

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Département Des Sciences agronomiques

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en science agronomique

Spécialité : Transformation et conservation des produits agricoles

Thème

**Extraction et caractérisation de la pepsine
ovine et essai d'aptitude à la coagulation du lait
de vache issu de deux races différentes.**

Présenté par :

Soutenu le : 20 / 07 / 2016

M^{elle} AGROUCHE Kahina

M^{elle} SEHAKI Kania

Jury :

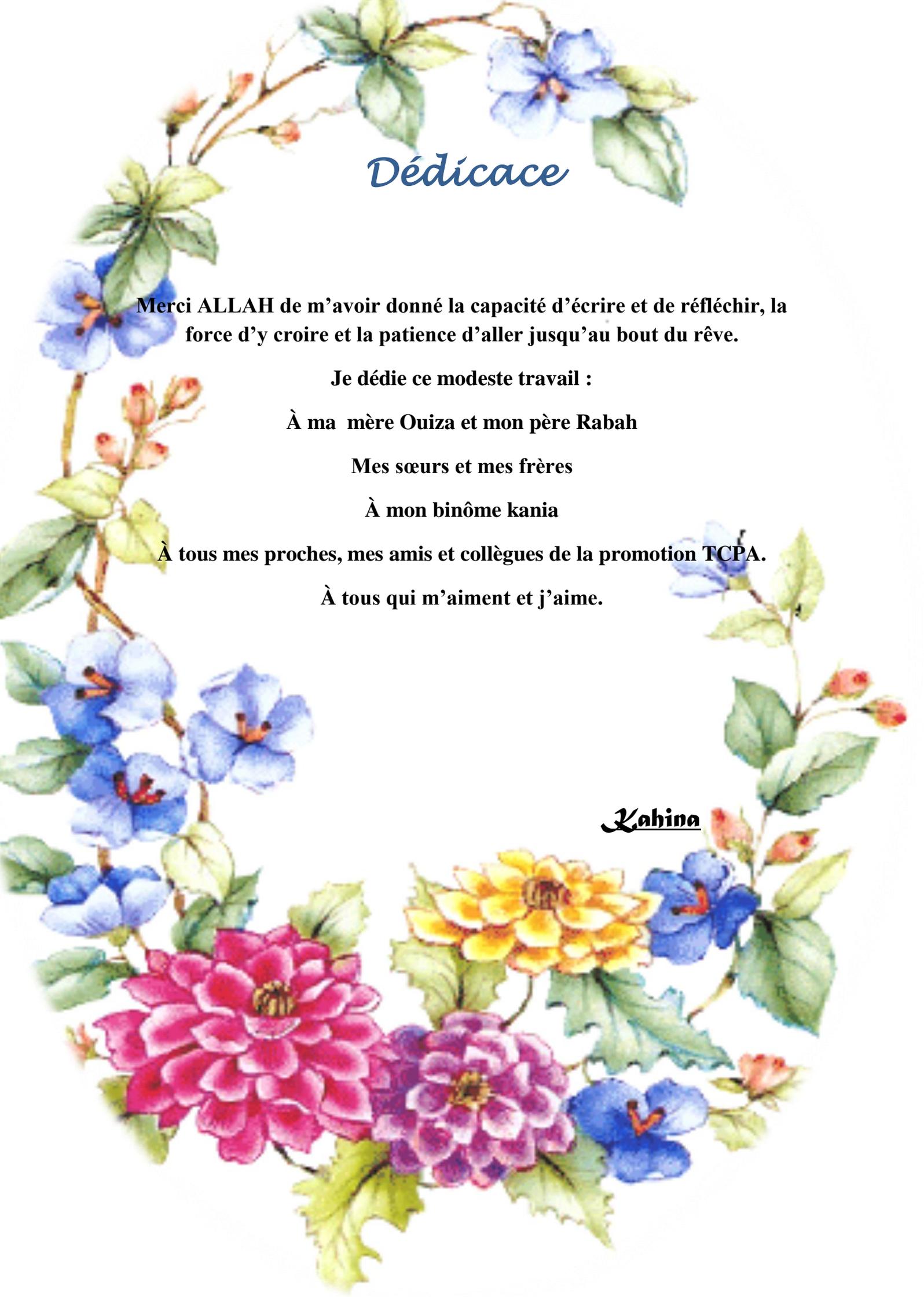
Président : Mr. SADOUDI . R Maître de Conférences A à l'UMMTO.

Promoteur : Mme REMANE BENMALLEM. Y Maître assistante B à l'UMMTO.

Examineurs : Mme HELLAL. Z Maître assistante A à l'UMMTO.

M^{elle} LAMMI .S Maître assistante A à l'UMMTO.

Année universitaire : 2015-2016



Dédicace

Merci ALLAH de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.

Je dédie ce modeste travail :

À ma mère Ouiza et mon père Rabah

Mes sœurs et mes frères

À mon binôme kania

À tous mes proches, mes amis et collègues de la promotion TCPA.

À tous qui m'aiment et j'aime.

Kahina





Dédicace

Dieu merci

Je dédie ce modeste travail:

À Ma mère DEHBIA pour son amour, ses conseils précieux et son soutien moral, je lui souhaite une longue vie pleine de bonheur et de santé.

À la mémoire de mon père, SAID que Dieu le accueille dans son vaste paradis et que son âme repose en paix.

À mon frère KAMEL a qui je souhaite la réussite.

À ma sœur DJAMILA (mimi) qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde affection.

À mes copines MALIKA et GHENIMA

À tous mes amis(es)

À ma binôme : KAHINA

À ma promotion : TCPA (2015-2016)

À tous les agronomes de L'UMMTO

À tous ceux qui luttent pour un lendemain meilleur.

Kania.



Sommaire

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION.....1

PARTIE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LE LAIT

1. Définition.....	3
2. Caractères et compositions du lait.....	3
3. Facteurs de variation de la qualité de lait	3
3.1. La race.....	3
3.2. L'âge	4
3.3. Stade de lactation.....	4
3.4. La traite.....	5
3.5. Effet de la saison.....	5
3.6. Effet de l'alimentation.....	5
3.7. Effet de l'état de santé de l'animal.....	6
4. Phénomène de la coagulation du lait.....	6
4.1. Coagulation par voie fermentaire.....	6
4.2. Coagulation enzymatique.....	6
Phase primaire ou enzymatique.....	7
Phase secondaire ou de dégradation des micelles déstabilisées.....	7
Phase tertiaire ou phase de réticulation.....	7
Coagulation mixte	7
5. les enzymes coagulantes du lait.....	7
5.1. La présure.....	7
La pepsine.....	8
La chymosine	8
5.2. Les succédanés de présure.....	8
Les succédanés d'origine animale.....	8
1. La pepsine bovine.....	8
2. La pepsine porcine.....	9
3. Pepsine avicole.....	9
4. Pepsine de morue.....	9
5. Pepsine de lapin.....	9

Les succédanés d'origine végétale.....	9
les succédanés d'origine microbienne.....	10
Succédanés bactériens.....	10
Succédanés fongiques.....	10
5.3. Les critères d'enzyme de remplacement.....	11

Chapitre II : Etude et essai de coagulation du lait

1. L'importance de l'élevage bovin en Algérie.....	12
2. La politique laitière en Algérie.....	12
3. Les races constituant le cheptel bovin laitier.....	12
3.1. La race locale.....	12
3.2. La race améliorée.....	13
3.2. La race moderne.....	13
4. Les systèmes de production en Algérie.....	13
Le système de production intensif.....	13
Le système de production extensif.....	14

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE I : OBTENTION ET CARACTERISATION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE BRUT

1. Matérielle biologique.....	15
2. Obtention de l'extrait enzymatique brute (EEB)	15
2.1. Procédé d'extraction.....	15
2.2. Concentration de l'extrait clarifié.....	18
3. Etude de l'extrait enzymatique brut.....	19
3.1. Mesure de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut.....	19
3.3. Mesure du temps de coagulation.....	20
3.4. Mesure de rendement de l'extraction (R_t).....	21
3.5. Détermination de la concentration en protéines totales.....	21
3.6. Mesure de l'activité protéolytique.....	21
3.7. Caractérisation de l'extrait enzymatique.....	22
3.7.1. Influence de la température.....	22
3.7.2. Influence de Ph.....	22
3.7.3. Influence de $CaCl_2$	22
3.7.4. Influence de la concentration en enzyme.....	22

CHAPITRE II : PRESENTATION DE LA FERME D'ETUDE

I. Présentation de la ferme d'étude.....	23
1. La région d'étude.....	23
2. le site.....	23
3. Mode d'alimentation des vaches laitières.....	25
II. Prélèvement des échantillons.....	25
III. analyse physico-chimique de lait	25
III.1. Détermination de pH du lait.....	25
III.2.L'acidité.....	25
III.3. Mesure de l'extrait sec total.....	26
III.4. Mesure de l'extrait sec total dégraissé (ESD).....	26
III.5. Dosage de la matière grasse (AFNOR 1986).....	26
III.6. Dosage des protéines totales (AFNOR, 1986).....	26
III.7.L'aptitude à la coagulation.....	26

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE I : OBTENTION ET CARACTERISATION D'UNE COAGULASE (PEPSINE OVINE)

1. Obtention et caractérisation de l'extrait enzymatique brut.....	28
1.1. Mesure de rendement d'extraction (R_t).....	28
1.2. Détermination de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut.....	29
1.3. Dosage des protéines totales.....	29
1.4. L'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brute.....	30
2. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut	31
2.1. Influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante.....	31
2.2. Influence de la température du lait sur l'activité coagulante.....	33
2.3. Influence du pH du lait sur l'activité coagulante.....	34
2.4. Influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante.....	35
3. Aptitude de lait standard à la coagulation par l'EEB et EECL.....	37

CHAPITRE II : EFFET DE RACE SUR LA QUALITE DU LAIT

1. Résultats de l'analyse physico- chimique du lait.....	38
1. 1 Le pH et l'acidité.....	39
1.2.Variation du taux butyreux.....	40
1.3Variation du taux protéique.....	41
1.4.Variation de l'extrait sec totale (EST) et l'extrait sec dégraissé (ESD).....	42
1.5.Temps de coagulation de la présure et l'extrait enzymatique clarifié.....	44

CONCLUSION GENERALE.....	4
---------------------------------	----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUME

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR: Association Française de Normalisation

BLA: Bovin laitier amélioré

BLL: Bovin laitière locale

BLM: bovin laitier moderne

BSA : Bovin Sérum Albumine

D° : degré dornique

E : enzyme

EE : extrait enzymatique

EEB : Extrait Enzymatique Brut

EEc : Extrait enzymatique concentré

EEcl : Extrait enzymatique clarifié

ESD : Extrait Sec Dégraissé

EST : Extrait Sec Totale

M: Molarité

M.A.T: Matière Azotée Totale

MG: Matière grasse

m/l : Mole par litre

MS: Matière Sèche

ONIL : Office National Interprofessionnel du lait

R_t : Rendement

T.A.C: Acide Trichloracétique

TB: Taux Butyreux

T_c: Temps de Coagulation

TCEcl : temps de coagulation de l'extrait clarifié

TCP : temps de coagulation de la présure

T/mn : Tours par minute

TP: Taux Protéique

Listes des figures

page

Figure n°1 : caillette ovine.....	15
Figure n°2 : les principales étapes d'extractions de la pepsine ovine.....	17
Figure n° 3 : Extrait enzymatique brute.....	18
Figure n°4 :l'extrait enzymatique concentré.....	19
Figure n°5 : image représentative de la zone d'étude frikat.....	24
Figure n°6 : localisation de site d'études dans la Daïra de Draa El Mizan.....	24
Figure n° 7 : Evolution de l'activité protéolytique de l'EEcl.....	30
Figure n°8: influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique clarifié et concentré	32
Figure n°9 : influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique clarifié et concentré	33
Figure n°10: influence de pH sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique clarifié et concentré	35
Figure n°11 : influence de la concentration en CaCl ₂ sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique clarifié et concentré	36
Figure n°12valeurs moyennes des pH et l'activité des laits analysées.....	39
Figure n°13 : valeurs de taux butyreux des échantillons du lait analysés.....	40
Figure n°14: les taux de protéine des échantillons du lait analysés.....	42
Figure n°15 : valeurs moyennes de l'EST et l'ESD.....	43
Figure n°16: variation de temps de coagulation par la présure et la pepsine ovine en fonction de la race	44

Liste des tableaux**page**

Tableau n°1 : chiffre clé par race /caractéristique des lactations en 2001.....	4
Tableau n°2 : les volumes de l'extrait enzymatique brut et l'extrait enzymatique concentré récupéré après les opérations d'extractions.....	28
Tableau n°3 : variation de temps de coagulation de lait standard par l'EEC et l'EECL.....	37
Tableau n°2 : analyse statistique (teste t STUDENT) de différentes paramètres du lait de la race Montbéliarde et Holstein.....	38

Introduction

De part sa composition le lait est considéré comme étant un aliment parfaitement adapté aux besoins nutritionnels et physiologiques du corps humain à tout stade de la vie, mais la courte durée de sa conservation a conduit à sa transformation en caillé. Cette technique est utilisée dans les industries fromagères pour la fabrication de fromage.

