was very sensitive and apparent, thus the flocculation time is further reduced if the renneting pH is far below the normal pH of milk. This is in agreement with the findings of Ramet, 1985, 1993, that all clotting cheese enzymes are acid protease, that their activity is optimum at pH 5.5 and also that the kappa casein presents stability at pH 5.6. This is not the case for camel milk since the slow pH drop in camel milk is not conducive to the clotting activity (Ramet, 1985; Ramet, 2001).

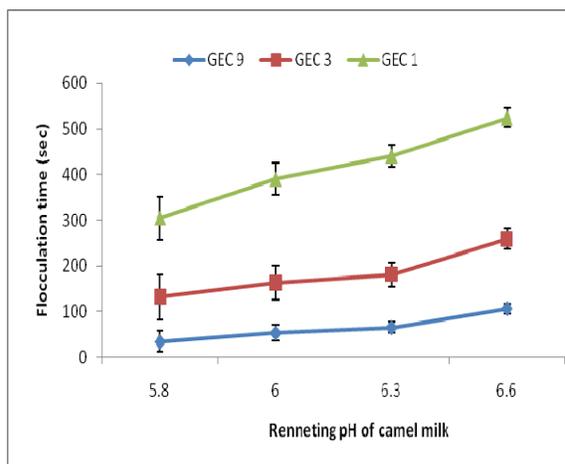


Figure 3. Effect of renneting pH of camel milk on the flocculation time.

GEC 1: Gastric enzyme extract of 1 year old camel; GEC 3: Gastric enzyme extract of 3 years old camel; GEC 9: Gastric enzyme extract of 9 years old camel; Experiment conditions: GEC inoculation rate = 5% (v/v), CaCl2 = 0.01M, n= 3.

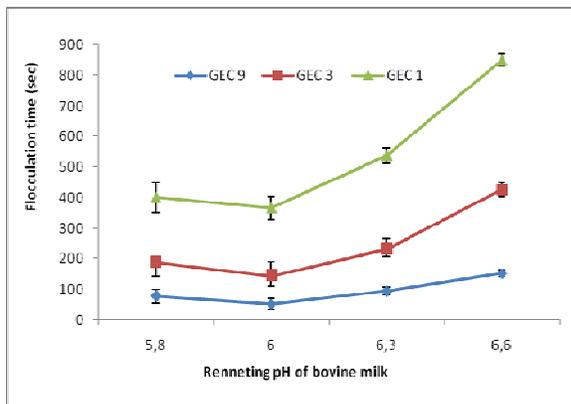


Figure 4. Effect of renneting pH of bovine milk on the flocculation time.

GEC 1: Gastric enzyme extract of 1 year old camel; GEC 3: Gastric enzyme extract of 3 years old camel; GEC 9: Gastric enzyme extract of 9 years old camel; Experiment conditions: $T^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$, GEC inoculation rate = 5% (v/v), $\text{CaCl}_2 = 0.01\text{M}$, $n=3$.

The effect of temperature on the flocculation time of the various GECs on camel milk is shown in Figure 5. Increasing temperatures (30, 37 and 42°C) led to a decrease in flocculation time by all GECs. However, the shortest flocculation time was obtained with GEC 9, indicating that GEC 9 could be the more stable enzyme but all GECs showed an optimum activity and flocculation time at 42°C (Figure 5). This is in line with the data reported by Ramet (1985, 1993), that the optimum temperature of most clotting enzymes were around $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$, but beyond these values there was a progressive denaturation of the enzyme and at 65°C there was no activity. Similarly, Mohanty et al., (2003) reported that the proteolytic activity of buffalo chymosin treated at different temperatures exhibited a relatively stable proteolytic activity curve up to a temperature of 55°C after which there was a decline of the activity. Measuring the flocculation time at different renneting temperatures suggested which enzyme could be more suitable for camel milk clotting in a short period as well as in the manufacture of various type of cheeses, such as soft, semi-hard and hard cheese.

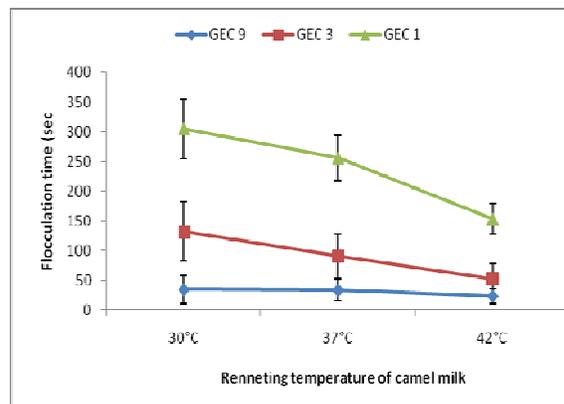


Figure 5. Effect of renneting temperature of camel milk on the flocculation time.

GEC 1: Gastric enzyme extract of 1 year old camel; GEC 3: Gastric enzyme extract of 3 years old camel; GEC 9: Gastric enzyme extract of 9 years old camel. Experiment conditions: $\text{pH} = 5.8$; GEC inoculation rate = 5% (v/v), $\text{CaCl}_2 = 0.01\text{M}$, $n=3$.

The effect of temperature on flocculation time of the various GECs in bovine milk is shown in Figure 6. In contrast with camel milk, all GECs showed their optimum flocculation time at 37°C ; and the shortest flocculation time was obtained with GEC 9 indicating that this enzyme had some affinity with both milk substrates (Figure 7). In addition, the age of camels had a significant ($P \leq 0.05$) influence on the flocculation time, the older the camels, the shorter the flocculation time required. Ramet (1985) reported that pepsin is the minor component of rennet but its secretion increases after the lactation period. On the other hand, Wangoh et al. (1993) did not conduct their study with different age of camels, but their study recommended the use of gastric enzyme extracted from the abomassa of camels rather than from other species. Based on all data, the short flocculation time obtained with the GECs were probably due to the presence of pepsin, which was in higher amount in GEC 9 compared to GEC 3 and GEC 1. Similarly, Ramet (1994) reported that the use of bovine pepsin provided a rapid flocculation time in camel milk compared to bovine milk. Therefore, this suggested that the content of pepsin was higher in the older camels (GEC 9), as previously reported by Wangoh et al. (1993). This finding was in contrast with the case of bovine chymosin which is extracted in younger calves. It can be concluded that the pepsin content in older camels (GEC 9) has more

coagulating activity than proteolytic activity in camel milk due to the molecular difference in camel proteins and bovine proteins, such as the distribution and size of the casein micelles, various fractions of the casein, sites of the potential cleavage and denaturation (Attia et al., 2000; Kappeler et al., 2006; El-Agamy et al., 2000a). This low proteolytic activity demonstrated by the GEC9 supported the findings of Bansal et al. (2009) that the recombinant camel chymosin produced low level of proteolysis in Cheddar cheese.

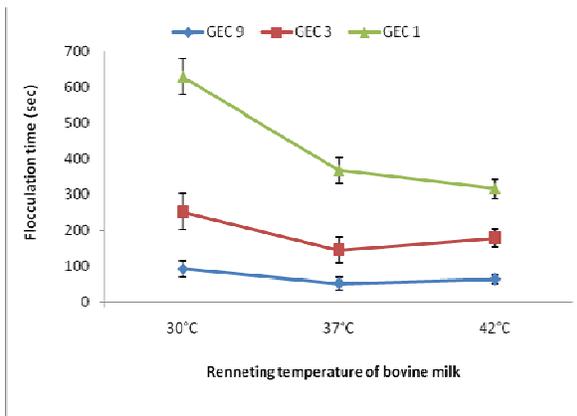


Figure 6. Effect of temperature of bovine milk on the flocculation time.

GEC 1: Gastric enzyme extract of 1 year old camel; GEC 3: Gastric enzyme extract of 3 years old camel; GEC 9: Gastric enzyme extract of 9 years old camel; Experiment conditions: pH= 6; GEC inoculation rate = 5% (v/v), CaCl₂ = 0.01M, n= 3.

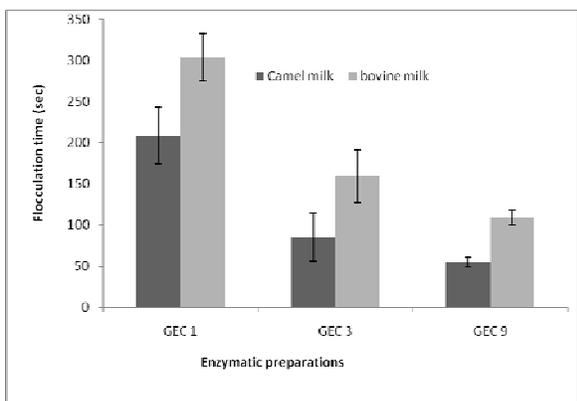


Figure 7. Effect of enzymatic preparations on the flocculation time of camel milk and bovine milk.

GEC 1: Gastric enzyme extract of 1 year old camel; GEC 3: Gastric enzyme extract of 3 years old camel; GEC 9: Gastric enzyme extract of 9 years old camel.

Overall, based on the data reported and in line with other researchers' reports (Farah and Bachman, 1987; Desmazeaud, 1990; Mehaia, 1992; Ramet, 1993; Thouvenod, 1997), this study proposes an optimum temperature at 42°C and a pH of 5.8 for an optimum clotting activity and flocculation time using crude gastric enzymes extracted from camels.

Conclusion

The crude gastric enzyme preparations from camels (GEC) obtained from the older camels showed better coagulation activity in both milks. Flocculation time data showed that the GECs and bovine pepsin had good specificity towards bovine casein and camel casein. In addition, the short flocculation time obtained for GEC 9 (older camels) at an optimum temperature of 42°C and a pH of 5.8 thus encouraging the fact that older camels are more available for slaughter in Algeria. Therefore the production of GEC from older camels could be an excellent substitute for the commercial chymosin for cheese making using either bovine or camel milk. This study focused primarily on the coagulation step on making cheese curd that represents a key step in cheese making. It is recommended that additional research be conducted to purify the extract, to characterize the extract using electrophoreses and finally for the production of various types of cheeses from camel milk.