Il est connu depuis longtemps que l'homme a utilisé plusieurs méthodes pour faire cailler le lait de ses chèvres, brebis et ses vaches, dont l'enzyme coagulante était juste d'origine végétale, la plus connue est extraite du figuier, qui a été utilisée pour la première fois par les Bergers grecs. Mais avec la technologie, plusieurs techniques d'extraction de l'agent coagulant ont été développées.

La présure animale qui renferme essentiellement de la chymosine, constitue l'agent coagulant le plus utilisé dans la coagulation enzymatique du lait. Elle est extraite à partir des caillettes de veau non sevrés, ce qui affecte lourdement les coûts par la faiblesse du rendement en viande. Selon **Ramet, (1997)** l'utilisation de la présure, comme agent coagulant le lait, est confrontée à la contrainte de sacrifice des jeunes veaux, en conséquence l'industrie fromagère subit une crise d'approvisionnement de ce coagulant. Cette situation a donné une impulsion aux recherches sur les enzymes de remplacement de la présure.

Pour cela et pour répondre aux exigences des industries fromagères, plusieurs recherches ont été faites pour trouver d'autres enzymes de remplacement.

En effet, différentes protéases obtenues à partir de plantes, d'animaux, de bactéries et de moisissures ont été proposées, mais seulement un nombre limité a dépassé le stade expérimental. D'après **Anifantakis et Kandarakis, (1983)**, la principale contrainte est liée aux activités protéolytiques indésirables développées par ces succédanés, et qui affectent le rendement fromager et la qualité organoleptique des produits finis.

Certains succédanés d'origine animale, en l'occurrence bovine, ovine..... peuvent être considérés comme des produits de remplacement acceptables de la présure de veau ; il convient toutefois de signaler comme pour la présure, que leur disponibilité reste tributaire du marché de la viande. (**Eck, 1987**).

Dans notre travail on s'intéresse à l'extraction et la caractérisation d'une protéase coagulant le lait dénommée la pepsine ovine, issue des caillettes d'ovins adultes, puis sa concentration, par la suite, son utilisation pour la coagulation du lait cru issu de deux races de vaches différentes : Montbéliarde et Holstein.

Dans cette étude la première partie est réservée à la revue bibliographique, dans laquelle on donnera quelques généralités sur les enzymes de coagulation de lait, ainsi que les facteurs influençant la production laitière, et un aperçu sur l'élevage bovin en Algérie. Une seconde partie est consacrée à la description du matériel et méthodes nécessaires pour la réalisation de notre travail. Les résultats obtenus sont détaillés dans la troisième partie.

Chapitre I : généralité sur le lait

1. Définition :

D'après la définition du premier congrès international pour la répression des fraudes à Genève ; en 1908, le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie, il doit être exempt de colostrum.

2. Caractères et compositions du lait

Le lait est un liquide de couleur généralement blanchâtre, légèrement visqueux, sa saveur est douce et son odeur faible mais identifiable, le pH du lait est voisin de la neutralité. ces caractères physico-chimique varient selon les espèces, les races et également la lactation.

Il contient les trois principaux nutriments (glucides, lipides, protéines), les sels minéraux comme (le calcium, le phosphore et les vitamines).

3. Facteurs de variation de la qualité de lait

3.1. La race

Généralement les races les plus laitières présentent un plus faible taux de matières grasses et protéiques, or le choix d'une race repose sur un bilan économique global, c'est pour quoi un éleveur a tendance à privilégier les races qui produisent un lait de composition élevée (Andelot, 1983).

Tableau n°1 : Chiffres clé par race (caractéristique des lactations) en 2001

Races	Durée de lactation (jour)	Production moyenne (Kg)	TB (g/Kg)	TP (g/Kg)
Prime Holstein	326	7679	40,7	31,5
Montbéliarde	295	6110	38,8	32,4
Normande	302	5410	43,5	34
Abondance	287	5001	37,3	32,7
Brune des alpes	320	6470	40,8	33,5
Simmental	290	5240	40	33,2
Pie rouge des plaines	300	6296	42	32,4
Tarentaise	269	4007	35,9	32
Salers	243	2407	33,2	32,8
Jersiaise	299	4181	56,4	32,4
Vosgienne	302	5415	40,1	32,5
Flamande	302	5415	40,1	32,5
Bleue de Nord	281	4422	36,8	30,7
Blanc Bleue	186	4693	36,4	30,8
Bretonne pie noire	261	2308	44	33,3

Source : Cauty et Perreau (2003)

3.2. L'âge

Avec l'avancement de l'âge des vaches, il y a une altération des capacités de synthèse du tissu sécréteur et une augmentation de la perméabilité tissulaire, en particulier sous l'effet des mammites survenues au cours des lactations précédentes. Ceci affecte positivement la teneur de lait en protéines et négativement le rapport caséines/protéines, notamment après la 4^{ème} lactation et lorsque la numération cellulaire augmente au de là de 200 000 cellules/ml (Coulon *et al.*, 1998)

3.3. Stade de lactation

Les teneurs du lait en matières grasses et protéiques évoluent de façon inverse à la quantité du lait produite

Elevées au début de lactation après un palier de 15 à 140 jours, les taux croissent plus rapidement dans les trois derniers mois de lactation (**Charon, 1986**).

3.4. La traite

La composition du lait excrété varie au cours du traite. L'allongement de l'intervalle entre deux traites peut faire baisser le taux butyreux du lait de la 2^{ème} traite, d'où la nécessité de traire à des heures régulières pour favoriser une activité normale de la mamelle.

3.5 . Effet de la saison

La saison est parmi les facteurs importants de variation de la composition du lait, elle entraîne des changements hautement significatifs de toutes les variables étudiées. La teneur en matières azotées et la composition en acides gras varient d'une manière plus systématique, avec la saison que le taux butyreux. (**Masson et al., 1978**)

3.6. Effet de l'alimentation

L'alimentation n'est pas un des principaux facteurs de variation du lait mais elle est importante car elle peut être modifiée par l'éleveur. (**Charon, 1986**).

Selon **Stoll (2003)**, un déficit protéique de longue durée dans une ration des vaches laitières peut engendrer de fortes baisses du taux protéique du lait. D'une part, un manque de matières azotées pour les microorganismes conduit à une réduction de leur activité en conséquence une baisse de la digestibilité des aliments et ainsi une diminution des apports énergétiques à la vache. D'autre part, la synthèse des protéines microbiennes ralentit, entraîne une diminution de protéines du lait.

3.7. Effet de l'état de santé de l'animal

Toute affection se traduit chez la vache en lactation par une baisse de production, le mauvais fonctionnement rumen ou du foie, et les mammites perturbent la sécrétion lactée (**Durand, 1974**).

Dans le cas des mammites, le lait subit des modifications importantes par l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium mammaire qui permet à certains constituants du sang de passer dans le lait, on constate alors que les teneurs en lactose, en caséine, lipides totaux et l'acide citrique diminuent, tandis que les concentrations en protéines sériques et matières

minérales augmentent. En plus on constate aussi l'augmentation du taux des plasmines, protéines naturelles du lait, ce qui entraîne une dégradation importante des caséines β , et l'apparition de peptides que l'on peut regrouper sous l'appellation de caséines γ et de protéases-peptones (Desmaseaud, 1994).

Le lait provenant des vaches atteintes de mammites, présente un rendement fromager diminué et des difficultés de coagulation.

4. Phénomène de la coagulation du lait

La coagulation est une étape fondamentale dans la fabrication de fromage, elle peut être obtenue soit par voie fermentaire à l'aide des bactéries lactiques, soit par voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes, ou par action mixte.

4.1. Coagulation par voie fermentaire :

Consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ($pH_i=4,6$) par acidification biologique à l'aide des ferments lactiques ou par acidification chimique (injection de CO_2 , addition de glucano-6-lactane, ou ajout de protéines sériques à pH acide (Jeantet et al., 2007)

4.2. Coagulation enzymatique

Consiste à la transformation du lait de l'état liquide à l'état gel par action d'enzymes protéolytiques, les plus souvent d'origine animale.

A. Phase primaire ou enzymatique :

Correspond à l'hydrolyse de la caséine κ au niveau de la liaison phényle alanine (105) et méthionine (106) ;

B. phase secondaire ou de dégradation des micelles déstabilisées :

Cette phase commence à pH 6,6 lorsque 80 à 90% de la caséine κ est hydrolysée (Jeantet et al., 2007).

Elle correspond à la coagulation proprement dite, qui nécessite absolument les ions calcium, mais qui ne peut pas se produire à 0°C (Desmaseaud et Spinnles, 1997).

C. Phase tertiaire ou phase de réticulation

Conduit à la formation du gel (**Jeantet et al., 2007**). Les micelles agrégés subissent de profondes réorganisations par la mise en place des liaisons phosphocalciques qui peuvent former des ponts disulfures entre les paracaséines (**Mahaut et al., 2000**).

4.3. Coagulation mixte :

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification lactique. Pour la plupart des fabrications, la coagulation est obtenue par voie enzymatique et s'accompagne d'une acidification dont l'intensité varie avec le type de fromage désiré (**Stall, 1996**).

Le coagulum obtenu présente des caractères propres se situent entre ceux d'un gel lactique et de la présure (**Eck, 1990**).

5. les enzymes coagulantes du lait

5.1. La présure

La présure est l'agent coagulant traditionnellement utilisée pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages.

La dénomination « présure » est donnée à l'extrait coagulant provenant du quatrième estomac (caillettes) du jeune ruminant abattu avant sevrage (**Lenoir et al., 1985**).

Selon **Pien(1974)**. Elle doit son pouvoir à une enzyme particulière : La chymosine qu'elle renferme à (80%), celle-ci est souvent accompagnée d'une autre enzyme : La pepsine (20%).

La proportion relative de ces deux enzymes varie avec l'âge de l'animale à partir du quel la présure est extraite.

En effet, l'enzyme récupérée d'un animal adulte contient 90% à 95% de pepsine et seulement 6 à 10% de chymosine (**Brome et al., 1998**).

A. La pepsine

La pepsine est une protéase acide présente dans le suc gastrique de tous les mammifères et les oiseaux.

L'une de ces remarquables caractéristiques est sa grande activité dans des milieux très acides.

Selon **Grandy (1978)**, la pepsine est relativement stable à des pH compris entre 5 et 5,5, avec un optimum d'activité vers un pH de 1,8 qui varie selon la nature du substrat, elle est

thermosensible en solution à 55°C et complètement dénaturée au de là de 70°C (**Gour Soud, 1999**).

B. La chymosine :

La chymosine représente la majeure partie de la présure, elle est caractérisée par un Effet coagulant important conduit à la coagulation du lait par déstabilisation des micelles de caséines qui sont attaquées en surface par l'enzyme. (**Payens, 1989**).

Le pH optimum d'action de cette protéase est de 5,1 à 5,5, (**Fox et Mulvihille, 1990**). Au pH du lait 6,2 – 6,6, la chymosine représente plus de 80% de l'activité coagulante.

5.2. Les succédanés de présure

Sont des enzymes ou bien des mélanges d'enzymes qui ont les mêmes propriétés que La présure et qui peuvent la remplacer efficacement et à moindre coût.

Le classement qui se fait de nos jours sur les succédanés de présure se base sur leur origine .selon (**Mahaut et al., 2000**) on a trois catégories de coagulases qui sont les coagulases d'origine animale, microbienne et végétale.

a. Les succédanés d'origine animale

1. La pepsine bovine :

C'est l'une des constituant de la présure, la sécrétion de cette enzyme devient importante après sevrage. Cette protéase devient inactive à des valeurs de PH au dessus de 6,7.

2. La pepsine porcine

La pepsine porcine est une protéase à caractère plus acide que la chymosine, son activité est bonne en milieu acide. Mais décroît fortement au-dessus de ph 6,3, mélangé à la présure à raison de 50/50, la pepsine porcine paraît être d'une utilisation plus large surtout dans les pays anglo-saxons (**Ech, 1990**).

3. Pepsine avicole :

La pepsine d'origine avicole extraite du pro ventricule du poulet a fait l'objet de plusieurs études pour être utilisée comme remplaçante de la présure dans la fabrication de fromage de

type **cheddar** et **Emmenthal**, la coagulase extraite du pro ventricule du poulet *Galus galus* a été utilisée également pour la fabrication du fromage type camembert, les résultats obtenus n'ont pas révélé de différences notables sur le rendement et sur la qualité organoleptique comparant au camembert issu de la présure (Morsli, 1997).

4. Pepsine de morue :

Des extraits enzymatiques à base de pepsine extraite de la paroi interne de l'estomac de la morue coagule le lait à 15°C, c'est la meilleure température d'activité comparant à la chymosine du veau (Breuler et al. 1984, Serban, 1993).

5. Pepsine de lapin :

Ce type de succédané est utilisé au Sahara (Ahggar) par les nomades qui ont fabriqués du fromage à partir du lait de dromadaire en utilisant des morceaux extraits d'estomac du lapin qui contient de la pepsine.

b. Les succédanés d'origine végétale

Plusieurs espèces végétales ont été utilisées comme source de coagulase, bien longtemps avant les micro-organismes.

Entre autre, *la Ficine de latex du figuier* (Chadat et Rouge 1906). La bromeline extraite du jus d'ananas (Cattaneo et al. 1994 ; Froc, 2001), la papaïne extraite de la papaye (Cabezas et al. 1981 ; Froc, 2001).