Acknowledgement

The investigators would like to express their sincere appreciation to the staff of the slaughterhouse of the community at Ouargla (Algeria) and particularly to Dr. Baissa Babelhadj, Veterinarian, for his availability and providing the fresh abomasums of camels. Ms. Saliha would also like to personally express her gratitude to the Faculty, instructors and staff at the Department of Food Science and the Dean, Professor Ghaleb Alhadrami, for their support during her research work at the United Arab Emirates University, Al Ain, UAE. A special appreciation and acknowledgment goes to Mr. Stewart Brooker, English Lecturer at UAE University, for proofreading this manuscript.

References

- Attia, H., N. Kherouatou, M. Nasri and T. Khorchani. 2000. Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. *Lait*. 80:503–515.
- Bansal, N., M. A. Drake, P. Piraino, M. L. Broe, M. Harboe, P. F. Fox and P. L. H. McSweeney. 2009. Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 19:510–517.
- Bayoumi, S. 1990. Studies on composition and rennet coagulation of camel milk. *Kieler Milchwirtschaft Forschungberichte* 42:3-8.
- Bergere, J. L. and J. Lenoir. 1997. Les accidents de fromagerie et les défauts des fromages. In: A. Eck and J. C. Gillis (Eds.) pp. 509-541. *Le fromage*. Troisième édition éd. Tec. Doc. Lavoisier, Paris.
- Berridge, N. J. 1952. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *J. Dairy Res.* 19:328-332.
- Bourdier, J. F. and F. M. Luquet. 1981. *Dictionnaire Laitier*. Tec. Doc. Lavoisier, Paris.
- Chazarra, S., L. Sidrach, D. Lopez-Molina and J. N. Rodriguez-Lopez. 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. *Intern. Dairy J.* 17:1393–1400.
- Desmazeaud, M. J. 1990. Les enzymes utilisées en industrie laitière. In: *Lait et dromadaire en Tunisie*. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*. 42:113-115.
- El-Abassy, F. and H. Wahba. 1986. Studies on camel pepsin 2-manufacture of Domiati cheese with camel pepsin. *Egyptian J. Dairy Sci.* 14:187-796.
- EL-Agamy, E. I. 2000a. Physico-chemical, molecular and immunological characteristics of camel calf rennet: a comparison with cow's and buffalo rennet. *J. Dairy Res.* 67:73-81.
- El-Agamy, E. I. 2000b. Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cows' and buffalo milk proteins. *Food Chem.* 68:227-232.
- El-Zubeir, I. E. M. and M. S. O. Jabreel. 2008. Fresh cheese from camel milk coagulated with Camifloc. *Intern. J. Dairy Technol.* 61:90-95.
- Farah, Z. 1993. Composition and characteristics of camel milk. *J. Dairy Res.* 60:603-626.
- Farah, Z. and M. R. Bachmann. 1987. Rennet coagulation properties of camel milk. *Milchwissenschaft* 42:689-692.
- Farah, Z. and M. W. Rüegg. 1989. The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure* 8:211-216.
- Farah, Z., T. Streiff and M. R. Bachmann. 1990. Preparation and consumer acceptability test of fermented camel milk in Kenya. *J. Dairy Res.* 57:281-283.
- Fox, P. F. 1969. Milk clotting and proteolytic of rennet, and of bovine pepsin and porcine pepsin. *J. Dairy Res.* 36:427-433.
- Kappeler, S. R., J. M. Hans van den Brink, H. Rahbek-Nielsen, Z. Farah, Z. Puhan, E. B. Hansen and E. Johansen. 2006. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342:647–654.
- Lalaye, L. C., B. Jobe and A. A. H. Wasesa. 2008. Comparative Study on Heat Stability and Functionality of Camel and Cow's Milk Whey Proteins. *J. Dairy Sci.* 91:4527-4534.
- Lenoir, J., F. Remeuf and N. Schneid. 1997. L'aptitude du lait à la coagulation par la présure. In: A. Eck and J. C. Gillis (Eds.)

- pp. 229-255. Le fromage. Troisième édition éd. Tech. Doc. Lavoisier, Paris.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biochem.* 193:265-275.
- Mehaia, M. A. 1987. Studies on camel milk casein micelles; treatment with soluble and immobilized pepsin. *Arab Gulf J. Sci. Res. Agric. Biol. Sci.* 3:391-400.
- Mehaia M. A. 1992. Studies on camel milk coagulation using soluble and immobilized pepsin. *Egyptian J. Dairy Sci.* 20:31-40.
- Mehaia, M. A. 1993. Fresh soft white cheese (Domiaty-Type) from camel milk: composition, yield, and sensory evaluation. *J. Dairy Sci.* 76:2845-2855.
- Mohamed, M. A. 1990. On the composition of Somali camel milk. Uppsala Swedish Univ. Agric. Sci. (Ph.D. Dissertation), Sweden.
- Mohanty A. K., U. K. Mukhopadhyay, J. K. Kaushik, S. Grover and V. K. Batish. 2003. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Dairy Res.* 70:37-43.
- Ramet, J. P. 1985. Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudi Arabia. Mission Report, FAO, 1-73.
- Ramet, J. P. 1993. La technologie des fromages au lait de dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude FAO production et sante' animales 113. Rome, p. 118.
- Ramet, J. P. 1994. Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication de fromage au lait de dromadaire. Actes du Colloque: "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26 octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- Ramet, J. P. 1997. Les Agents de la transformation du lait. In: A. Eck and J. C. Gillis (Eds.) pp. 165-174. Le fromage. Troisième édition éd. Tech. Doc. Lavoisier, Paris.
- Robinson, R. K. and R. A. Wilbey. 1998. *Cheesemaking Practice* R. Scott, Third Ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, USA.
- Ramet, J. P. 2001. The technology of making cheese from camel milk (*Camelus dromedarius*), N0.113, FAO, Rome.
- Shamet, K. M., R. J. Brown and D. J. Mc Mahon. 1992. Proteolytic activity of some milk clotting enzymes on caseins. *J. Dairy Sci.* 75:1373-1379.
- Siboukeur, O., A. Mati and B. Hesas. 2005. Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camelin (*Camelus dromedarius*): utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. *Cahiers Agric.* 5:473-478.
- Sørensen, J., D. S. Palmer, A. U. Christensen, L. Celik, K. B. Qvist and B. H. Schiøtt. 2010. Molecular Modelling Studies of Bovine and Camel Chymosin-k-Casein Complexes. *Biophysical Society 54th Annual Meeting*. San Francisco, California, USA. <http://www.biophysics.org/Portals/11/PDFs/program/Sunday.pdf> Accessed April 18, 2011.
- Thouvenot, C. 1997. Le fromage dans l'alimentation. In: A. Eck and J. C. Gillis. pp. 736-740. Le fromage. Troisième édition éd. Tec. Doc. Lavoisier, Paris.
- Valles, E. and J. P. Furet. 1977. Etudes des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine: méthodes d'extraction. *Lait.* 61:601-617.
- Wangoh, J., Z. Farah and Z. Puhon. 1993. Extraction of rennet and its comparison with calf rennet extract. *Milchwissenschaft.* 48:322-325.
- Wilson, R. T. 1984. *The camel milk*. Longman group Ltd. London. UK.

Etude de la coagulation du lait de chamelle: utilisation des extraits gastriques de dromadaire à différents âges

Boudjenah-Haroun Saliha, Moulti-Mati Farida*, Si Ahmed Saliha*, Mahboub Nasma, Siboukeur Oum Elkhir et Mati Abderrahmane*

Laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi arides. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Kasdi Merbah d'Ouargla. BP 511 Route de Ghardaïa 30000 Ouargla. Algérie.

harunsali@yahoo.fr

* Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies .Université M. Mammeri de Tizi Ouzou, BP N°17 RP, 15000, Tizi Ouzou, Algérie

Résumé

En vue de remédier au problème de la coagulation du lait de chamelle, nous nous sommes proposé d'utiliser des enzymes gastriques coagulantes issues de dromadaires à différents âges (7mois, 14mois et 6 ans). Les Extraits Coagulants brutes de Dromadaire obtenus, dénommés ECD, sont ensuite caractérisés à travers leurs teneurs en protéines et leurs activités coagulante et protéolytique qui ont été comparées à celles de la présure et de la pepsine bovines. Les conditions de coagulation du lait par action de ces ECD ont été optimisées. Le temps de floculation du lait de chamelle traité par toutes les préparations enzymatiques et dans différentes conditions a été calculé. Les résultats obtenus montrent que l'utilisation des extraits gastriques bruts issus de dromadaires âgés donne de meilleurs résultats que ceux issus des jeunes. L'optimisation du temps de floculation s'obtient à des conditions de coagulation de pH de 5.8, à une température de 42°C et à une concentration en CaCl₂ de 0.01M.

Mots clés: Algérie, fromage, lait, présure, transformation

Study of coagulation of camel milk: use of camel gastric extracts at different ages

Abstract

In order to address the problem of coagulation of camel milk, we proposed the use of gastric enzymes extracted from the abomasums of camels (*Camelus dromedarius*) at different ages (7months, 14mois and 6 years).The non-purified gastric enzyme extract from camels called ECD, are then characterized through their protein content and coagulant and proteolytic activities which were compared with those of rennet and bovine pepsin. The conditions of coagulation of the milk by the action of ECD have been optimized. The flocculation time of camel milk processed by all enzyme preparations and under different conditions was calculated. The data showed that the ECD from the older camels gave the best results significantly ($P \leq 0.05$) for both milk clotting activity and flocculation time of camel milk compared to the other tested enzyme preparations. The optimum flocculation time was obtained at pH 5.8, 42°C and a concentration of 0.01M CaCl₂.

Keywords: Algeria, cheese, milk, rennet, processe

Introduction

Malgré la richesse nutritionnelle du lait camelin et de sa bonne qualité microbiologique, sa transformation en produits dérivés est presque inexistante tel qu'en fromage qui permet de conserver ses éléments nutritifs) ainsi que ses vertus thérapeutiques sur des périodes plus ou moins longues (Yagil 1982, Wilson 1988, Kamoun et Bergaoui 1989).

Dans ce volet, les essais menés pour la valorisation de ce produit via sa biotransformation, on montré sa faible aptitude à la coagulation par la présure commerciale bovine. Cette caractéristique assignée à la composition quantitative et qualitative de ce lait, se manifeste par des temps de coagulation plus longs et par une faible consistance des gels obtenus.