Ces protéases végétales sont extraites à partir de divers organes de plantes supérieurs (feuilles, fleurs, fruits et graines). généralement les coagulases d'origine végétales sont rarement utilisées dans la fabrication de fromages industriels, leur utilisation est limité dans la fabrication traditionnelle comme le fromage frais « Djben » fabriqué à base d'extrait enzymatique issus de *Cynara cardunculus*, ou de *Ficus carica* dans les régions montagneuses.

c. les succédanés d'origine microbienne

Grâce à leur aptitude en fromagerie les enzymes microbiennes sont considérées comme une source importante de production de coagulase et aussi pour le remplacement de la présure.

On distingue deux types de succédanés microbiens selon leur origine :

A. Succédanés bactériens

Comme le nom l'indique ce type de succédané provient des bactéries, ces dernières ont une activité protéolytique très élevée.

Aucune préparation de ces enzymes bactérienne n'a dépassé le stade expérimental, on cite à quelques espèces qui de part leur activité protéolytique pourront faire office de succédanés de présure (**Bouslier, 1974**).

Bacillus brevis, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, micrococcus lipiticus, streptococcus feacalis.

B. Succédanés fongiques

Les résultats obtenus en utilisant ces coagulases sont très satisfaisants en comparant aux bactéries.

Leur utilisation a dépassé l'expérimentation, plusieurs préparations à base de ces enzymes ont été commercialisées sur le marché international.

5.3. Les critères d'enzyme de remplacement

Tous les succédanés de présure doivent présenter certains nombres de critères pour qu'ils soient aptes à une utilisation industrielle, les plus importants de ces critères sont les suivants (**Boudier, 1974**).

- Odeur et couleur faible.
- Bonne solubilité dans l'eau.
- Absence de toxines.
- Une bonne activité coagulante dans les conditions standards de mesure.
- Une activité protéolytique faible.
- Le rendement fromager doit être élevé.
- Absence d'amertume et de friabilité du caillé.
- Longue période d'activité de l'enzyme.

Chapitre II : Situation de l'élevage bovin en Algérie

1. L'importance de l'élevage bovin en Algérie

L'élevage bovin joue un rôle important dans l'économie agricole algérienne. Il contribue à la couverture de besoins nationaux en protéines animales, mais aussi à la création d'emploi en milieu rural (Mouffok, 2007).

2. La politique laitière en Algérie

Le développement de la production nationale de lait cru et son intégration dans le secteur industriel est un choix stratégique, maintes fois réaffirmés par les pouvoirs publics. Il s'agit d'un défi à relever pour diminuer la dépendance en poudre de lait, et en matières grasses laitières importées en contribuant à mettre fin d'une manière définitive à la vulnérabilité de l'Algérie en matière de couverture de ses besoins en lait et assurer sa sécurité alimentaire.

La politique des quotas laitiers (distribution de la poudre par l'ONIL) doit être un outil de développement de la production nationale du lait cru et non l'inverse, et également de stabiliser les dépenses budgétaires pour le lait en maintenant le soutien des prix à la consommation pour le lait en sachet et de garantir la stabilité des prix aux producteurs laitiers.

3. Les races constituant le cheptel bovin laitier

On distingue 3 catégories de cheptel bovin laitier en Algérie qui sont : la race locale, la race améliorée et la race moderne.

3.1. La race locale

Ce type de race est rarement à l'état pur, très rustique et de petit gabarit. Cette race est conduite en système extensif par des éleveurs privés assurant une production mixte (viande et lait), elle est généralement nommée GUELMA ou CHEURFA (Korchi, 1990).

Présente 39% du cheptel national et assure 20% de la production laitière (Mimouni, 2000).

Les performances de production de la race locale sont généralement médiocres, elles sont en revanche composées par de remarquables facultés d'adaptation au milieu (Hassas, 2000).

3.2. La race améliorée

Elle est issue de multiples croisements entre les populations locales et les races importées. Parmi ces races on cite : La Tarentaise, la Charolaise et la Schwitz.

En 1998, ce cheptel était estimé à 555 000 têtes, soit 42% à 43% du troupeau, et assurait 42% environ de la population (**Boulahchiche, 1997, Bencharif, 2001**).

3.3. La race moderne

Elle se situe au niveau des plaines et périmètres irrigués du nord les zones à haut potentiel de production fourragères.

C'est un élevage intensif localisé pour sa majorité au niveau du secteur public ; constitué par la Montbéliarde et la Holstein (**Hassas, 2000**). La production laitière dite « moderne », qui repose sur un cheptel bovin de 120 000 à 131 000 vaches importées à haut potentiel génétique, soit autour de 9% à 10% de l'effectif national, assure environ 40% de la production nationale totale du lait de vache (**Bencharif, 2001**).

4. Les systèmes de production en Algérie

D'après **yakhlef, 1989**, l'élevage bovin algérien est hétérogène, il se caractérise par l'existence de deux systèmes productifs, l'un intensif basé sur des races importées à haut potentiel génétique et l'autre extensif comportant des races locales (**Anonyme, 2007**).

a. Le système de production intensif

Ce système est dit BLM, « bovin laitier moderne », se localise dans les zones à fort potentiel d'irrigation autour des villes (**Bencharif, 2001**), cet élevage est constitué de diverses races bovines importées, spécialisé principalement dans la production laitière, il est détenu pour sa majorité par le secteur public. (**Anonyme, 2007**).

D'après **Nedjraoui (2001)**, la taille des troupeaux reste variable d'une exploitation à une autre.

b. Le système de production extensif

Le système de production « extensif » dit « bovin laitier amélioré » BLA, renferme les races locales et les races croisées, localisées dans les zones montagneuses et forestières, ce système est orienté vers la production de viande (78% de la production nationale), la taille des ateliers est relativement réduite, 1 à 6 vaches (**Bencharif et Nedjraoui, 2001**).

Chapitre I : Obtention et caractérisation de l'extrait enzymatique brut

1. Matérielle biologique

La matière biologique utilisée dans cette étude, pour extraire la pepsine ovine est constituée des caillettes d'ovins adultes, récupérées à l'état frais, au niveau de l'abattoir de Tizi-Ouzou. Ces dernières sont ensuite lavées à l'eau de robinet puis dégraissées, découpées, broyées à l'aide d'un mixeur, conditionnées dans des boîtes en plastique, puis congelées à -18°C pendant 24 à 48h.

La décongélation se fait d'une manière progressive pour éviter les chocs thermiques à des températures ambiantes.



Figure n °1 : image d'une caillette ovine

2. Obtention de l'extrait enzymatique brute (EEB)

2.1. Procédé d'extraction

L'extraction s'effectue selon la méthode de **Valles et Furet (1977)**. Après décongélation, on verse le broyat des caillettes dans un bécher en verre pour prendre son poids, en suite on le soumet à une macération dans une solution de HCL 0,2 M, en respectant le rapport (P /V), (poids des caillettes X 1,25) ml d'une solution d'HCL 0,2M rajoutée sur les caillettes, puis on procède à la pesée, en suite on agite un peu avec une spatule propre, le mélange est porté à

40°C dans un bain marie et maintenu pendant 45 à 60 min, en agitant de temps en temps. À la fin de l'incubation les résidus des caillettes sont séparés à l'aide d'une passoire.

A la macération brute obtenue on ajoute 1% (V/V) en volume d'une solution de sulfate d'aluminium (1M) et 5%(V/V) d'une solution de sulfate disodique (1M), chauffée à 42°C après agitation et repos de quelques minutes, le mélange est filtré sur papier wathman, le filtrat ainsi obtenu est pesé en (g) : c'est l'extrait enzymatique brute (EEB).

La figure 1 résume les principales étapes d'extraction de la pepsine ovine.

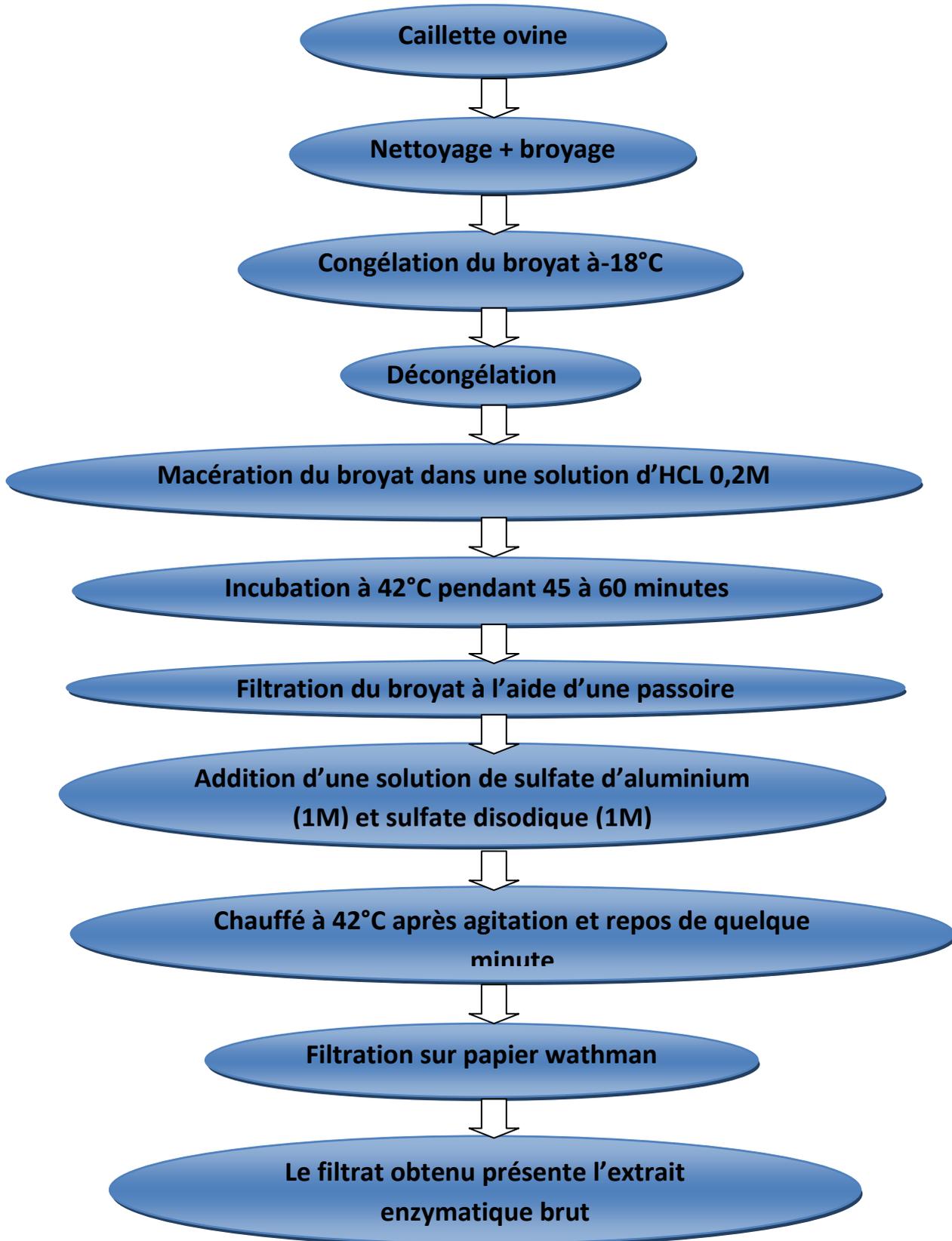


Figure n°2: les principales étapes d'extraction de la pepsine ovine (Valles et Furet ,1977)



Figure n° 3 : Extrait enzymatique brute

2.2. Concentration de l'extrait clarifié

Après filtration, on prend un poids donné de macération clarifiée au quel on rajoute deux fois son poids d'une solution saturée de NaCl qui contient 1% V/V d'HCl concentré $d=1,19$.

Le mélange est agité et laissé au repos pendant 1h, on procède à une centrifugation à 2100T/min pendant 20min, afin de récupérer le culot et rejeter le surnageant, on note ensuite le poids du précipité humide, et on lui rajoute une quantité déterminée d'eau distillé 10% P/V.

Le pH est ajusté à 5,5 par une solution de phosphate disodique 1M, la conservation est réalisée à 4°C après l'addition de quelques grammes de thymol.