Dans le but de remédier au retard à la coagulation de ce lait, des adaptations technologiques ont été proposées par divers auteurs (Kamoun 1995, Mehaia 1993). En effet, des études ont été réalisées sur la conservation du lait camelin et sa transformation en sous produits (beurre, fromage et crème glacé) (Ramet 1993, Farah et Ruegg 1989 et Kamoun et Bergaoui 1989). Des résultats obtenus, d'un projet FAO, confirment que le lait de chamelle peut être transformé en fromage (Abu-lehia 1989). Par ailleurs, la faible aptitude à la coagulation enzymatique aboutit à une affinité limitée pour la présure et à une structure friable des gels formés.

Néanmoins, le choix des enzymes coagulantes à employer est un facteur déterminant de la durée de coagulation du lait de chamelle (Ramet 1989). En d'autres termes, les protéases gastriques à dominance pepsine coagulent mieux le lait camelin que les protéases gastriques camelines à dominance chymosine.

A fin de renforcer ce résultat, nous nous sommes proposés d'étudier l'action des extraits coagulants gastriques de dromadaires de différents âges (7mois, 14 mois et 6 ans) sur la coagulation du lait camelin afin d'appréhender l'évolution de la nature de ces protéases durant la croissance de l'animal.

Matériel et méthodes

Les caillettes issues de dromadaires âgés de 7 mois, 14 mois et de 6 ans, proviennent de l'abattoir communal d'Ouargla. Ces caillettes sont lavées, dégraissées, découpées en lanières puis conservées à -18 °C. La poudre du lait bovin écrémé de type « Low heat » a servi comme substrat standard pour la mesure de l'activité coagulante. La poudre de la pepsine et de la présure bovines ont été utilisés pour les essais comparatifs.

L'appréciation de la qualité microbienne du lait de chamelle cru est réalisée par le test de la réductase (Guiraud 1998).

Les trois extraits coagulants provenant des caillettes de dromadaires âgés de 7 mois, 14 mois et 6 ans dénommés ECD 7, ECD 14 et ECD 6 respectivement sont obtenus selon la méthode proposée par Valles et Furret (1977). Ces extraits sont caractérisés par leurs teneurs en

protéines totales qui sont dosées selon la méthode de Lowry et *al* (1951), leur activité coagulante (UP) qui est calculée selon Berridge (1952) par la formule suivante : $UP = 10 \times V/Tc \times Q$ et leur activité protéolytique dont la mesure est basée sur l'intensité de la protéolyse des caséines bovines en solution, sous l'action enzymatique de ces extraits. Le substrat caséinique est obtenu par une solubilisation à 2% (P/V) dans l'eau distillée, des caséines bovines lyophilisées séparées selon la méthode de Schamet et *al* (1992). La mesure de la protéolyse est effectuée après un repos de 15min, à la température ambiante, du mélange filtré et enfin, a lieu la détermination de l'absorbance à 280nm.

La coagulation du lait par les EC est estimée par l'évaluation du temps de floculation (le temps écoulé depuis l'emprésurage jusqu'à l'apparition des premiers flocons visibles à l'œil nu) (Mehaia 1993). La concentration de l'extrait coagulant (ECD) est telle que la floculation du lait au pH = 6.3 (à une concentration de CaCl₂ de 0.01 M et à 30 °C) a lieu après environ 15 minutes.

Les résultats obtenus ont été analysés par des tests anova multifactoriels grâce au logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software version 18.

Résultats et discussions

Le test de la réductase a révélé que le lait étudié possède une bonne qualité microbiologique. Il est important de travailler avec un lait très peu chargé en micro-organismes et de le refroidir le plus rapidement possible après la traite, à une température la plus proche de 0° C et jamais supérieure à 4° C (en pratique de + 2°C à +4°C).

Caractérisation des extraits coagulants

Taux de protéines

Les taux moyens des protéines exprimés en (g/l) des extraits ECD7, ECD14 et ECD6 sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1. Quantité de protéines contenues dans chaque ECD

Préparations enzymatiques	Taux de protéines (g/l)
ECD7	0.976 ^a ± 0.01872
ECD14	1.379 ^b ± 0.0174 3
ECD6	1.737 ^c ± 0.01922

La différence de moyenne est significative (p = 0.023).

Même si les écarts ne sont pas importants entre ces valeurs, il n'en demeure pas moins que les teneurs protéiques des extraits ont tendance à augmenter en fonction de l'âge de l'animal.

L'activité coagulante

L'activité coagulante (exprimée en UP) des ECD issus de caillettes de dromadaires les plus âgés ECD6 (correspondant probablement à la pepsine) est la plus élevée .Elle est suivie de celle de l'ECD14 et enfin de celle l'ECD7 Notons que pour les extraits de bovin testés, la présure donne une activité légèrement supérieure à celle obtenue avec la pepsine.

D'après les analyses statistiques, toutes les enzymes sont différentes significativement par leur activité coagulante. De ce fait, elles appartiennent chacune à un groupe (tableau 2).

Tableau 2. Variation de l'activité coagulante (UP) et de la force de Soxlet en fonction de la nature de l'enzyme.

Préparation enzymatique	Activité Coagulante (UP)	Force de Soxlet
ECD7	0.236 ^a ± 0.00196	51.467 ± 0.129
ECD14	0.288 ^b ± 0.00992	63.727 ± 0.256
ECD6	0.378 ^c ± 0.00176	76.638 ± 0.249
pepsine bovine (Pb)	0.157 ^d ± 0.00186	35.557 ± 0.109
Présure bovine (Prb)	0.178 ^e ± 0.00176	40.737 ± 0.148

La différence des moyennes est significative (p=0.001).

L'activité protéolytique

L'activité protéolytique de ces ECD sur le lait camelin est illustrée dans le tableau 3.

Tableau 3 : L'activité protéolytique des différentes enzymes vis-à-vis du lait camelin

Préparations enzymatiques	L'activité protéolytique
EC7	1.776 ^a ± 0.00187
ECD14	1.179 ^b ± 0.00176
ECD6	0.887 ^c ± 0.00198
Pb	0.728 ^d ± 0.00165
Prb	0.778 ^e ± 0.00186

La différence des moyennes est significative (p=0.021).

D'après ce tableau nous remarquons que l'ECD6 est caractérisé par une activité protéolytique relativement faible et qui se rapproche de celle de la pepsine bovine. Les deux laits réagissent presque d'une manière identique vis-à-vis des ECD. En revanche la présure bovine est très protéolytique envers le lait bovin. En industrie fromagère, on recherche toujours à ce que les enzymes coagulantes utilisées aient une activité coagulante élevée et une activité protéolytique faible (Ramet 1997). L'ECD6 semble par conséquent, le mieux indiqué par rapport aux autres ECD d'une part et à la présure bovine commerciale qui est habituellement utilisée dans l'industrie fromagère de l'autre part.

Le temps de floculation

Les temps de floculation (**tf**) mesurés, en fonction de la nature de l'enzyme et de la nature du substrat dans une température de 30°C et pH de 6, est illustré par la figure (1). Il ressort de cette figure que le temps nécessaire pour la floculation de lait de chamelle varie selon l'âge de l'animal. Dans les mêmes conditions d'utilisation, le **tf** enregistré pour le lait camelin suite à l'emploi de la pepsine est inférieur à celui enregistré en utilisant la présure. Ces résultats confirment les déductions de quelques auteurs qui préconisent l'emploi préférentiel de la pepsine pour coaguler le lait de dromadaire (Ramet1985, si boukeur et al 2005).

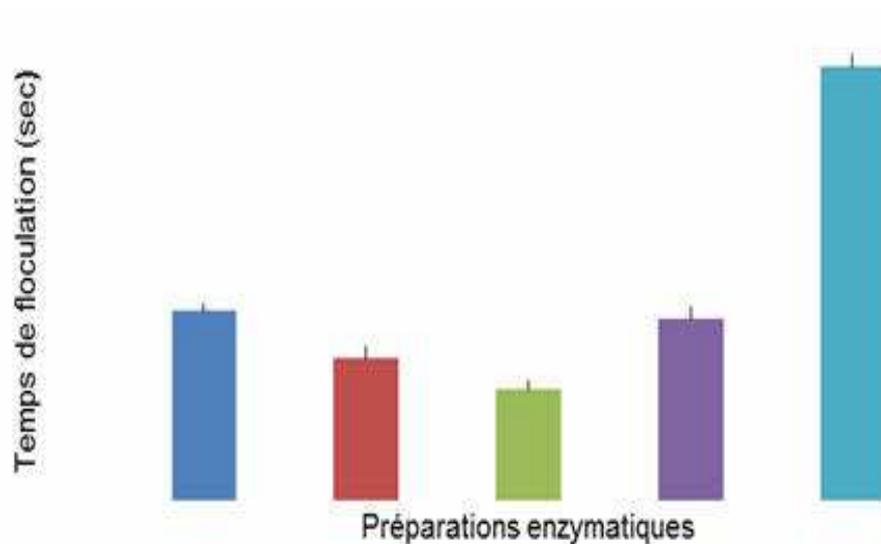


Figure 1 : Variation du temps de floculation des laits camelin et bovin en fonction de l'enzyme utilisée (ECD7, ECD14, ECD6,). ECD1=extrait de dromadaire âgé de 7 mois ; ECD14= extrait de dromadaire âgé de 14 mois ; ECD6=extrait de dromadaire âgé de 6ans ; Pb= pepsine bovine ; Prb =présure bovine
La différence des moyennes est significative (p=0.001).

Les résultats de l'étude statistique (anova) ont montré que la nature de l'enzyme utilisée à un effet très significatif sur le temps de floculation ($p \leq 0.05$) Les enzymes forment chacune un groupe.

Dans les conditions de températures 30°C et un pH de 6, l'affinité des enzymes gastriques de dromadaires est intéressante pour la coagulation du lait de chamelle. Le temps de floculation de ce lait par action de ces extraits, a été amélioré en faisant varier le pH et la température.

Influence de pH de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait de chamelle traité par les ECD

En se basant sur les résultats des analyses de l'anova, nous pouvons dire que l'effet du pH est très significatif ($p \leq 0.05$). L'évolution du temps de floculation du lait de chamelle, en fonction du pH (figure 2) a montré que le pH optimum de tous les ECD est de 5.8 dans toutes les températures. Nous remarquons aussi que l'ECD6 est le moins sensible aux variations du pH par rapport aux ECD7 et ECD14 notamment dans la gamme 5.8-6.3. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Chazarra et al (2007). Le pH de floculation est particulièrement important à prendre en considération au niveau technologique car l'acidification favorise l'activité de l'enzyme, qui est une protéase, ayant une activité optimale généralement située autour du pH 5.5 et au même temps elle contribue à la déstabilisation des micelles de caséines (Ramet 1994).