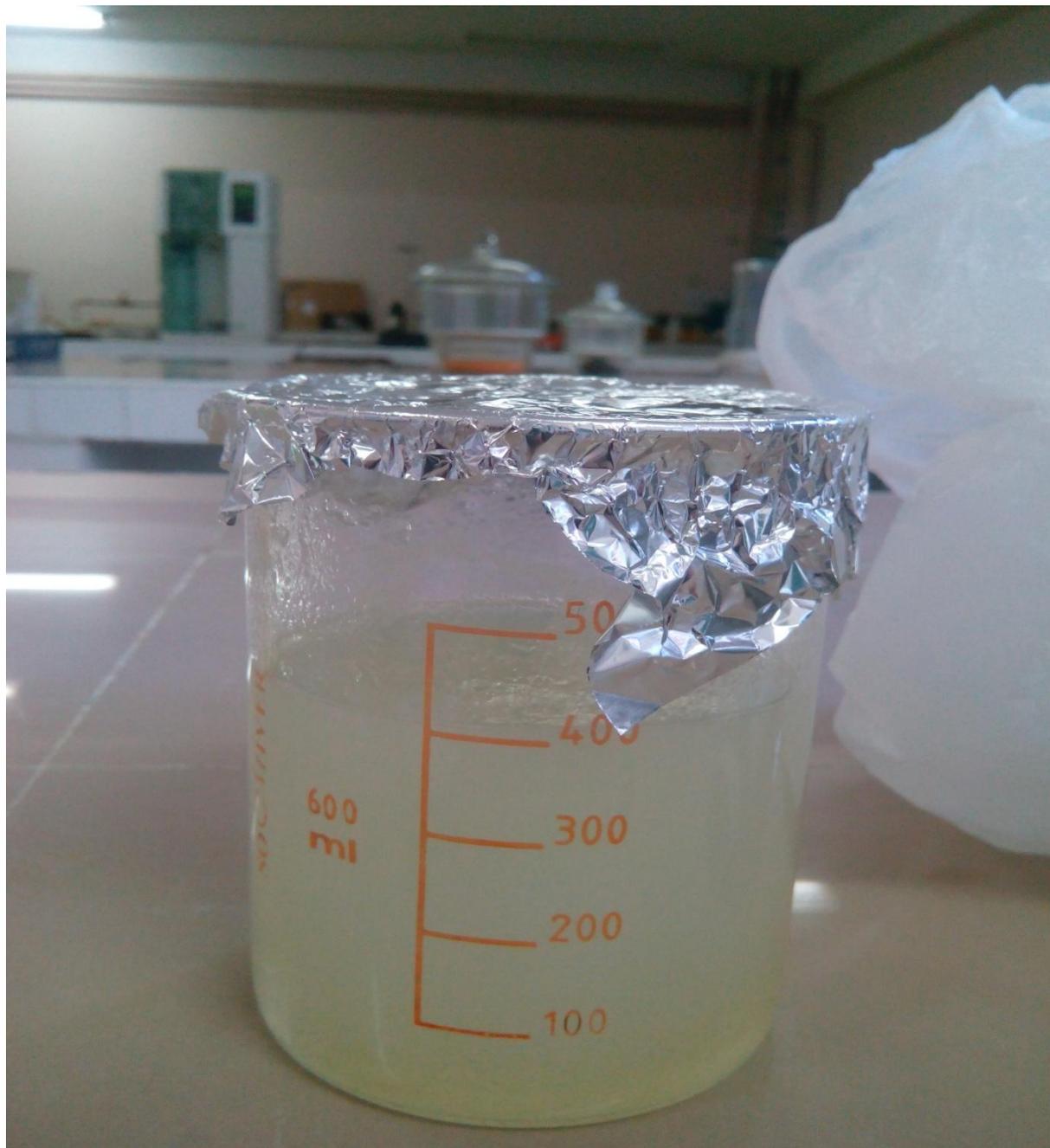


Figure n°4 :l'extrait enzymatique concentré

3. Etude de l'extrait enzymatique brut

3.1. Mesure de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut

L'activité coagulante ou la force coagulante de l'extrait enzymatique brut (EEB) est déterminée selon la méthode de **soxhlet** décrite par **Tsoulet (1979)**. Cette méthode permet

d'exprimer l'activité de l'extrait enzymatique en force coagulante (unité soxhlet : US). Cette force coagulante définit le volume du lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique en 40 minutes, à 35°C.

L'évaluation de cette mesure est fixée dans les conditions standards suivantes :

- Volume de la solution enzymatique **1ml.**
- Volume du lait à coaguler (substrat de Berridge) **10ml.**
- Température du lait **35°C.**
- pH de lait **6,4.**

Cette force est calculée par la formule suivante :

$$F = \frac{2400 \times V}{T_c \times v}$$

Avec :

- **F** : force coagulante de l'extrait enzymatique ;
- **V** : volume du substrat de Berridge ajuster à pH 6,4 et porté à 35°C ;
- **v** : volume de la solution enzymatique ;
- **T_c** : temps de coagulation en seconde ;

3.2. Préparation de substrat de Berridge (Annexe n°2)

3.3. Mesure du temps de coagulation

Le temps de coagulation est mesuré par la méthode de **Berridge** rapporté par **collin et al. (1977)**, dont le principe consiste à ajouter 1ml de l'extrait enzymatique à 10ml du substrat de Berridge incubé à 35°C.

Le temps de coagulation correspond à l'intervalle de temps compris entre l'addition de la solution enzymatique et l'apparition des premiers flocons de caséines sur les parois internes du tube à essai, et qui sont visibles à l'œil nu.

3.4. Mesure de rendement de l'extraction (R_t)

D'après **Valles et Furet (1981)**, l'estimation de la quantité d'enzyme récupérée à partir d'un poids donné de matière première mise en œuvre est exprimée par le rendement d'extraction (R_t). Ce dernier est déterminé en unité d'activité coagulante pour 1g de caillette.

$$R_t = \frac{A_c \times P_{\text{extrait}}}{P_{\text{caillette}}}$$

Avec :

- P_{extrait} : poids de l'extrait enzymatique ;
- $P_{\text{caillette}}$: poids de caillette ;
- A_c : Activité coagulante

3.5. Détermination de la concentration en protéines totales

La concentration en protéines totales de l'extrait enzymatique brute est déterminée par la méthode **Lowry et al. (1951) (Annexe n°3)**.

C'est une méthode colorimétrique par référence à une courbe étalon préalablement établie suite à l'utilisation d'une solution standard de sérum d'albumine bovine (B.S.A) (**annexe n°3**).

3.6. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique des extraits enzymatiques est déterminée selon la méthode de **Green et Stackpoole (1975), (Annexe n°4)**

L'objectif de cette méthode est d'évaluer le taux de dégradation des caséines pendant la réaction primaire, de ce fait, on mesure la concentration en produits d'hydrolyse de la caséine exprimé en concentration de tyrosine soluble dans l'acide trichloracétique (TCA à 12%), une fois la réaction est arrêtée par l'ajout de TCA, on procède à une centrifugation qui permet de séparer le précipité de caséine et le produit d'hydrolyse. Le dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode de **Lowry et al. (1951)**.

3.7. Caractérisation de l'extrait enzymatique

La caractérisation de l'extrait enzymatique se fait par la détermination des conditions optimales de l'activité coagulante, cette dernière qui peut être modifier par plusieurs facteurs en particulier le pH, la concentration en CaCl_2 , et la température.

L'extrait enzymatique clarifié subit une dilution de façon à obtenir un temps de coagulation voisin de 12min.

3.7.1. Influence de la température

La température optimale de l'activité coagulante de notre enzyme est déterminée en observant le temps de coagulation le plus court du lait, porté à des températures allant de 25 à 65°C avec un intervalle de 5°C.

3.7.2. Influence de pH

Le pH optimum d'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été déterminé en mesurant le temps de coagulation tout en faisant varier le pH du lait de 5,2 à 7 avec un intervalle de 0,2.

3.7.3. Influence de CaCl_2

La concentration optimale en CaCl_2 du lait est déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait additionné des quantités de CaCl_2 variant de 0,02 à 0,4M/L avec un intervalle de 0,02.

3.7.4. Influence de la concentration en enzyme

L'activité relative correspond au temps de coagulation le plus court, elle est mesurée en faisant varier la concentration en protéines de l'extrait enzymatique par des dilutions de 0,005 à 0,1.

Chapitre II : Etude et essai de coagulation du lait

I.Présentation de la ferme d'étude

1. La région d'étude

La wilaya de Tizi -Ouzou est située à 100 Km à l'est de la capitale Alger, à 125 Km à l'ouest de Béjaia et à 30 Km au sud des côtes méditerranéennes.

Tizi- Ouzou se situe dans la zone du climat méditerranéen. Toute fois, en raison du massif montagneux qui entoure la ville, il peut parfois neiger en hiver. En été, la chaleur peut être suffocante car l'air marin se heurte au relief montagneux qui l'empêche d'atteindre la ville

2. le site

La ferme Taib est une propriété privée, sise dans le village Tighilt Laabid appartenant à la commune de Frikat daïra de Draa El Mizan wilaya de tizi-ouzou, située à 50Km au sud-ouest de Tizi-Ouzou et à 115 Km environ au sud-est d'Alger.

Son territoire est délimité :

- au nord par la commune d'Ain Zaouïa ;
- à l'est, par la commune de bounouh ;
- au sud, par la wilaya de bouira ;
- à l'ouest et au nord –ouest, par la commune de Draa El Mizan.

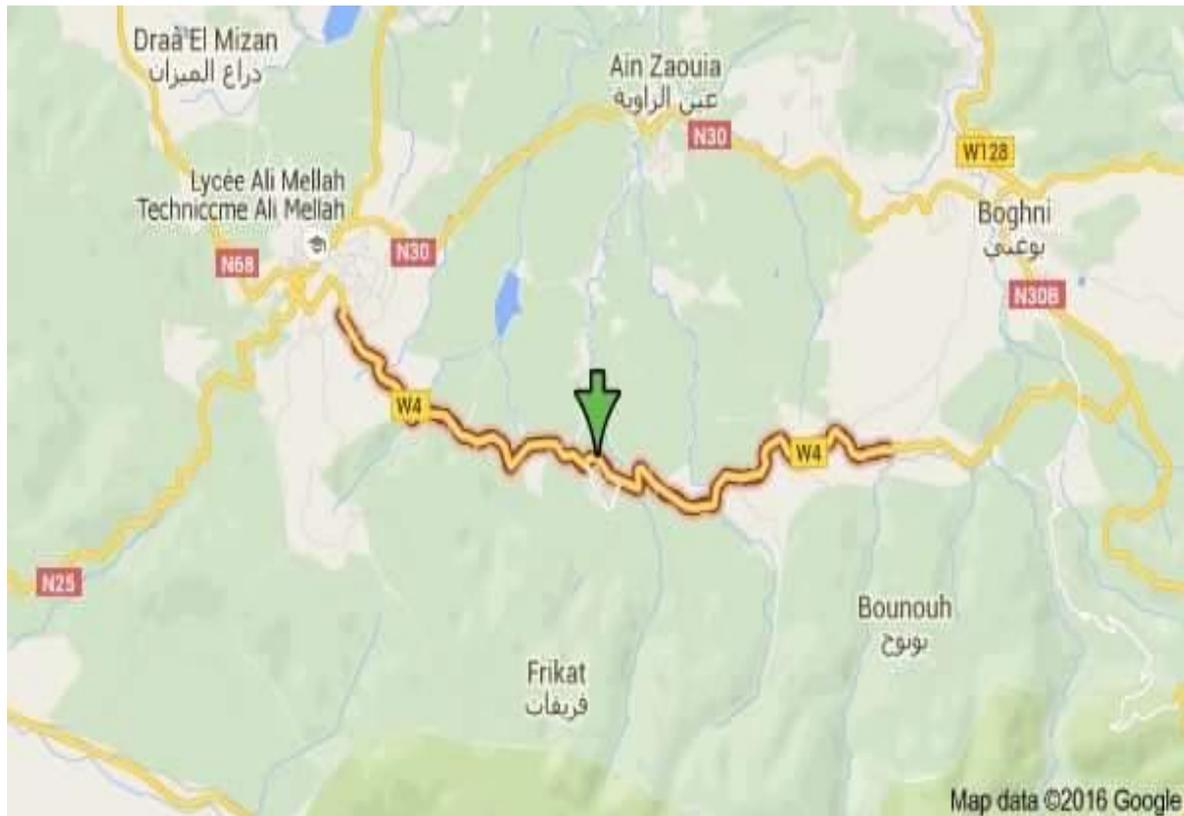


Figure n °5 : localisation du site d'étude dans la daïra de draa El Mizan



Figure n°6 : image représentative de la zone d'étude frikat

3. Mode d'alimentation des vaches laitières

Les aliments distribués dans les rations quotidiennes se présentent sous forme de foin secs de sorghot ou d'avoine à raison de 8,6 Kg /vache par jour, et de concentré (5Kg/vache le matin et 5Kg /vache le soir) avant chaque traite, l'abreuvement est à volonté.

II. Prélèvement des échantillons

La traite des sujets est effectuée aux mois de juin 2016, au niveau de la ferme TAIB (Tighilt Laabid) Draa El Mizan, tout en prenant le soin de choisir un lot de vaches laitières en pleine lactation et de bonne santé (ne présentent pas de mammites ni autres maladies)

Les échantillons d'analyse sont prélevés après lavage des mamelles dans des flacons en verre propres et stérilisés. Réfrigérer sur place, ces échantillons sont par la suite transportés, dans des glacières, au laboratoire d'analyse, afin d'éviter le caillage du lait lors de transport.

Les échantillons ont été étiquetés, au préalable, pour assurer leur identification (date de prélèvement, numéro et race de la vache).

III. analyse physico-chimique du lait

L'analyse du lait est une étape très importante en industrie agro-alimentaire, les principaux constituant du lait peuvent varier d'une race à une autre et d'un individu à l'autre d'une même race.

De plus la qualité du lait peut être affectée par des paramètres de production en l'occurrence l'alimentation.

Pour évaluer ces variations et mettre en évidence les aptitudes à la transformation, il est indispensable de procéder à une analyse physico- chimique du lait.

III.1. Détermination de pH du lait

Le pH du lait est déterminé avec un pH mètre à température ambiante.

III.2.L'acidité

Le principe de cet analyse est de doser l'acidité du lait due essentiellement à l'acide lactique par titrage avec NaOH en présence d'un indicateur coloré, l'acidité du lait est exprimée en (°D), chaque 0.1ml de NaOH correspond à 1°D.

III.3. Mesure de l'extrait sec total

L'extrait sec total (exprimé en g/100g) est déterminé à l'aide d'un dessiccateur infrarouge muni d'une balance intégrée. L'échantillon à analyser est pesé (2,5 g de lait) et bien reparti dans une coupelle et soumis à dessiccation à 100°C. Le résultat est affiché sur l'écran de l'appareil.

III.4. Mesure de l'extrait sec total dégraissé (ESD)

C'est la différence entre l'extrait sec total du produit et sa matière grasse en pourcentage.

$$\text{ESD}(\%) = \text{EST-MG} \times 100$$

III.5. Dosage de la matière grasse (AFNOR 1986)

Il a été réalisé par la méthode acido-butyrométrique de **Gerber (NF V 04 6 210)**. C'est une technique conventionnelle qui, lorsqu'elle est appliquée à un lait entier, de teneur en matière grasse moyenne, à 20 °C donne une teneur en matière grasse exprimée en gramme pour 100g de lait ou 100 ml de lait. Son principe repose sur la dissolution des protéines (**annexe n°5**).

III.6. Dosage des protéines totales (AFNOR, 1986)

Le dosage des protéines totales du lait à été réalisé par la méthode de **kjeldahl (NF V 03-05)**.

Cette méthode, donnée par **kjeldahl en 1883**, est la méthode de référence internationale pour déterminer la quantité de protéines du lait. Son principe repose sur la minéralisation des protéines (**annexe n°6**).

III.7.L'aptitude à la coagulation

L'aptitude à la coagulation par la présure et la pepsine par rapport aux différents laits (de référence et expérimental), à été appréciée par la mesure du temps de coagulation, selon la technique de **Berridge** apportée par **collin et al. (1977)**. (**Annexe 02**), dont le principe est fondé sur l'ajout de 1ml de la solution enzymatique à 10ml du lait témoin et expérimental incubé à 35°C pendant 30 minutes au préalable.

L'intervalle de temps compris entre l'addition de la solution enzymatique et l'apparition des premiers flocons relevés visuellement sur les parois internes du tubes à essai est définie comme étant le temps de la coagulation.

La pepsine ovine était déjà préparée en suivant le protocole de **valles** et **Furet**. L'extrait coagulant utilisé à l'état brut a une force de 1/1714 et une teneur en protéines de 8,63mg/ml

CHAPITRE I : Obtention et caractérisation d'une coagulase (Pepsine ovine)**1. Obtention et caractérisation de l'extrait enzymatique brut**

Pour pouvoir déterminer l'efficacité de l'extrait enzymatique obtenu, nous avons jugé utile d'effectuer des tests comparatifs entre l'extrait enzymatique clarifié obtenu après extraction et l'extrait concentré obtenu à partir du premier.

1.1. Mesure de rendement d'extraction (R_t) :

L'estimation de la quantité d'enzyme obtenue à partir de la matière première après différentes étapes d'extraction est exprimée par le rendement d'extraction (R_t), la quantité totale de matière utile est d'environ 141% de la masse totale initiale pour l'enzyme clarifié et d'environ 29% uniquement pour l'enzyme concentré.

Calcul du rendement :

$$R_t = \frac{Ac \times P \text{ extrait}}{P \text{ caillette}}$$

$$R_t = 2398.79$$

Le tableau ci dessous montre les volumes de l'extrait enzymatique brut et concentré récupéré à chaque procédé d'extraction.

Tableau n°2: les volumes de l'EEB et l'EEC récupéré après les opérations d'extraction

		Volume de l'EE récupéré (ml)	Poids de l'EEB récupéré (g)	Volume de l'EEC récupéré (ml)	Poids de l'EEC récupéré (g)
Caillettes	700.7	990.2	980.49	–	–
Volume de l'EEB utilisé pour l'EEC (ml)	150	–	–	44.4	44

1.2. Détermination de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut :

L'activité coagulante est déterminée selon la méthode suivante :

$$F = \frac{2400 \times V}{T_c \times v}$$

$$F = \frac{2400 \times 10}{14 \times 1}$$

$$F = 1714.28(\text{US})$$

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut des caillottes ovines est de 1 /1714. Cette valeur est largement très faible, comparativement à la présure commerciale de référence, dont la force est de 1/10 000, et supérieure à celle trouvée par **Hamzioui et Bariz (2008)**, qui est de 1/1224, ainsi que celle obtenue par **Outaleb (2006) et Benaïcha et Sahi (2009)**, qui est de 1 /1200. **Belhamich (2005)** au cours d'une étude réalisée sur l'extraction la purification et la caractérisation de la coagulase de *Mucor Pusillus* a obtenu une force de coagulation de 1/1200.

Les travaux réalisés par **Salmani (2003)**, montrent que l'activité coagulante et le rendement d'extraction varient relativement, de manière proportionnelle avec la quantité des caillottes mise en œuvre. En effet, une augmentation du poids des caillottes entraîne une augmentation de l'activité coagulante, et une diminution du rendement d'extraction. Cependant, selon le même auteur, au-delà de 80 g de caillotte mise en œuvre, la variation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction est relativement faible.

1.3. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique est effectué par la méthode de **Lowry (1951)**. La concentration en protéines totale de l'EEcl obtenu est de 2 mg/ml, cette valeur est légèrement inférieure à celle de **Benaïcha et Sahi (2009)**, qui était de 2,16 mg/ml, ainsi que la valeur obtenue par **Lafri et Mihoubi (2008)** pour le poulet qui était de 6,9mg/ml. **Belhamiche (2005)** a obtenu un taux de 2,47 mg/ml de protéines pour l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*.

1.4. L'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brute

L'activité protéolytique de L'EEcl de la pepsine ovine a été mesurée selon la méthode de **Green et Stackpoole (1975)** en utilisant comme substrat la caséine du lait.

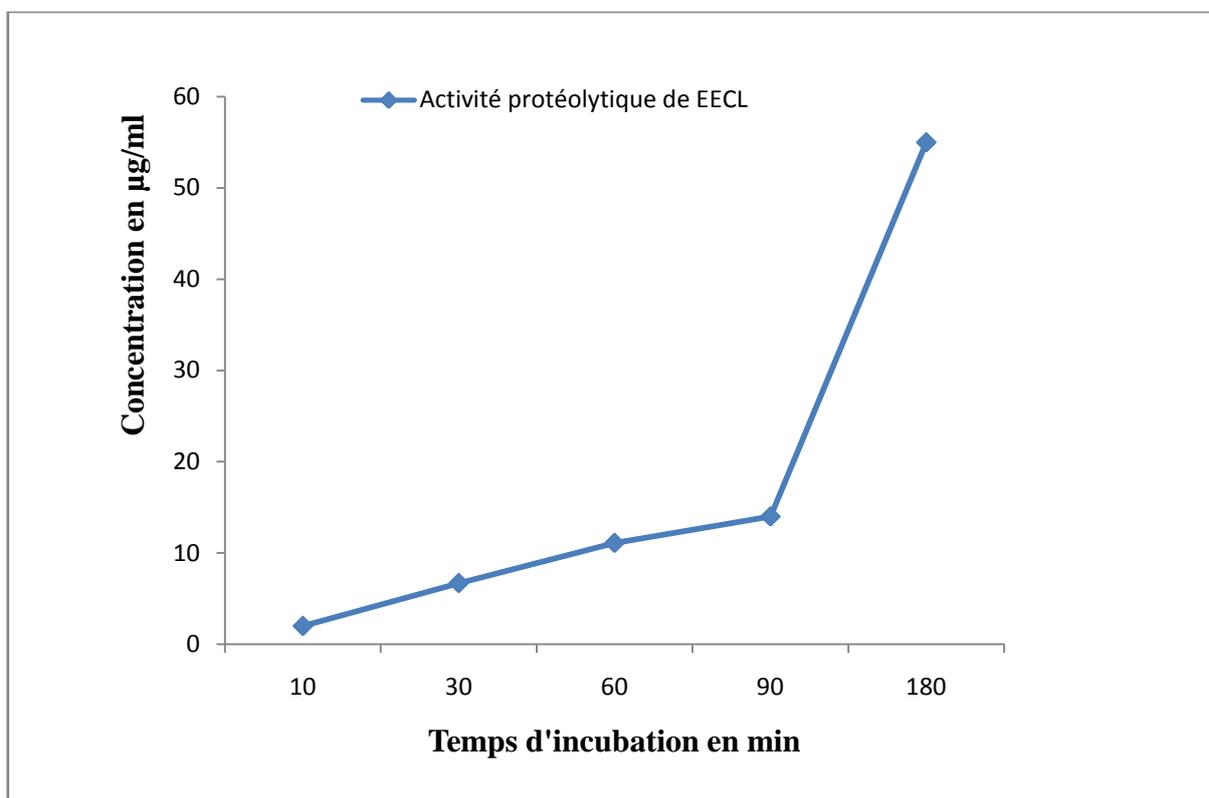


Figure n°7 : Evolution de l'activité protéolytique de l'EEcl.

L'évolution de l'activité protéolytique passe par deux phases, la première à lieu dans un intervalle allant de 10 à 90 min, elle se caractérise par une augmentation progressive de l'activité protéolytique due au prolongement du temps de contact entre le substrat et la coagulase.

Pour des temps supérieurs à 90 min l'activité protéolytique marque une augmentation importante, cette différence de l'intensité de l'activité protéolytique est due à l'action spécifique d'hydrolyse de notre EEB envers la caséine κ et l'action non spécifique envers les autres caséines du lait.

Agoune et Amrane (2007) ont montré que l'activité protéolytique des coagulases caprines est plus importante par rapport à celle de la présure.

Selon **ECK (1997)** les diverses préparations coagulantes d'origine végétale ont donné des résultats assez décevants en fromagerie, car elles possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée qui se traduit par l'apparition d'inconvénients technologiques majeurs.

En générale, les coagulases doivent développer une activité faible de protéolyse, capable de se manifester sur toutes les protéines du lait pendant l'affinage, car si celle-ci est excessive, elle entraîne une diminution du rendement fromager (**Hamzioui et Bariz, 2008**)

2. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

La caractérisation permet de déterminer les conditions optimales d'action de l'enzyme coagulante dans le milieu où elle se trouve. Cette caractérisation concerne l'influence de la température du lait, son pH, la concentration en CaCl_2 et la concentration de l'enzyme.

2.1. Influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante

L'influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante est déterminée en faisant varier la concentration en enzyme par des dilutions du 0.002 à 0.1

Les résultats rapportés par la figure n°8 indiquent que l'activité coagulante des deux formes de coagulase (enzyme clarifiée et concentrée) augmente avec la concentration en enzyme et le temps de coagulation est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme utilisé. Ce qui est en accord avec la théorie de **Payens (1979)**, qui stipule que la coagulation du lait dépend de la vitesse de protéolyse de la caséine κ , qui est en fonction de la concentration en enzyme (**ECK, 1987**).

Dans tout l'intervalle de concentration, on remarque que l'activité coagulante de l'extrait enzymatique concentré est plus faible comparativement à l'extrait enzymatique clarifié.

Cependant, dans l'intervalle (0.002 à 0.005), la figure n°8 montre que l'activité coagulante est relativement faible, au-delà de cette valeur, elle augmente de manière remarquable. Ce résultat coïncide avec celui d'**Ait Amer Meziane (2008)** qui a observé cette proportionnalité entre l'activité coagulante et la concentration en extrait enzymatique du poulet, du poisson et de la présure, sans pallier de saturation dans l'intervalle de concentration utilisée.

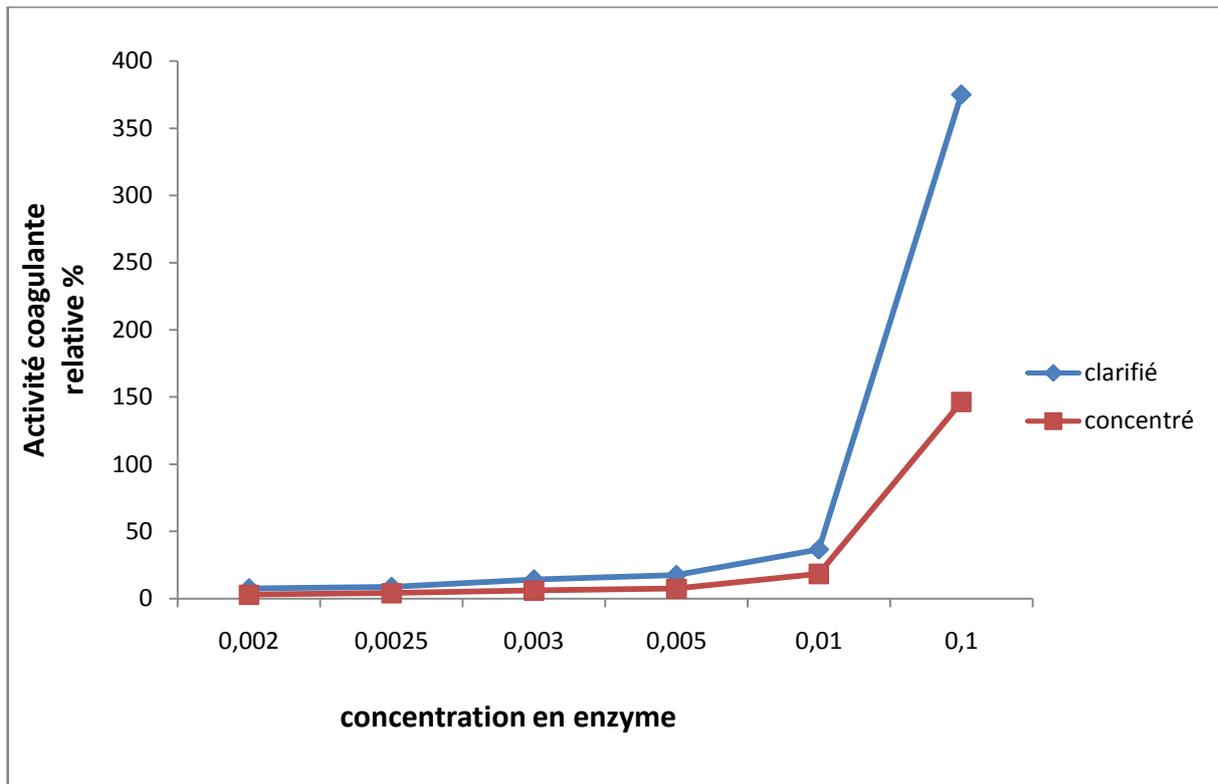


Figure n°8: Influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante de l'EECl et l'EEC.