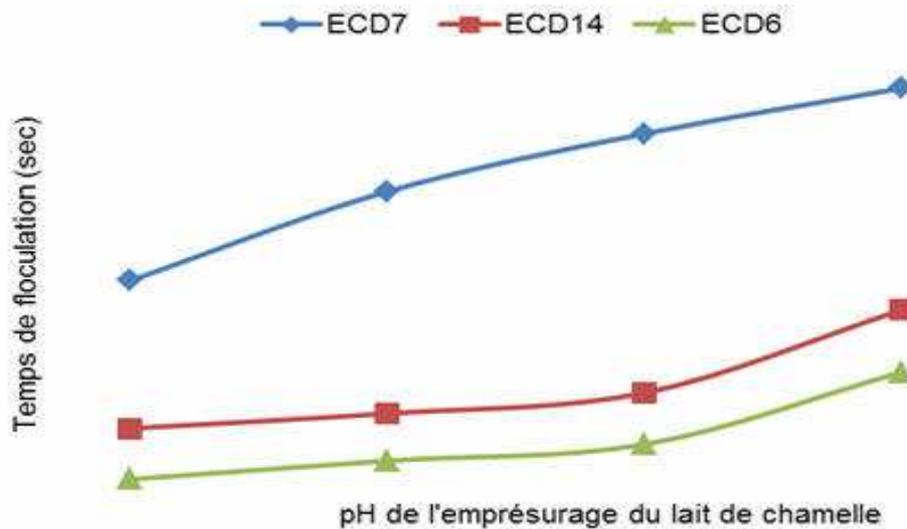


Figure 2. variation du temps de floculation du lait de chamelle par action des ECD en fonction du pH.
Conditions de l'essai ; dose d'ECD = 5% (v/v), $\text{CaCl}_2 = 0.01\text{M}$, $n = 3$
La différence des moyennes est significative ($p=0.001$).

En effet, l'influence de pH du lait sur le temps de floculation est très sensible et apparente, ce dernier devient plus court lorsque le pH est abaissé au dessous de sa valeur normale dans le lait. De même, selon Ramet (1989) toutes les enzymes coagulantes de fromagerie sont des protéases à caractère acide. De ce fait, leur activité est généralement optimale aux valeurs de pH proches de 5,5 car la caséine Kappa présente un maximum de stabilité dans l'intervalle de pH (5-6). Cet auteur montre également que le pH normal du lait de chamelle n'est pas très favorable à l'activité coagulante. L'influence de l'acidification sur le temps de floculation résulte d'un effet sur l'activité de l'enzyme, et la favorisation de la réaction d'agrégation des micelles. A partir de ces résultats, il semble que le pH constitue donc un paramètre décisif en vue d'améliorer le temps de floculation du lait de chamelle par l'action des ECD.

Influence de la température de l'emprésurage sur le temps de floculation du lait de chamelle traité par les ECD

L'élévation de la température, (mesurée entre 30 et 42° C), s'accompagne d'une diminution du temps de floculation du lait traité par les ECD. Le temps de floculation le plus court est observé pour l'ECD6 à la température de 42°C. Notons que cette température est l'optimale pour tous les ECD (Figure 3). 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 qui devient complète vers 65°C (Ramet 1993). En pratique, elle est comprise entre 20-22 C° pour les pâtes fraîches et 30-42C° pour les pâtes dures (Ramet 1987).

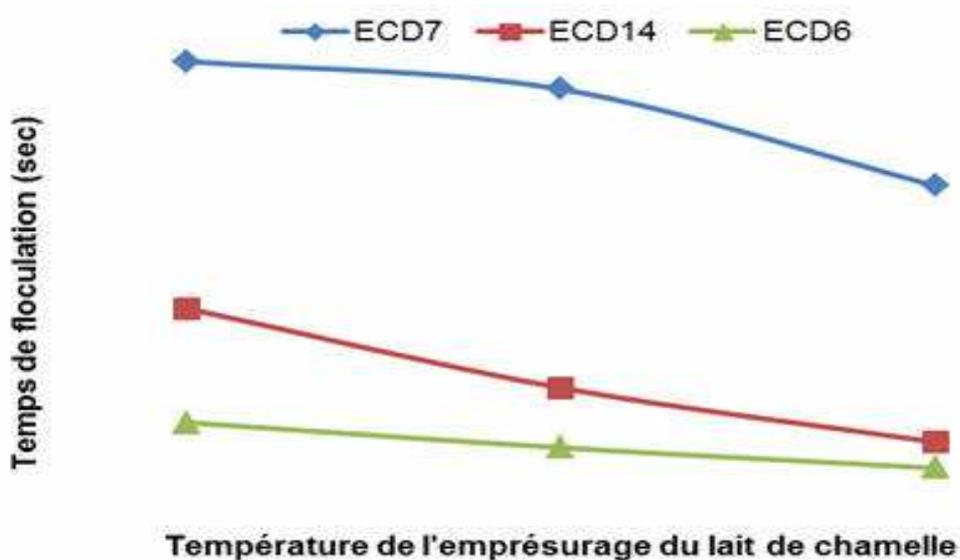


Figure 3. variation du temps de floculation du lait de chamelle traité par les ECD en fonction de la température. Conditions de l'essai ; dose d'ECD = 5% (v/v), $\text{CaCl}_2 = 0,01\text{M}$, $n = 3$. La différence des moyennes est significative ($p = 0,021$).

Les résultats que nous avons obtenus, suggèrent qu'il y a une affinité importante de l'enzyme extraite de caillettes de dromadaires adultes vis-à-vis du lait camelin dans toutes les conditions. (Figure 4)

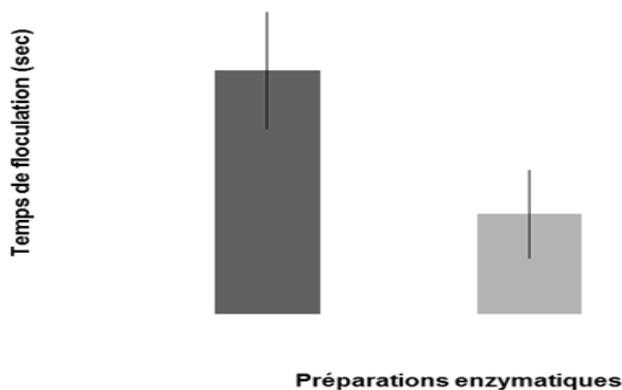


Figure 4. variation du temps de floculation du lait camelin en fonction de l'âge d'ECD utilisé. La différence des moyennes est significative ($p = 0,009$).

C'est d'ailleurs en se basant sur des résultats similaires que Wangoh *et al* (1993) ont recommandé l'utilisation des enzymes gastriques de dromadaire dans le processus de coagulation du lait de chamelle, plutôt que celles issues d'autres espèces. Par ailleurs, les temps de floculation plus faibles du lait de chamelle par l'ECD, sont probablement favorisés

par la pepsine, contenue à forte dose dans l'extrait gastrique coagulant de dromadaires adultes (ECD6). En effet, selon Ramet (1994), l'utilisation de la pepsine bovine aboutit à des temps de floculations, plus faibles du lait de chamelle.

Etant donné qu'aux températures utilisées, la préparation enzymatique isolée à partir des dromadaires les plus âgés donne le temps de floculation le plus court, cela suggère que la pepsine, qui se trouve en abondance dans la caillette des animaux adultes, exerce un effet coagulant plus intéressant sur le lait camelin. Ce résultat est en accord avec les constatations faites par Wangoh et al (1993) et Ramet (1994). Ceci paraît paradoxal, si nous nous basons sur les connaissances acquises sur les extraits enzymatiques issus de caillettes de bovidés. Ces extraits perdent avec l'âge leur activité coagulante et acquièrent en parallèle une activité protéolytique marquée, due à la pepsine, qui n'est pas toujours propice dans les premières étapes de la transformation fromagère du lait. Cependant, comme la nature protéique du lait de chamelle présente quelques différences notables comparativement au lait de référence (dimension et nature des micelles, nature et proportion des protéines présentes, sites potentiels de coupure des caséines etc...), il peut être admis que l'activité de la pepsine pour ce substrat soit davantage coagulante. Si c'est le cas, cette enzyme serait parmi les facteurs de réajustement à envisager pour améliorer l'aptitude du lait camelin à la transformation en fromage.

Cette perspective est d'autant plus intéressante quand on sait que des extraits contenant cette enzyme, peuvent être obtenus en quantité, vu la relative disponibilité des dromadaires adultes destinés à l'abattage. Par ailleurs, les nomades de l'Ahaggar (Sud de l'Algérie) fabriquent leurs fromages en utilisant exclusivement comme agent coagulant, des morceaux d'estomac issus de lapins du désert. Cet estomac renferme, comme chez tous les mammifères, de la pepsine. Ce qui conforte le statut privilégié de la pepsine pour coaguler le lait camelin. En Egypte, El-batawy et al (1987) ont montré que la pepsine provenant des estomacs de dromadaires adultes, pouvait être utilisée pour produire une préparation coagulante dans des conditions acceptables d'activité et de stabilité. Toutefois, le pH d'emprésurage influe directement sur l'activité des enzymes coagulantes de fromagerie, qui sont des protéases ayant une activité optimale située autour du pH 5,5 (Ramet 1994). Selon les essais réalisés, une acidification du lait au pH de 5.8 améliore sensiblement les temps de floculations du lait de chamelle, incubé en présence d'extraits enzymatiques issus de caillettes de dromadaires adultes. Par ailleurs, Farah et Bachman (1987), Mehaia (1992) ainsi que Ramet (1993) ont montré l'existence d'une relation presque linéaire entre la température et l'activité des préparations coagulantes dans l'intervalle de température de 25 à 40°C. Selon Desmazeaud (1990), la vitesse de coagulation enzymatique du lait par la présure serait maximale entre 40 et 42°C. Cette vitesse diminue progressivement au-dessus de ce seuil (Thouvenot 1997). A base de ces résultats, nous préconisons une température optimale de 42°C et un pH de (5.8) pour une meilleure activité des extraits enzymatiques isolés d'origine cameline.