Les travaux de **Garnot et Martin (1979)** ; **Sbadio et al., (1997)**, ont montré que la vitesse d'action enzymatique (chymosine, pepsine) croît linéairement en fonction de sa concentration, lorsque celle-ci est faible, ce qui correspond aux doses employées en fromagerie, pour des concentrations plus élevées en enzyme, la vitesse d'action enzymatique tend vers une limite.

Morsli (1996), nota un comportement différents des enzymes d'origine animale est végétale, mais manipulant des faibles doses en extrait enzymatique, ainsi, il ne parvient pas à remarquer un pallier pour ce qui concerne la présure.

Belhamiche (2005), nota un accroissement de l'activité coagulante en fonction de la concentration en extrait enzymatique fongique, cependant dans l'intervalle de concentration allant de 0.25 à 0.3 mg /ml, elle nota un pallier de saturation en enzyme ce qui n'est pas le cas pour la présure en raison des faibles concentrations utilisées.

Lafri et Mihoubi (2008) rapportent que l'activité coagulante de l'extrait enzymatique du pro-ventricule augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration de l'extrait pour atteindre un optimum à 6.9mg/ml.

2.2. Influence de la température du lait sur l'activité coagulante :

La détermination de la température optimale de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique obtenu ce fait en mesurant le temps de coagulation le plus court du lait, maintenue à différentes température allant de 25 à 70°C avec un intervalle de 5°C.

L'influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique clarifié et l'extrait concentré est indiquée par la figure suivante

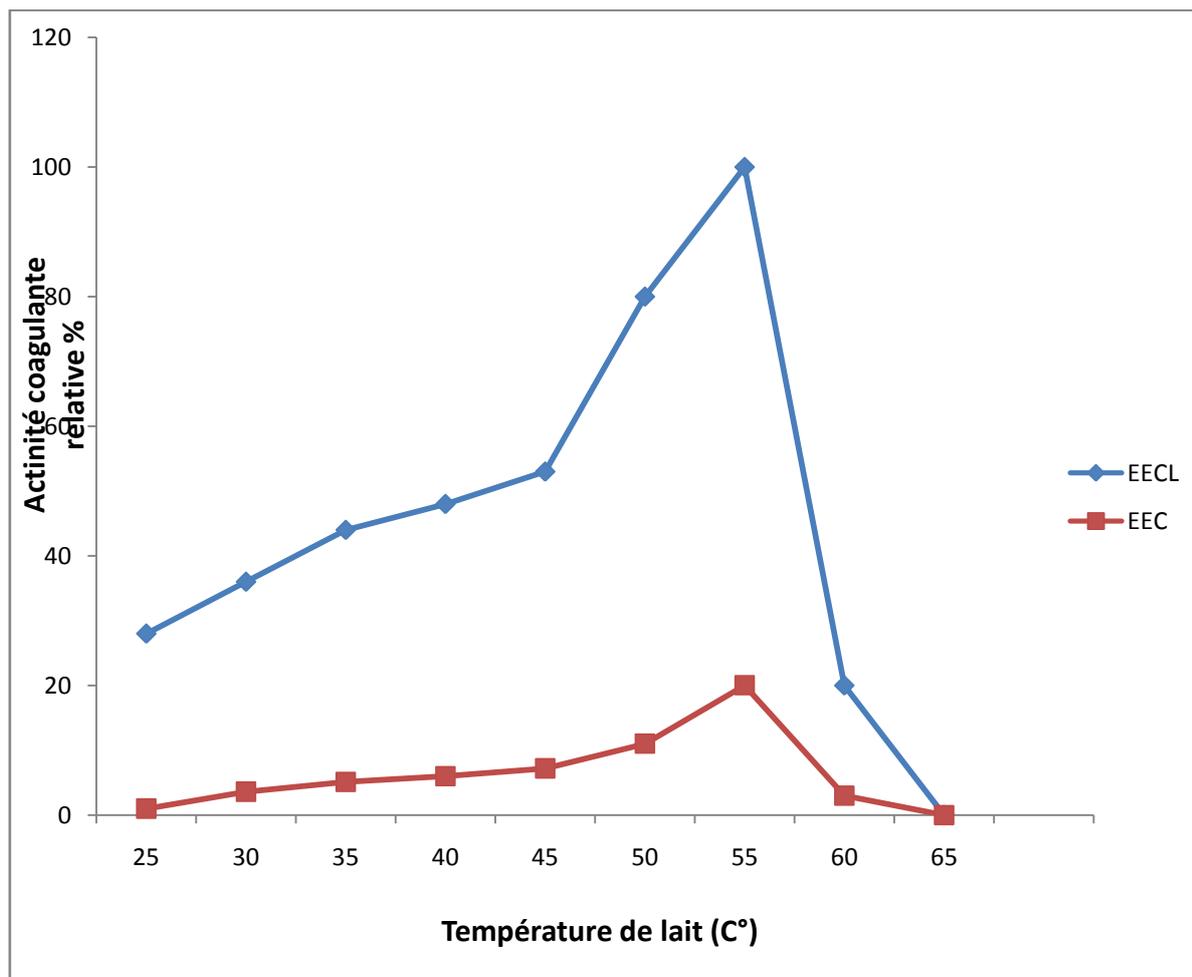


Figure n°9: Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'EECL et l'EEC.

Les résultats indiquent que l'activité coagulante des deux solutions augmente progressivement avec la température jusqu'à atteindre un maximum à 55°C.

L'augmentation de l'activité coagulante est due à l'accélération de la réaction enzymatique par hydrolyse de la caséine κ .

En effet selon **Mahaut et al. (2003)**, La température est un moyen de séparer les deux phases de coagulation, la phase primaire qui est la phase de la réaction enzymatique et la phase

secondaire (phase d'agrégation), cette dernière qui sera absente lorsqu'on incorpore de la présure au lait froid.

L'activité coagulante diminue sensiblement à des températures supérieures à l'optimum enregistré pour les deux coagulases

Au-delà de 55°C on note une baisse de l'activité coagulante des deux extraits enzymatique jusqu'à 65°C où on observe une perte totale de l'activité qui serait la conséquence d'une dénaturation complète de l'enzyme.

D'après les résultats de **Slamani (2003) et Outaleb (2006)**, l'activité optimale d'un extrait enzymatique purifié de la pepsine ovine est de 52°C avec une inactivation complète à 62°C, ce qui confirme nos résultats.

Agoune et Amrane (2007), ont enregistré lors de leur caractérisation de l'extrait coagulant caprin, que l'activité coagulante s'accroît graduellement et elle est maximale à 46°C.

Morsli (1996) a mentionné une activité maximale à 40°C pour un extrait coagulant de la pepsine du poulet, il a aussi rapporté que celles des extraits végétale sont nettement supérieures, 80°C pour une protéase obtenue à partir de l'Artichaut et 70°C pour la ficine.

Pour une coagulase microbienne de *Bacillus subtilis* (LC 33) **matoub (2000)** a rapporté une activité optimale à 70°C.

2.3. Influence du pH du lait sur l'activité coagulante :

Les variations de l'activité coagulante de coagulase obtenu en fonction du pH du lait ont été établies dans un intervalle allant de 5,2 à 7.

La Figure n°10 montre l'influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique clarifié et de l'extrait concentré.

La figure n°10 indique clairement la diminution de l'activité coagulante des deux solutions enzymatiques avec l'augmentation de pH jusqu'à une presque inactivation à pH 7 pour l'enzyme clarifié et une inactivation complète de l'extrait concentré à la même valeur de pH. Sachant que le temps de coagulation le plus court a été observé à pH 5,2 pour les deux solutions.

Gheryan et al. (1995), ont rapportés que l'acidification du lait favorise la réaction d'agrégation, par la suite la diminution de la stabilité des micelles, liées à la neutralisation des charges négatives et de la libération d'ions de calcium.

Alias (2003), qui rapporte que la pepsine ne coagule plus le lait au-dessus de pH 6,7, contrairement à la chymosine qui reste active vers pH 7,5.

Nos résultats coïncident avec ceux de Slamani (2003) et Outaleb (2006), au cours d'une étude sur la coagulase de pepsine ovine qui ont indiqués que le temps de coagulation est plus court à pH 5,5, de même que Benaïcha et Sahi (2009) qui ont indiqués le temps le plus court à pH 5,2 au cours de leur étude sur la même coagulase .

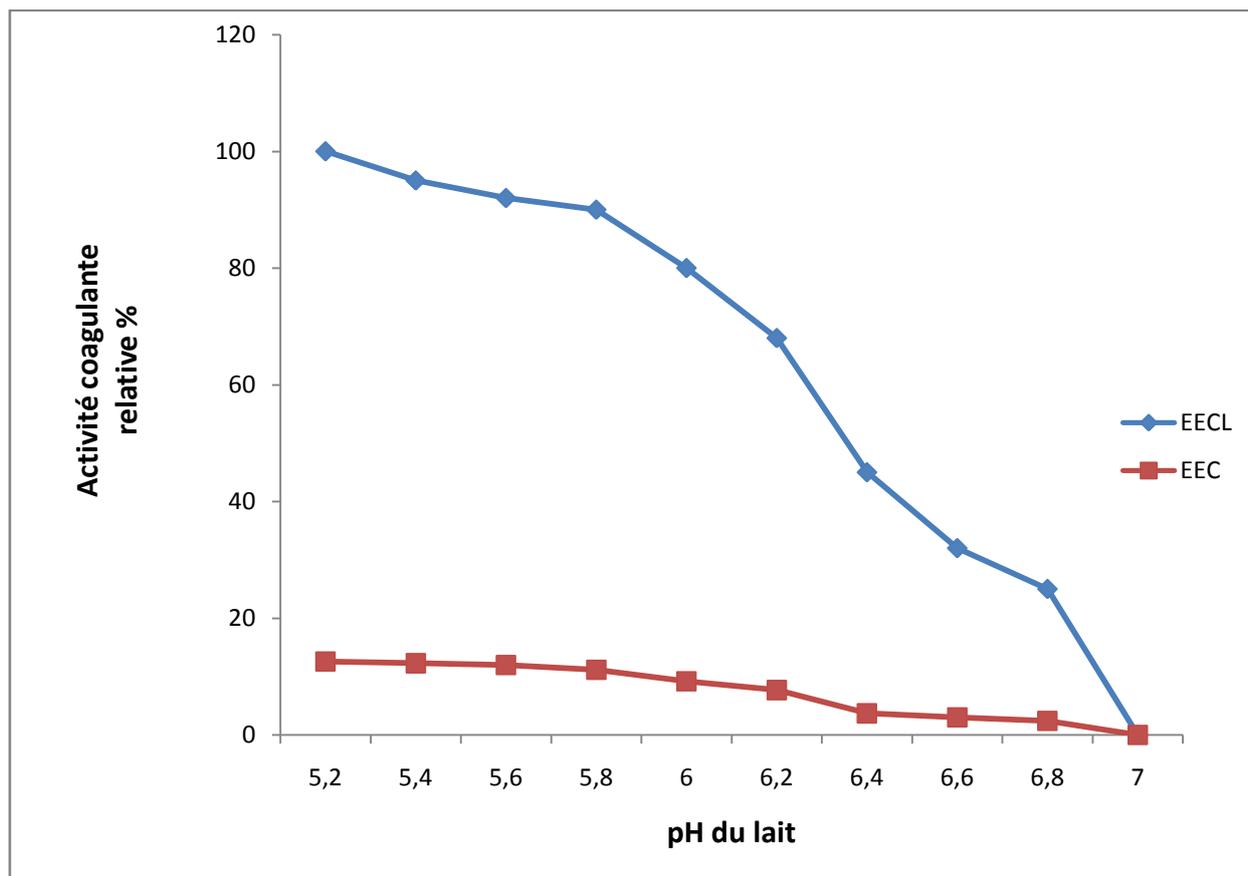


Figure n°10 : Influence du pH sur l'activité coagulante de l'EECL et l'EEC.

2.4. Influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante

L'influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de la pepsine ovine clarifiée et concentré a été étudiée en faisant varier sa concentration dans le lait de 0.02 à 0.4mol.

La figure n°11 représente l'influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de l'EE clarifié et concentré.

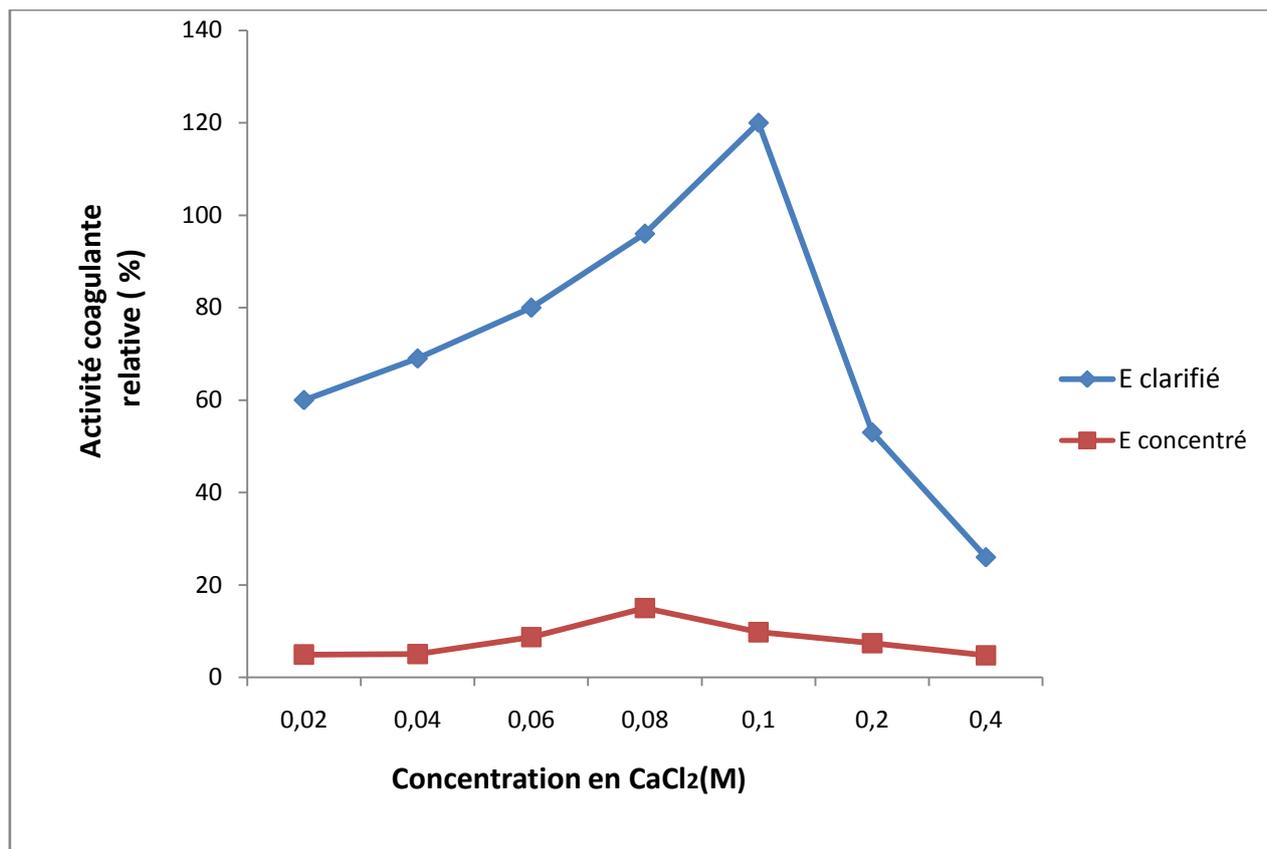


Figure n°11 : Influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de l'EE clarifié et concentré.

D'après la figure n°11, nous constatons que l'activité coagulante des extraits enzymatiques concentrés et clarifiés de la pepsine ovine augmente avec l'addition du CaCl_2 jusqu'à une concentration de 0,08 mol et 0,1 mol, respectivement, au-delà, une baisse d'activité est enregistrée.

Selon **Nôel et al., (1989)**, l'addition de calcium à pH constant n'a pas d'influence sur la réaction d'hydrolyse enzymatique mais elle accélère la réaction d'agrégation des micelles hydrolysées, ainsi il est bien établi que la phase de gélification est purement chimique, et elle dépend étroitement de la teneur en calcium.

En revanche, l'excès de calcium provoque une inhibition de la coagulation, du fait qu'il bloque certains sites réactifs indisponibles pour la réticulation des molécules de para caséine, induisant ainsi une précipitation partielle des caséines du lait (**Baumy et Brulé, 1986 ; Mc Mahon et al., 1984**).

L'addition de calcium soluble entraîne une augmentation de la teneur en phosphate de calcium colloïdal, lequel semble être le facteur déterminant de l'aptitude du lait à la coagulation par la présure (**Brule et Lenoir, 1997**).

3. Aptitude de lait standard à la coagulation par l'EEB et EECl

Tableaux n°3 : variation de temps de coagulation du lait standard par l'EEC et l'EECl

Agent coagulant	Temps de coagulation du lait standard(s)
Extrait enzymatique clarifié	14
Extrait enzymatique concentré	48

Le tableau n°3 regroupe les résultats concernant la variation de temps de coagulation du lait standard, avec l'extrait enzymatique clarifié et concentré. D'après les résultats obtenus, on remarque une différence de temps de coagulation avec l'extrait enzymatique clarifié et concentré sur le lait standard. En effet, le temps de coagulation de l'enzyme clarifié reste inférieur à celui de l'enzyme concentré.

L'analyse des données de ce tableau, révèle une variation du temps de coagulation en fonction de la solution enzymatique, de ce fait, les facteurs physico-chimiques de cette enzyme intervenant dans le mécanisme de la coagulation.

La coagulation enzymatique inclut plusieurs étapes de natures différentes et dont les cinétiques dépendent de nombreux facteurs physico-chimique (la concentration en enzyme, la concentration en protéine, le pH, la température et la teneur en calcium), (**Jeantet, 2008**)

Chapitre II : Effet de race sur la qualité du lait.

1. Résultats de l'analyse physico- chimique du lait

L'analyse statistique par le test t de STUDENT, nous a permis d'étudier l'effet de la race sur la composition du lait et son aptitude à la coagulation sans tenir compte ni du numéro de lactation ni du stade de lactation, le tableau n°4 illustre les résultats de test.

Tableau n°4: Analyse statistique (test t STUDENT) des différents paramètres du lait de la race Montbéliarde (1) et la Holstein (2).

Variable	Moy1	Moy2	ddl	EC1	EC2	P
Acidité	25,5000	19,0000	6	1,00000	3,5590	0,065707
pH	6,1875	6,5000	6	0,10874	0,1627	0,525287
EST	126,5750	108,2000	6	11,20547	4,5144	0,169561
ESD	86,1500	72,0750	6	4,56691	2,7969	0,441924
MG	40,4250	36,1250	6	14,61811	5,9924	0,177064
Protéine	32,7000	27,5500	6	1,69115	1,0279	0,435195
TCP	171,7500	264,2500	6	71,21037	276,5145	0,051671
TCEC	218,0000	370,0000	6	61,67117	458,4430	0,008003

En rouge, les paramètres correspondant aux valeurs de probabilité significative $p < 0.05$; ddl : degré de liberté ; p : probabilité ; Moy : moyenne ; EC : Ecart-type

La comparaison entre les deux races présentées sur le tableau n°4 indique que l'effet de la race est significatif ($p < 0.05$) sur le temps de coagulation de l'extrait enzymatique clarifié.

1.1. Le pH et l'acidité

Les valeurs moyennes du pH et l'acidité des laits analysés sont illustrées dans la figure n°12

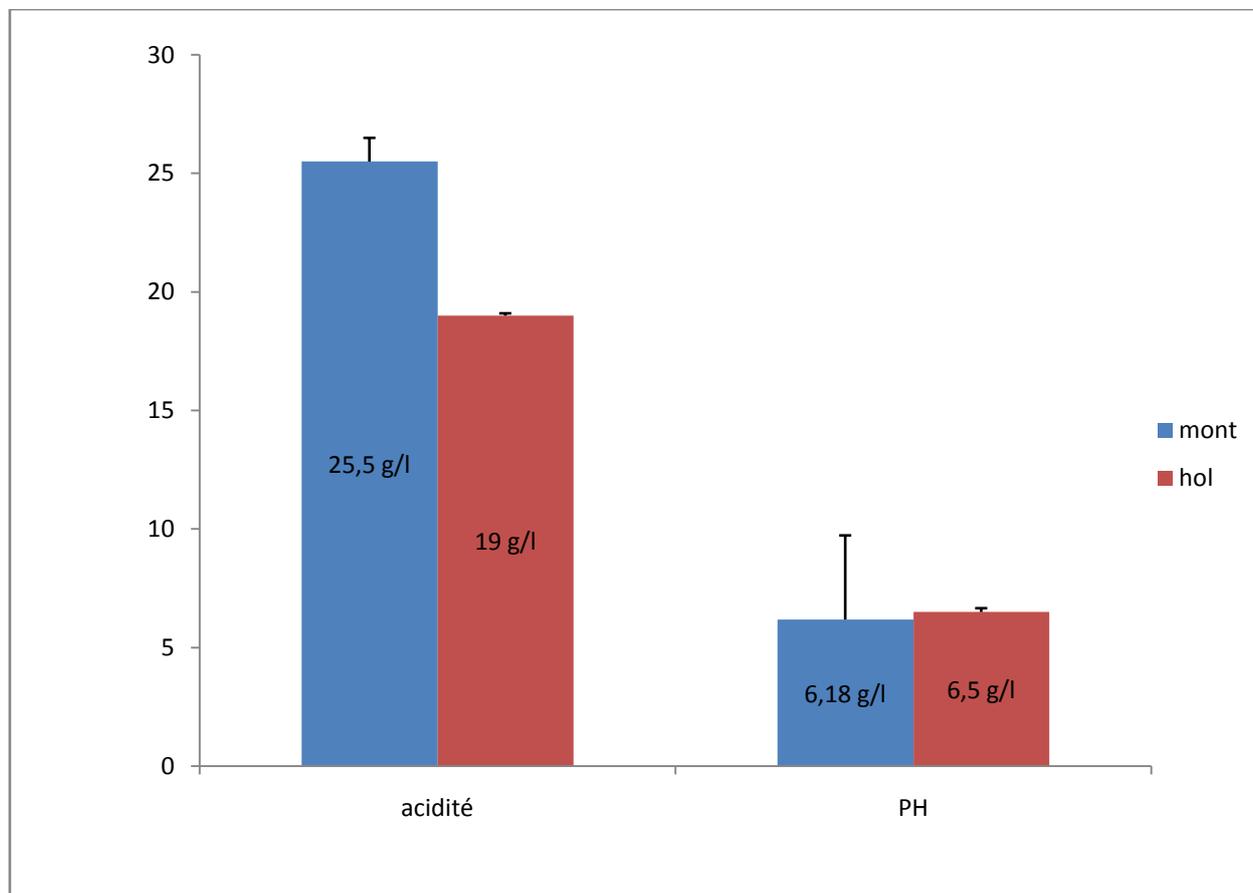


Figure n°12 : Valeurs moyennes des pH et l'acidité des laits analysés.

Les valeurs moyennes des pH des deux laits analysés, qui sont de 6.18 et de 6.5 respectivement pour la race 1 et 2 (Montbéliarde et Holstein), ces valeurs sont, pour la race 2 comprise dans l'intervalle des pH du lait normal donné par **Vignola(2002)**, qui est de 6.5 à 6.8 contrairement à la valeur de la première race, elle est considérée comme anormale puisqu'elle est inférieur à 6.5.

A partir de la figure n°12 on peut dire qu'il ya une différence entre l'acidité des deux laits, 25.5°D pour le lait de la race 1(montbéliarde), et 19°D pour la race 2 (Holstein). L'acidité du lait prélevé des deux races 1 et 2 dépasse la borne supérieure de l'acidité normale du lait de vache qui est de 17°D selon **Alais (1984)**, **FAO(1995)** et **Vignola(2002)**.

Les laits ont normalement une acidité de 0.13 à 0.17 %. L'acidité naturelle du lait est attribuable à la présence de caséines, de substances minérales, de traces d'acides organiques et réactions secondaires dues aux phosphates (**Vignola, 2002**).

Selon **Vignola, (2002)** l'acidité développée du lait est causée par l'acide lactique et d'autres acides provenant de la dégradation microbienne du lactose dans les laits altérés. Ceci explique l'activité élevée du lait des deux races. Ce qui témoigne des mauvaises conditions d'hygiène entreprises.

1.2. Variation du taux butyreux

La figure n° 13 montre les teneurs en matières grasses des laits issus des deux races, qui sont 40,42g/l pour la Race 1 (Montbéliarde) et 36,12g/l pour la Race 2 (Holstein), ces valeurs indiquent que le lait de la race Montbéliarde est plus riche en matières grasses en comparaison avec le lait de la Holstein.