Conclusion

Les préparations enzymatiques brutes extraites testées sur leur pouvoir de coagulation de du lait camelin ont montré que les meilleures aptitudes correspondent à celles issues de l'animal le plus âgé (ECD6). L'étude du temps de floculation a permis d'affirmer qu'il y a une bonne affinité des extraits coagulants de dromadaire pour le lait camelin. Ce résultat est très encourageant vu la pénurie mondiale de la présure et les fluctuations de son prix suite à quoi son importation présente un handicap majeur pour le développement de la production locale. Les

essais réalisés ont aussi montré que la réduction du temps de floculation est possible à un pH d'emprésurage voisin de 5,8 et à des températures avoisinantes 42°C. Ce résultat est encourageant étant donné la disponibilité des caillettes de dromadaires adultes prêts à l'abattage dans le sud Algérien. L'ensemble des résultats auxquels a abouti notre étude constitue une première évaluation de la caractérisation de la phase de coagulation lors de la substitution de la présure par les extraits coagulants de dromadaire.

Références

- El-batawy M A, Amer S N et Ibrahim S A 1987** Camel Abomasum as a source of rennet substitute. *Egyptian Journal of Dairy Sciences*, 15: 93-100
http://scholar.google.fr/scholar?q=EGYPTIAN+DAIRY+SCIENCES&hl=fr&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar
- Abu-lehia I H 1989** Physical and chemical characteristics of milk fat and its fractions. *Food Chemistry*, 34: 261-272 http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/405857/description#description
- Berridge N J 1952** An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *Journal of Dairy Research*, 19: 328-332. http://www.periodicals.com/html/ihp_e.html?ej04459
- Chazarra S, Sidrach L, Lopez-Molina D et Rodriguez-Lopez J N 2007** Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*. 17: 1393–1400. http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/405860/description#description
- Desmazeaud M J 1990** Les enzymes utilisées en industrie laitière ; in: *Lait et Produits Laitiers: Vaches- Brebis- Chèvre. Technique et Documentation.*, Lavoisier. <http://www.hotfrog.fr/Entreprises/Editions-Lavoisier-Technique-Et-Documentation>
- Farah Z et Bachman M R 1987** Rennet coagulation properties of camel milk. *Milchwissenschaft*, 42: 689-692. http://www.uonbi.ac.ke/profiles/my_publications.php?id=134710&dept_code=&fac_code=&page=2
- Farah Z et Ruegg M R 1989** The size distribution of caséine micelles in Camel milk. *Food Microstructure*, 8: 211-216. http://www.camelgate.com/pdf/food_microstructure_8_1989_211.pdf
- Guiraud J P 1998** Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, 652 p. <http://www.dunod.com/sciences-techniques/sciences-techniques-industrielles/agroalimentaireoenologie/ouvrages-professionne/microbiologie-alime>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J. 1951** Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193: 265-275. <http://jb.oxfordjournals.org/>
- Kamoun M et Bergaoui R 1989** Un essai de production et de transformation de lait de dromadaire en Tunisie. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 42 : 113-115. <http://remvt.cirad.fr/>
- Kamoun M 1995** Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. *Option Méditerranéenne*, 81-103. <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/a02/CI000440.pdf>
- Mehaia MA 1992** Studies on camel milk coagulation using soluble and immobilized pepsin. *Egyptian Journal of dairy sciences*, 20: 31-40.
http://scholar.google.fr/scholar?q=EGYPTIAN+DAIRY+SCIENCES&hl=fr&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar
- Mehaia M A 1993** Fresh soft white cheese (domiati type) from camel milk; composition, yield and sensory evaluation. *Journal of Dairy Sciences*, 6: 2845-2855. <http://journalofdairyscience.org/>
- Ramet J P 1985** Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudia-Arabia. *Mission Report, FAO*, 1-73. <http://www.fao.org/DOCREP/004/X6551F/X6551F08>.

Ramet J P 1989 L'aptitude fromagère du lait de dromadaire. Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux. 42 : 105-111. <http://remvt.cirad.fr/>

Ramet J P 1993 La technologie des fromages au lait de dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude F.A.O., Production et santé animales, 113.
http://books.google.fr/books?id=FkN_Y_k5MPkC&pg=PA29&lpg=PA29&dq=Ramet+1993&source=bl&ots=D5v8S_iSFa&sig=ZtYLWTiHLcHjgJceRnY_9cs75hE&hl=fr&ei=DTqTbP2IM3EswaEhLWQCA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&sqi=2&ved=0CBwO6AEwAA#v=onepage&q&f=false

Ramet J P 1994 Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication des fromages au lait de dromadaire. Actes du colloque, 24-26 Octobre, Nouakchott, Mauritanie.
http://books.google.fr/books?id=T6vMCKFZHLgC&pg=PA35&lpg=PA35&dq=Ramet+1994+Nouakchott&source=bl&ots=AVLXtLvsZI&sig=nsnsZ5QqskfhGGccX7gcQjC3in4&hl=fr&ei=VT6qTaunAcrDswbsn5CABw&a=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&sqi=2&ved=0CBsO6AEwAA#v=onepage&q=Ramet%201994%20Nouakchott&f=false

Ramet J P 1997 Les agents de la transformation du lait ; in « Le fromage » éd. Eck et Gillis. Technique de Documentation., 3^{ème} Ed., Lavoisier, Paris. <http://www.hotfrog.fr/Entreprises/Editions-Lavoisier-Technique-Et-Documentation>

Shamet K M, Brown R J et Mc Mahon D J 1992 Proteolytic activity of some milk clotting enzymes on caseins. Journal of Dairy Sciences., 75(6): 1373-1379. <http://journalofdairyscience.org/>

Siboukeur O, Mati A. et Hesses B 2005 Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camelin (*camelus dromedarius*): utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. Cahiers agricultures. 5(14) : 473-478. <http://www.john-libbey-eurotext.fr/en/revues/medecine/bdc/e-docs/00/04/11/77/article.md>

Thouvenot C 1997 Le fromage et le lait. In: « Le Fromage », Eck et Gillis, 3ème Ed., Tec.Doc., Lavoisier, Paris. <http://www.hotfrog.fr/Entreprises/Editions-Lavoisier-Technique-Et-Documentation>

Valles E et Furet J P 1977 Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine ; méthodes d'extraction. *Lait*, 61 : 601-617. http://lait.dairy-journal.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/lait/abs/1977/569/lait_57_1977_569-570_26/lait_57_1977_569-570_26.html

Wangoh J, Farah Z et Puhan Z 1993 Extraction of rennet and its comparison with calf rennet extract. *Milchwissenschaft*, 48: 322-325.
http://www.uonbi.ac.ke/profiles/my_publications.php?id=134710&dept_code=&fac_code=&page=2

Wilson R T 1988 The camel. Ed Longman. Group LTD, London, U.K, 223p
<http://www.bookfinder.com/author/t-r-wilson/>

Received 30 March 2011; Accepted 20 May 2011; Published 3 August 2011

Coagulation of Camel Milk using Dromedary Gastric Enzymes as a Substitute of the Commercial Rennet

¹Boudjenah-Haroun, ²Saliha Laleye, ³Louis Codjo Senoussi Chahra, ³Moulti-Mati Farida, ³Si Ahmed Saliha and ³Mati Abderrahmane

¹Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides, Faculte des Sciences de la Nature et de la Vie, Université K. Merbah BP 511 Ouargla, Algérie

²Laboratory of Food Science, Faculty of Food and Agriculture, United Arab Emirates, University Al Ain, UAE

³Laboratoire de Biochimie Appliquée et de Biotechnologie, Université M. Mammeri de Tizi Ouzou, Algérie

Corresponding Author: Boudjenah-Haroun, Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides, Faculte des Sciences de la Nature et de la Vie, Université K. Merbah BP 511 Ouargla, Algérie

ABSTRACT

Camel milk is recognised to furnish important components including vitamin C, niacin and riboflavin. It is also known to provide health protective functions such as anti-diabetic, anti-infectious, anti-stress and its effects against stomach-ache to name a few. However, its valorisation is still very limited. The particular composition of this milk makes its conservation and transformation very difficult. Investigation on the conservation possibilities of camel milk, thus, its transformation into derived products such as cheese so as the population gets the full benefits from its nutritional and therapeutic virtues, is hereby undertaken. However, previous reports showed its weak coagulation propriety, which is the key to its transformation into derived products. In order to remedy this obstacle, a variety of techniques have been proposed including the use of dromedary gastric enzymes. The data showed that the GEC from the older camels gave the best results significantly ($p < 0.05$) for both milk clotting activity and flocculation time of both bovine and camel milk compared with the other tested enzyme preparations. The optimum flocculation time was obtained at pH 5.8 and 42°C for the camel milk and at pH 6.0 and 37°C for bovine milk.

Key words: Dromedary, milk, protein, cheese, pepsin, chymosin, coagulation

INTRODUCTION

The dromedary (*Camelus dromedarius*) is an animal particularly adapted to the aridity of its environment especially in the steppe and desert zones of the Algerian Sahara (Wilson, 1984). In spite of these extreme agro-climatic conditions, the species produces milk which is recognized as complete food for human beings because it contains most of the essential nutrients (Singh and Sachan, 2011). Not only particularly rich in lipids, proteins and glucides but also in vitamins (especially vit. C) and minerals. This milk of which the conservation period at ambient temperature is prolonged by some days, because the animal udder is endowed with a sophisticated antibacterial system (Al-Humaid *et al.*, 2010), has nonetheless weak transformation aptitudes into derived products. This is considered as a limiting factor as for the technological transformation of this milk, in spite of its important quantitative and qualitative production that can easily answer the population requirements in these regions (Ramet, 2001).

Within the context of finding a solution to such a hindrance, many studies were carried out during the last few decades, all of which have the ultimate goal of improving the technological aptitudes of the milk, notably the one of cheese-making (Ramet, 1985, 1994, 2001; Farah, 1993; Farah *et al.*, 1990; Laleye *et al.*, 2008).

The coagulation phase has been particularly investigated testing a large variety of enzymes (rennet, pepsin, microbial enzymes, etc.) However, coagulation techniques using rennet have not been conclusive (Mehaia, 1993; Bayoumi, 1990; Ramet, 1997), the test carried out using bovine pepsin camifloc commercial enzymes or dromedary gastric enzymes provided interesting results (Wangoh *et al.*, 1993; Ramet, 1994; Elagamy, 2000b; Siboukeur *et al.*, 2005; El-Zubeir and Jabreel, 2008; Saliha *et al.*, 2011).

For a better control and understanding of these preparations, we propose in the current study to optimize the flocculation duration using gastric protease extracted from the stomach of various aged dromedaries.

MATERIALS AND METHODS

Materials: The experiments were conducted during 2010 to 2011 at the University of K. Merbah, Ouargla Algeria.

The camel abomasa samples were collected over two years and the laboratory experiments were carried out during the year 2010-2011.

Abomasal tissues: The camel abomasal tissues were obtained from camel slaughterhouse of Ouargla, Algeria. The abomasa (sing. abomasum) were obtained from camels of different ages (young animals suckling, fed mixed and adults. The abomasal tissues were cleaned with running water, defatted, cut in slices, packaged in plastic bags and frozen at -8°C.

Commercial enzymes: Bovine pepsin in powder form and bovine rennet containing 80% chymosin and 20% pepsin were purchased from Texel-Poulenc (France).

Milk samples: The camel milk was collected early morning from a free range camel herd (*Camelus dromedarius*), breed Sahraoui, in good health, living in the South-East Ouargla region (Algeria). The milk samples were collected in sterile bottles and delivered in a cooler with ice to the laboratory (Laboratory of Ecosystems Protection in Arid and Semi-Arid Regions, Department of Biology, Merbah-Ouargla University, Algeria).

Methods

Extraction of gastric enzymes from camel abomasal tissues: The method of gastric enzymes extraction from bovine abomasal tissue as described by Valles and Furet (1977) was used with minor modifications. The steps involved were: (1) soaking of a known weight of sliced abomasal tissue in 1.25 volume of 0.2 M HCL at 42°C temperature for 60 min and filtration through a paper filter, (2) clarification: of the extract using 1% (v/v) of 1 M solution of Al_2SO_4 and 5% of a 1 M solution of Na_2SO_4 (1 M) heated to 42°C, After filtration a yellowish clarified solution was obtained and (3) concentration: A double solution of saturated NaCl containing 1% (w/w) of concentrated HCl was added to the known weight of the abomasal tissue. After mixing, the mixture was put to rest for one h, centrifuged at 2100 g for 20 min, the supernatant was discarded and the wet weight was recorded followed up by adding 10% (w/v) of distilled water. The pH of the concentrated

filtrated was adjusted to 5.5 with Na_2HPO_4 at 42°C. The extracted camels' gastric enzymes obtained were assigned the labels GEC S for young animals Suckling; GEC FM for animals Fed Mixed and GEC A for Adults' animals. The fresh GEC analyzed and some samples were stored at 4°C with the addition of 10% (v/v) of thymol and 10% NaCl for preservation purpose.

Protein analysis of the GEC: The method of Lowry *et al.* (1951) was used to determine the protein content of the gastric enzyme extracts of camels. The amount of proteins (g mL^{-1}) was obtained using a standard curve based on Bovine Serum Albumin (BSA).

Clotting activities of the GEC: The method of Berridge (1952) was used. The main steps were the following.

The standard substrate was the "low heat" milk powder at 10% (w/v) solution in CaCl_2 (0.01 M) solution and the pH was adjusted to 6.5 with 0.1 N NaOH. The GEC was added at $1/10 \text{ mL}^{-1}$ of standard substrate and mixed manually and incubated in a water bath at 30°C. After thoroughly mixing three times, the clotting time zero started. The clotting activity equation as reported by Berridge (1952) in rennet units (RU) was used:

$$\text{RU} = \frac{10 \times V}{T_c \times Q}$$

Where:

RU: Rennet Unit

V: Volume of standard substrate (mL)

Q: Volume of GEC (mL)

T_c: Time of clotting (sec)

Clotting strength: The clotting activity of the GEC was also reported in clotting strength of Soxhlet (F) based on the equation of Bourdier and Luquet (1981):

$$F = \frac{\text{RU}}{0.0045}$$

Where:

F: Clotting strength of Soxhlet

Proteolytic activity: The method of Bergere and Lenoir (1997) for the proteolytic activity of the GEC was used. In addition the clotting activity was optimized by using the method of Shamet *et al.* (1992).

Coagulation of camel milk by the GEC: Camel and bovine milk coagulation was carried out by using the method of Ramet (1997). However, the flocculation time was measured visually by the method of Lenoir *et al.* (1997) at different pH and temperatures. The flocculation time is the time between the addition of coagulating enzyme of the appearance of flakes visible to the naked eye. This method consists in the introduction of 10 mL of milk in a test tube with a fixed concentration of CaCl_2 solution and incubated at the desired temperature after the addition of a coagulant enzyme concentration. The concentration of the enzyme is such that the flocculation of milk to pH = 6.3 (a concentration of 0.01 M CaCl_2 and 30°C) occurs after about 15 min.

Optimization of the flocculation time: The flocculation time (ft) of camel and bovine milk was optimized at four different pHs (5.8, 6.0, 6.3 and 6.6) and at three different temperatures (30, 37 and 42°C). The mixture is adjusted to the desired pH with 0.1 M HCl, incubated at the desired temperature (Lenoir *et al.*, 1997).

Statistical analysis: All experiments were performed with three replicates each. All data are reported as means with standard deviations. An analysis of variance (ANOVA) was applied to assess differences among the “Gastric Enzyme Extract from Camels” (GEC) and the commercial enzymes by using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software version 18.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of gastric extract enzymes: The protein average in g L⁻¹ of the GEC was 1.26, 1.38 and 1.44 for GECS, GEC FM and GEC A, respectively. Means are significantly different at p≤0.05. There was an increase in protein content with the age of the camels (Table 1).

Clotting activity: The clotting activity was the highest for the GEC A (older camels) compared to the GEC FM and GEC S. In addition, the commercial bovine rennet had higher clotting activity compared to the commercial bovine pepsin, however, the clotting activity for all gastric enzyme extracts from camels at different ages and the two commercial enzymes, rennet and pepsin bovine, were significantly different at p≤0.05 (Table 2).

Proteolytic activity: The proteolytic activity of the GEC and commercial enzymes were measured on both camel milk and bovine milk and all data were significantly different (p≤0.05) (Table 3). The proteolytic activity of each of the GEC was higher than those of bovine enzymes on both milks. An increase in absorption at this wavelength (280 nm) could be fully attributed to the formation of unspecific cleavage products. Kappeler *et al.* (2006) observed that the proteolytic activity of enzymes increased with higher incubation temperatures and also when the pH of the assays was decreased.

Table 1: Protein content of GEC

Gastric enzyme extracts	Protein content (g L ⁻¹)
GEC S	1.26±0.02 ^a
GEC FM	1.38±0.02 ^b
GEC A	1.64±0.02 ^c

Means followed by different letters are significantly different at p≤0.05, GEC S: Gastric enzyme extract of camel suckling, GEC FM: Gastric enzyme extract of camel with Fed Mixed, GEC A: Gastric enzyme extract old camel adult

Table 2: Change in clotting activity (rennet unit: RU)

Enzymatic preparations	Clotting activity (RU)
GEC S	0.135±0.002 ^a
GEC FM	0.255±0.001 ^b
GEC A	0.410±0.020 ^c
Pepsin bovine (Pb)	0.123±0.002 ^d
Rennet bovine (Rb)	0.164±0.002 ^e

Means followed by different letters are significantly different at p≤0.05, GEC S: Gastric enzyme extract of camel suckling, GEC FM: Gastric enzyme extract of camel with Fed Mixed, GEC A: Gastric enzyme extract old camel adult, Pb: Pepsin bovine, Rb: Rennet bovine

Table 3: Proteolytic activity of the enzymatic preparations on camel milk and bovine milk

Enzymatic preparations	Proteolytic activity (Camel milk)	Proteolytic activity (Bovine milk)
GEC S	1.68±0.020 ^a	1.44±0.020 ^a
GEC FM	1.28±0.020 ^b	1.24±0.020 ^b
GEC A	0.79±0.020 ^c	0.84±0.015 ^c
Pepsin bovine (Pb)	0.63±0.025 ^d	0.84±0.020 ^d
Rennet bovine (Rb)	0.58±0.026 ^e	1.34±0.015 ^e

Means followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$, GEC S: Gastric enzyme extract of camel suckling, GEC FM: Gastric enzyme extract of camel with Fed Mixed, GEC A: Gastric enzyme extract old camel adult, Pb: Pepsin bovine, Rb: Rennet bovine

GEC A showed a lower proteolytic activity than GEC S and GEC FM. However GEC A showed a proteolytic activity close to that of the bovine pepsin; the proteolytic activity of GEC A was 0.89 on camel milk and 0.85 on bovine milk compared to the proteolytic activity of bovine pepsin of 0.79 and 0.94 on camel milk and bovine milk, respectively. In cheese production, the desired enzyme should have high clotting activity and low proteolytic activity (Ramet, 1997). GEC A could be considered as a good source of enzyme for cheese making compared to GEC S and GEC FM. The high clotting activity and low proteolytic activity as shown by GEC A are a pre-requisite for an acceptable rennet substitute (Fox, 1969; Elagamy, 2000a) particularly for making cheese from camel milk.

Except for the bovine rennet (Fig. 1), the time required to reach the flocculation of the camel milk was shorter than that of the bovine milk. These results are in agreement with those of Kappeler *et al.* (2006).

In addition the flocculation time decreased with the age of camels from which the GEC were extracted. In the same experimental conditions, the flocculation time of bovine pepsin was shorter for camel milk than for cow milk but higher than GEC A. This finding is in agreement with other researchers who reported that the use of bovine pepsin could coagulate camel milk (Ramet, 1994; Siboukeur *et al.*, 2005). In order to define the affinity of the enzyme preparations to the two substrates (camel and cow milk), the ratio between the flocculation time of bovine milk and camel milk (ftb/ftc) was determined. Figure 2 shows that the GEC demonstrated an affinity for both substrates with a ratio over 1.0 compared to 0.17 for the bovine rennet. The latter has less affinity for camel milk. The ratio for the bovine pepsin was the highest at 3.32, indicating that this enzyme would be suitable for camel milk coagulation, as reported by other researchers (El-Abbassy and Wahba, 1986; Mehaia, 1987; Wangoh *et al.*, 1993; Ramet, 1994). The large variations in the ability of cow rennet to coagulate camel milk reported in literature (Bayoumi, 1990; Farah and Bachmann, 1987; Mohamed, 1990; Ramet, 1985) may be explained by differences in the pepsin content of the rennet used. The better coagulation of camel milk by camel rennet could be the result of better suitability of camel rennet for coagulating camel milk.

Effect of pH on the flocculation time: Milk clotting activity was influenced by the pH of the milk at the stage. All enzyme preparations exhibited almost a linear curve with an increased pH from 5.8-6.6. The optimum pH for clotting camel milk for all GECs was at 5.8 and the flocculation time increased with the age of the camels (GEC S, GEC FM and GEC A). Also it appeared that GEC A was less affected by the increased pH (Fig. 3). The pH of the milk for rapid flocculation is very important during cheese making since the acidification by the lactic acid bacteria helps the enzyme activity in which the enzyme is a protease having an optimum activity around pH 5.5. This contributes to the destabilization of the casein micelles (Ramet, 1994). With regards to bovine milk

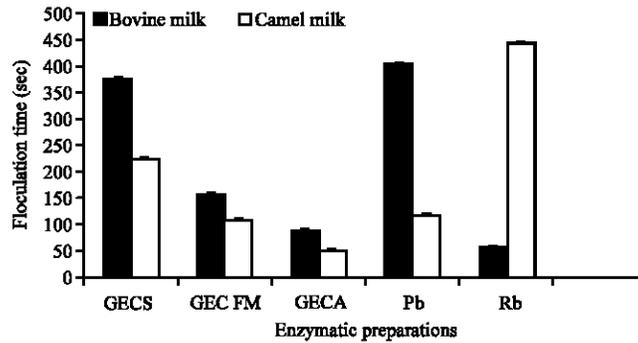


Fig. 1: Effect of the enzymatic preparations on the flocculation time of bovine and camel milk, Means followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$, GEC S: Gastric enzyme extract of camel suckling, GEC FM: Gastric enzyme extract of camel with Fed Mixed, GEC A: Gastric enzyme extract old camel adult, Pb: Pepsin bovine, Rb: Rennet bovine

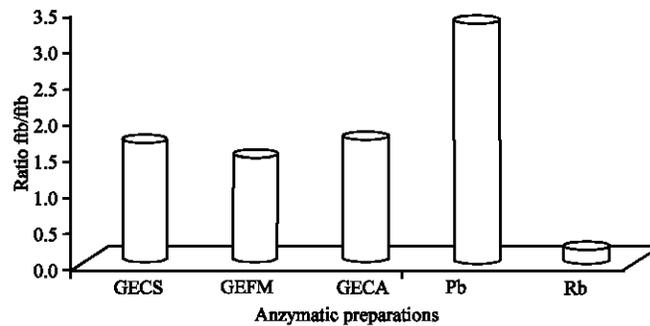


Fig. 2: Effect of the enzymatic preparations on the ratio of flocculation time of bovine milk (ftb) and camel milk (fte), GEC S: Gastric enzyme extract of camel suckling, GEC FM: Gastric enzyme extract of camel with Fed Mixed, GEC A: Gastric enzyme extract old camel Adult, Pb: Pepsin bovine, Rb: Rennet bovine

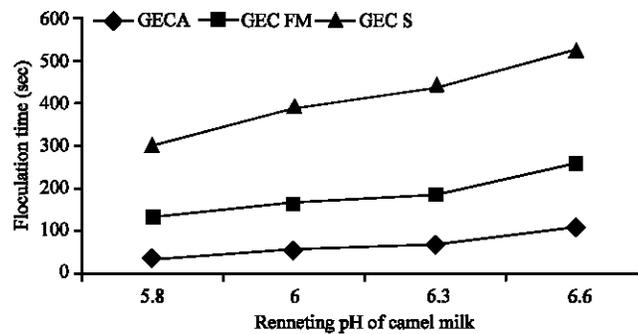


Fig. 3: Effect of renneting pH of camel milk on the flocculation time, GEC S: Gastric enzyme extract of camel suckling, GEC FM: Gastric enzyme extract of camel with Fed Mixed, GEC A: Gastric enzyme extract old camel adult

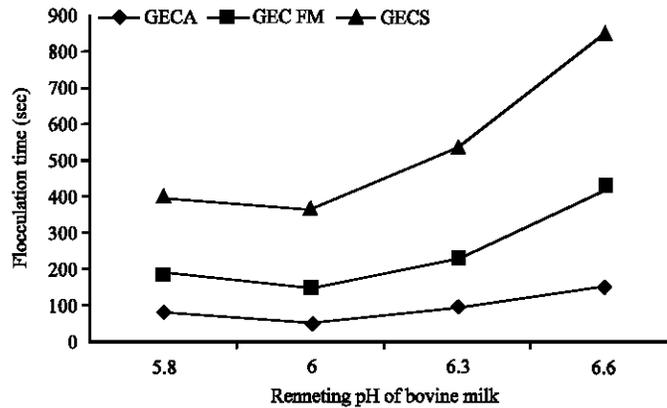


Fig. 4: Effect of renneting pH of bovine milk on the flocculation time, GEC S: Gastric enzyme extract of camel suckling, GEC FM: Gastric enzyme extract of camel with Fed Mixed, GEC A: Gastric enzyme extract old camel adult

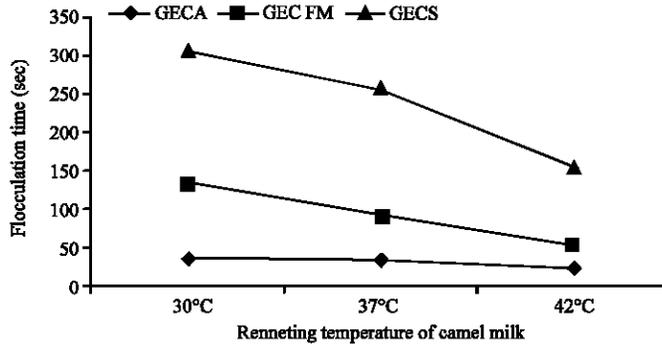


Fig. 5: Effect of renneting temperature of camel milk on the flocculation time, GEC S: Gastric enzyme extract of camel suckling, GEC FM: Gastric enzyme extract of camel with Fed Mixed, GEC A: Gastric enzyme extract old camel adult

(Fig. 4), the optimum pH for GEC FM and GEC A was 6.0 but GEC S showed a similar pH at 5.8 with both camel and bovine milk. Figure 4 shows that both GEC FM and GEC A were less sensitive to pH variation. Based on these results, bovine and camel milk appears to behave differently in function of the pH at renneting, probably due to the difference in the protein fractions of the two milks (Attia *et al.*, 2000). In fact, Lenoir *et al.* (1997) and Chazarra *et al.* (2007) found that the effect of pH of milk on flocculation was very sensitive and apparent, thus the flocculation time is further reduced if the renneting pH is far below the normal pH of milk. This is in agreement with the findings of Ramet (1985, 1993), that all clotting cheese enzymes are acid protease, that their activity is optimum at pH 5.5 and that the kappa casein presents stability at pH 5.6. This is not the case for camel milk since the slow pH drop in camel milk is not conducive to the clotting activity (Ramet, 1985, 2001).

The effect of temperature on the flocculation time of the various GEC on camel milk is shown in Fig. 5.

Increased temperatures (30, 37 and 42°C) led to a decrease in flocculation time by all GEC. However, the shortest flocculation time was obtained with GEC A, indicating that GEC could be the more stable enzyme but all the GEC showed an optimum activity and flocculation time at 42°C (Fig. 5). This is in line with the data reported by Ramet (1985, 1993), that the optimum

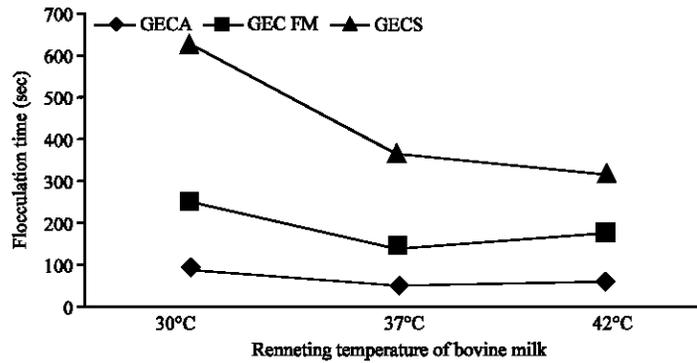


Fig. 6: Effect of temperature of bovine milk on the flocculation time, GEC S: Gastric enzyme extract of camel suckling, GEC FM: Gastric enzyme extract of camel with Fed Mixed, GEC A: Gastric enzyme extract old camel adult

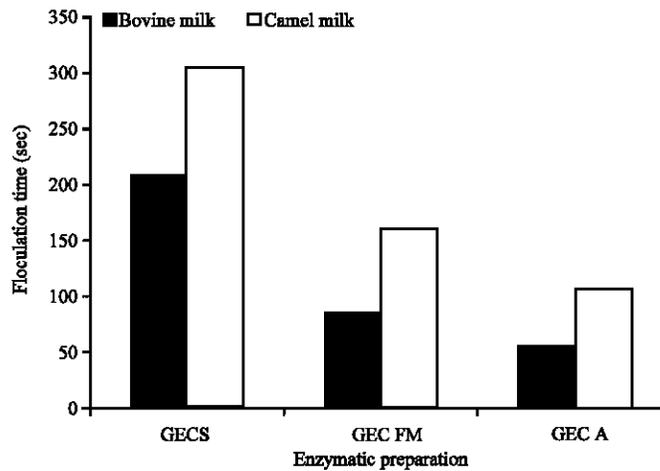


Fig. 7: Effect of enzymatic preparations on the flocculation time of camel milk and bovine milk, Means followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$, GEC S: Gastric enzyme extract of camel suckling, GEC FM: Gastric enzyme extract of camel with Fed Mixed, GEC A: Gastric enzyme extract old camel adult

temperature of most clotting enzymes were around 40-50°C, but beyond these values there was a progressive denaturation of the enzyme and at 65°C there was no activity. Similarly, Mohanty *et al.* (2003) reported that the proteolytic activity of buffalo chymosin treated at different temperatures exhibited a relatively stable proteolytic activity curve up to a temperature of 55°C after which there was a decline of the activity. Measuring the flocculation time at different temperature suggested which enzyme would be more suitable for camel milk clotting in a short period well as the manufacture of various type of cheeses, such as soft, semi-hard and hard cheese.

The effect of temperature on flocculation time of the various GEC on bovine milk is shown in Fig. 6. In contrast with camel milk, all GECs showed their optimum flocculation time at 37°C and the shortest flocculation time was obtained with GECA indicating that this enzyme had some affinity with both milk substrates (Fig. 7). In addition, the age of camels had a significant ($p \leq 0.05$) influence on the flocculation time, the older camels gave the shorter flocculation time. Ramet (1985) reported that pepsin is the minor component of rennet but its secretion increases after the lactation

period. On the other hand, Wangoh *et al.* (1993) did not conduct their study with different age of camels but their study recommended the use of gastric enzyme extracted from the abomasa of camels rather than from other species. Based on all data, the short flocculation time obtained with the GEC were probably due to the presence of pepsin which was in higher amount in GEC A compared to GEC FM and GEC S. Similarly, Ramet (1994) reported that the use of bovine pepsin provided a rapid flocculation time in camel milk compared to bovine milk. Therefore, this suggested that the content of pepsin was higher in the older camels (GECA), as previously reported by Wangoh *et al.* (1993). This finding was in contrast with the case of bovine chymosin which is extracted in younger calves. It can be concluded that the pepsin content in older camels (GECA) has more coagulating activity than proteolytic activity in camel milk due to the molecular difference in camel proteins and bovine proteins, such as the distribution and size of the casein micelles, various fractions of the casein, sites of the potential cleavage etc. It is because coagulation time varies with the micelle size and reaches an optimum in the medium and small size micelles. This appears to be related to the availability of k-casein. The content of k-casein decreases with increasing micelle size (Ekstrand *et al.*, 1980; Walstra and Jenness, 1984; Farah and Ruegg, 1989). Overall, based on the data reported and in line with other researchers' reports (Farah and Bachmann, 1987; Mehaia, 1992; Ramet, 1993; Desmazeaud, 1990; Thouvenot, 1997), this study proposes an optimum temperature at 42°C and a pH of 5.8 for an optimum clotting activity and flocculation time using gastric enzymes extracted from camels. From the results obtained it can be concluded that the crude enzymes extracted from old camels coagulate better camel milk than cow milk. Elsewhere the results of the study undertaken by Bansal *et al.* (2009), suggest that camel chymosin can be used successfully to make cheddar cheese with lower levels of proteolysis but with good flavor.

This study focused primarily on the coagulation step that represents the key step in making cheese but additional studies are necessary on the performance and characteristics of the cheese obtained with these enzymes.

CONCLUSION

The non-purified enzyme preparations (GEC) obtained from the older camels showed better coagulation activity on both milks. Flocculation time data showed that the GEC and bovine pepsin had good specificity towards bovine casein and camel casein. In addition, the short flocculation time obtained for GEC A of older camels at an optimum temperature at 42°C and a pH of 5.8 was encouraging since older camels are more available for slaughter in Algeria. Therefore, the production of GEC from older camels could be an excellent substitute for the commercial chymosin for cheese making using either bovine or camel milk. It was recommended that additional research be conducted to purify the extract, to characterize the extract using electrophoreses and finally for the production of various type cheeses from camel milk.

REFERENCES

- Al-Humaid, A.I., H.M. Mousa, R.A. El-Mergawi and A.M. Abdel-Salam, 2010. Chemical composition and antioxidant activity of dates and dates-camel-milk mixtures as a protective meal against lipid peroxidation in rats. *Am. J. Food Technol.*, 5: 22-30.
- Attia, H., N. Kherouatou, M. Nasri and T. Khorchani, 2000. Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. *Lait*, 80: 503-515.
- Bansal, N., M.A. Drake, P. Piraino, M.L. Broe, M. Harboe, P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, 2009. Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for cheddar cheese. *Int. Dairy J.*, 19: 510-517.

- Bayoumi, S., 1990. Studies on composition and rennet coagulation of camel milk. *Kieler Milchwirtschaft Forschungberichte*, 42: 3-8.
- Bergere, J.L. and J. Lenoir, 1997. The Accidents in Cheese Factory and the Defects of Cheese. In: *The Cheese*, Eck, A. and J.C. Gillis (Eds.). 3rd Edn. Technical Document Publisher, Paris, France, pp: 509-541.
- Berridge, N.J., 1952. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *J. Dairy Res.*, 19: 328-329.
- Bourdier, J.F. and F.M. Luquet, 1981. *Milk Dictionary*. Technical Documents Publisher, Lavoisier, Paris, France.
- Chazarra, S., L. Sidrach, D. Lopez-Molina and J.N. Rodriguez-Lopez, 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. *Int. Dairy J.*, 17: 1393-1400.
- Desmazeaud, M.J., 1990. Les enzymes utilisees en industrie laitiere. In: *Lait et dromadaire en Tunisie. Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, 42: 113-115.
- Ekstrand, B., M. Larsson-Raznikiewicz and C. Perlmann, 1980. Casein micelle size and composition related to the enzymatic coagulation process. *Biochim. Biophys. Acta*, 630: 361-366.
- El-Abbassy, F. and A. Wahba, 1986. Studies on camel pepsin. II. Manufacture of domiati cheese with camel pepsin. *Egypt. J. Dairy Sci.*, 14: 187-194.
- El-Zubeir, I.E.M. and S.O. Jabreel, 2008. Fresh cheese from camel milk coagulated with Camifloc. *Int. J. Dairy Technol.*, 61: 90-95.
- Elagamy, E.I., 2000a. Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: A comparison with cows and buffalo milk proteins. *Food Chem.*, 68: 227-232.
- Elagamy, E.I., 2000b. Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: A comparison with buffalo rennet. *J. Dairy Res.*, 67: 73-81.
- Farah, Z. and M.R. Bachmann, 1987. Rennet coagulation properties of camel milk. *Milchwissenschaft*, 42: 689-692.
- Farah, Z. and M.W. Ruegg, 1989. The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure*, 8: 211-212.
- Farah, Z., T. Streiff and M.R. Bachmann, 1990. Preparation and consumer acceptability tests of fermented camel milk in Kenya. *J. Dairy Res.*, 57: 281-283.
- Farah, H., 1993. Composition and characteristics of camel milk. *J. Dairy Sci.*, 60: 603-626.
- Fox, P.F., 1969. Milk-clotting and proteolytic activities of rennet and of bovine pepsin and porcine pepsin. *J. Dairy Res.*, 36: 427-433.
- Kappeler, S.R., H.J.M. van der Brink, H. Rahbek-Nielsen, Z. Farah, Z. Puhan, E.B. Hansen and E. Johansen, 2006. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342: 647-654.
- Laleye, L.C., B. Jobe and A.A.H. Wasesa, 2008. Comparative study on heat stability and functionality of camel and bovine milk whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 91: 4527-4534.
- Lenoir, J., F. Remeuf and N. Schneid, 1997. The Ability of the Milk to the Coagulation by the Rennet. In: *The Cheese*, Eck, A. and J.C. Gillis (Eds.). 3rd Edn. Technical Document Publisher, Paris, France, pp: 229-255.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Mehaia, M.A., 1987. Studies on camel milk casein micelles: Treatment with soluble and immobilized pepsin. *Arab Gulf J. Sci. Res. Agric. Biol. Sci.*, 3: 391-400.

- Mehaia, A.M., 1993. Fresh soft white cheese (Domiati-type) from camel milk: Composition, yield and sensory evaluation *J. Dairy Sci.*, 76: 2845-2855.
- Mehaia, M.A., 1992. Studies on camel milk coagulation using soluble and immobilized pepsin. *Egypt. J. Dairy Sci.*, 20: 31-40.
- Mohamed, M.A., 1990. On the composition of Somali camel milk. Ph.D Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Mohanty, A.K., U.K. Mukhopadhyay, J.K. Kaushik, S. Grover and V.K. Batish, 2003. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Dairy Res.*, 70: 37-43.
- Ramet, J.P., 1985. Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudia-Arabia. Mission Report, FAO, Rome, pp: 1-73.
- Ramet, J.P., 1993. The Technology of Cheese from Camel Milk (*Camelus dromedarius*). FAO Booklet Production and Animal Health, Rome, Italy, Pages: 118.
- Ramet, J.P., 1994. The scientific aspects and specific technology for the production of camel milk cheese. Proceedings of the Workshop on Dromedary and Camel Milk, October, 26, 1994, Nouakchott, Mauritania.
- Ramet, J.P., 1997. The Agents of Milk Processing. In: The Cheese, Eck, A. and J.C. Gillis (Eds.). 3rd Edn. Technical Document Publisher, Paris, France, pp: 165-174.
- Ramet, J.P., 2001. The Technology of Making Cheese from Camel Milk (*Camelus Dromedaries*). FAO., Rome, Italy.
- Saliha, B.H., L.C. Louis, M.M. Farida, S.A. Saliha, M. Nasma, S.O. Elkhair and M. Abderrahmane, 2011. Comparative study of milk clotting activity of crude gastric enzymes extracted from camels abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk. *Emirates J. Food Agric.*, 23: 301-310.
- Shamet, K.M., R.J. Brown and D. J. Mc Mahon, 1992. Proteolytic activity of some milk clotting enzymes on caseins. *J. Dairy Sci.*, 75: 1373-1379.
- Siboukeur, O., A. Mati and B. Hesses, 2005. Improving the ability of camel milk coagulation: use of coagulating enzyme extract from camels. *Agric. Series*, 5: 473-478.
- Singh, V.P. and N. Sachan, 2011. Nutraceutical properties of milk and milk products: A review. *Am. J. Food Technol.*, 6: 864-869.
- Thouvenot, C., 1997. Cheese in Food. In: The Cheese, Eck, A. and J.C. Gillis (Eds.). 3rd Edn. Technical Document Publisher, Paris, France, pp: 736-740.
- Valles, E. and J.P. Furet, 1977. Study of bovine abomassa for coagulating extracts containing bovine pepsin: Methods of extraction. *Milk*, 61: 601-617.
- Walstra, P. and R. Jenness, 1984. Dairy Chemistry and Physics. John Wiley and Sons, New York.
- Wangoh, J., Z. Farah and Z. Puhan, 1993. Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract. *Milchwissenschaft Milk Sci. Int.*, 48: 322-325.
- Wilson, R.T., 1984. The Camel Milk. Longman group Ltd., London, UK.