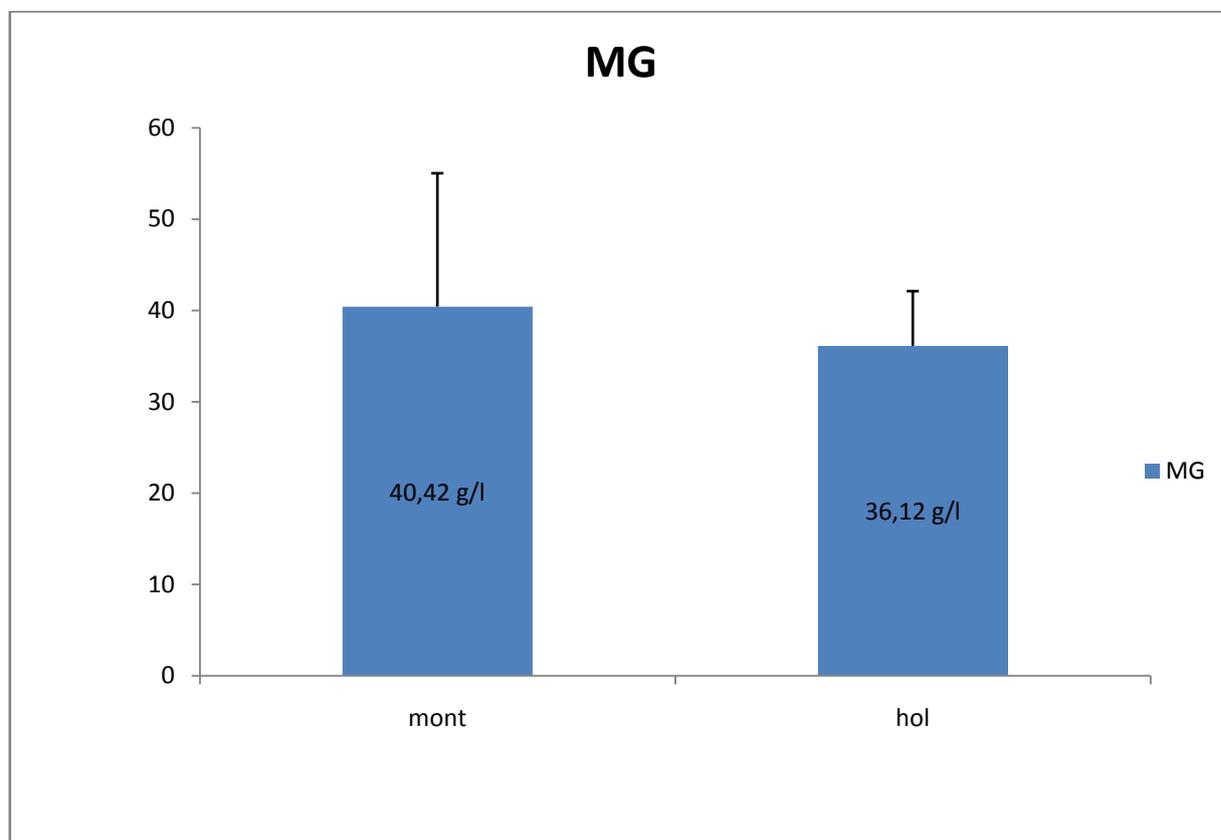


Figure n°13 : valeurs de taux butyreux des échantillons du lait analysés

Les valeurs obtenues sont supérieures à celle d'**Alias (2003)** qui est 34g/l, par contre sont comprises entre l'intervalle de **Vierling(1999)** qui est de 34 à 42g/l.

Cette différence peut être due à l'alimentation des vaches, d'après **Pougheon (1974)**, le taux butyreux est l'élément le plus sensible à l'alimentation.

Selon **Drogoul et al. (2004)**, il est classique d'observer à la mise en herbe une chute relativement importante du taux butyreux, lorsque les vaches ont reçu une ration hivernale à base d'ensilage de maïs, à l'inverse, une augmentation sensible lorsque cette ration était à base d'ensilage d'herbe.

D'après **Pougheon (1974)**, l'herbe jeune qui est riche en sucres solubles peut occasionner des diminutions de TB.

La race des vaches présente un facteur important des variations des teneurs en acides gras cela est montré par plusieurs auteurs (**Jensen et al., 1999 ; Chilliard et al., 2000 ; Sollberger et al., 2004**).

La période d'étude ou du prélèvement est réalisée pendant le mois de juin, ce qui influence sur les taux butyreux, selon **Coulon et al. (1991)**, les taux butyreux du lait sont plus faibles en été et plus élevés en hiver.

1.3. Variation du taux protéique

D'après les valeurs indiquées par la figure n°14, la teneur en protéines de la race 1 est de 32,7g/l supérieure à celle de la race 2 (27,55g/l).

Les valeurs obtenues de la race Montbéliarde sont supérieures à ceux de **cauty et al. (2003)** qui ont rapporté que les teneurs en protéines du lait de vache Montbéliarde sont de 32,4g/l, contrairement à ceux de la race Holstein qui sont inférieures aux valeurs trouvées par les mêmes auteurs (31.5 g /l).

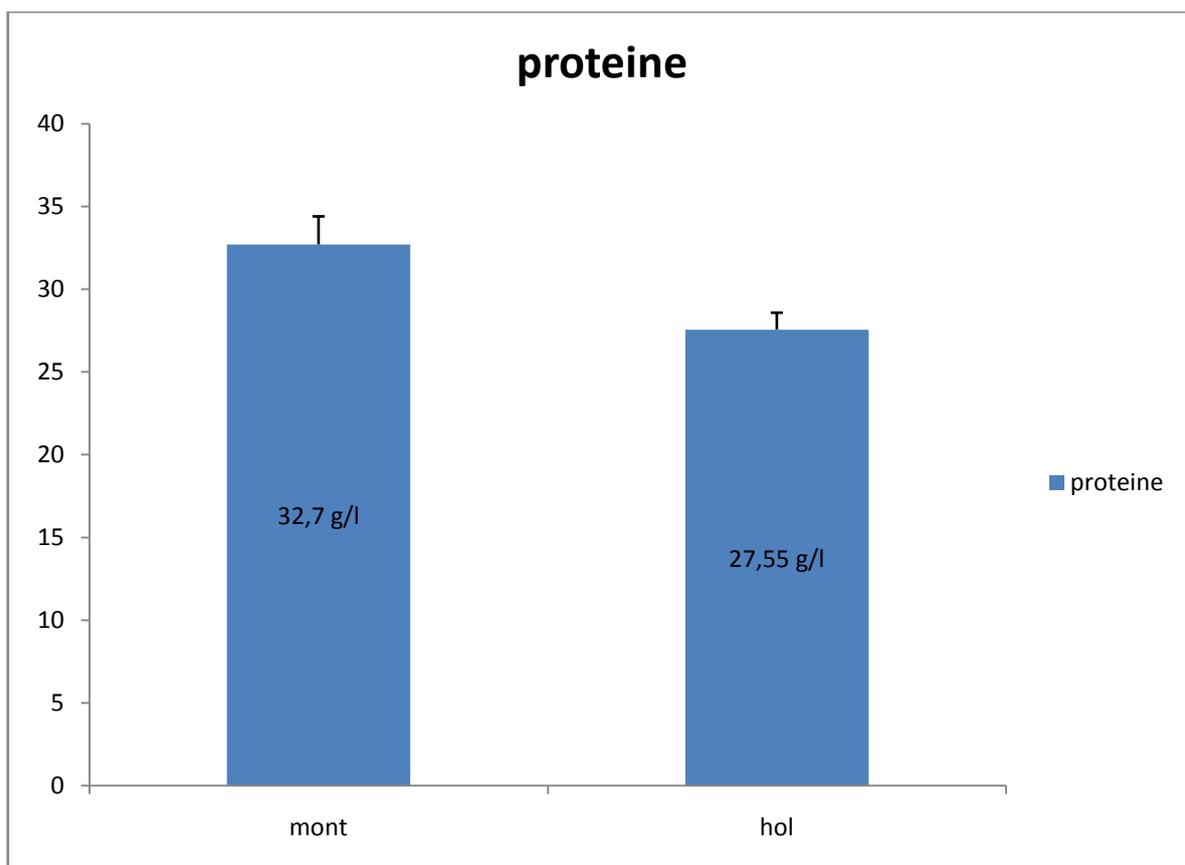


Figure n°14 : Les taux de protéine des échantillons du lait analysés

Cette différence des taux protéiques peut être expliquée par la différence de race des vaches, selon (Froc *et al.*, 1988 ; Machboeuf *et al.*, 1993 ; Malossin *et al.*, 1996 ; Audist *et al.*, 2002 ; Mistry *et al.*, 2002) les vaches de race Normande, Montbéliarde ou Brune des Alpes produisent un lait plus riche en protéines que celui des vaches Holstein conduites dans les mêmes conditions d'élevage.

La majorité des travaux ont montrés qu'une photopériode expérimentale longue de 15 à 16h/jour augmente la production laitière est diminuée la richesse en protéines.

1.4. Variation de l'extrait sec totale (EST) et l'extrait sec dégraissé (ESD) :

L'extrait sec total représente l'ensemble des constituants du lait à l'exclusion de l'eau. La mesure de ce paramètre permet d'apprécier d'une façon globale la richesse de lait (Alias, 1984).

L'extrait sec total du lait de vache se situe entre 125 à 135g/l selon Vierling (1999) et Alias (2003)

La figure n°15 montre une valeur de 126,57g/l pour la première race et 108,2g/l pour la deuxième, cette dernière qui est inférieure aux normes indiquées, contrairement à la valeur de la première race qui se situe entre l'intervalle indiqué ci- dessous.

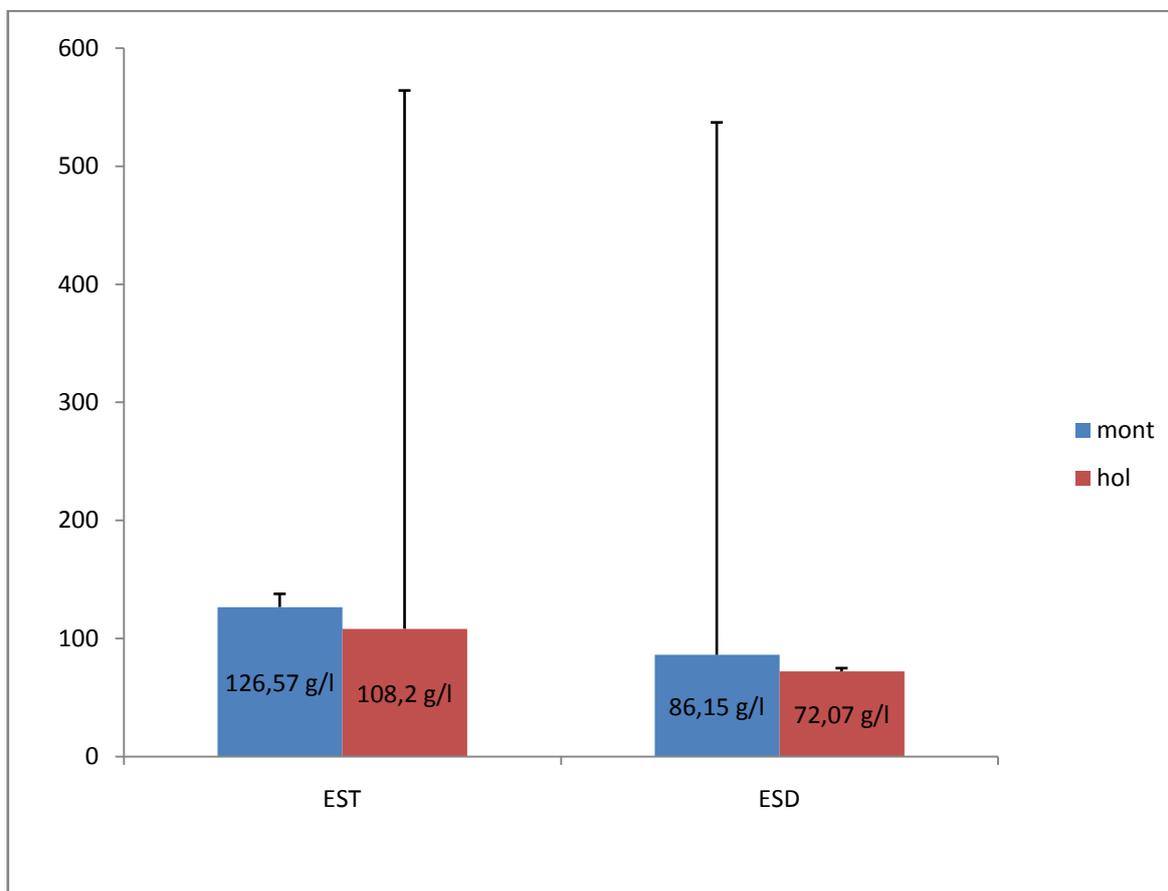


Figure n°15 : valeurs moyennes de l'EST et l'ESD.

Les variations des taux butyreux et de matières grasses observées expliquent les valeurs d'EST obtenues, selon **Jeantet (2002)**, l'augmentation ou la diminution de l'extrait sec total est en relation direct avec la variation notamment du taux protéique et du taux butyreux.

L'alimentation et la période de lactation aussi explique la variation de l'EST, puisqu'il influence sur les taux butyreux et protéique.

1.5. Temps de coagulation de la présure et l'extrait enzymatique clarifié

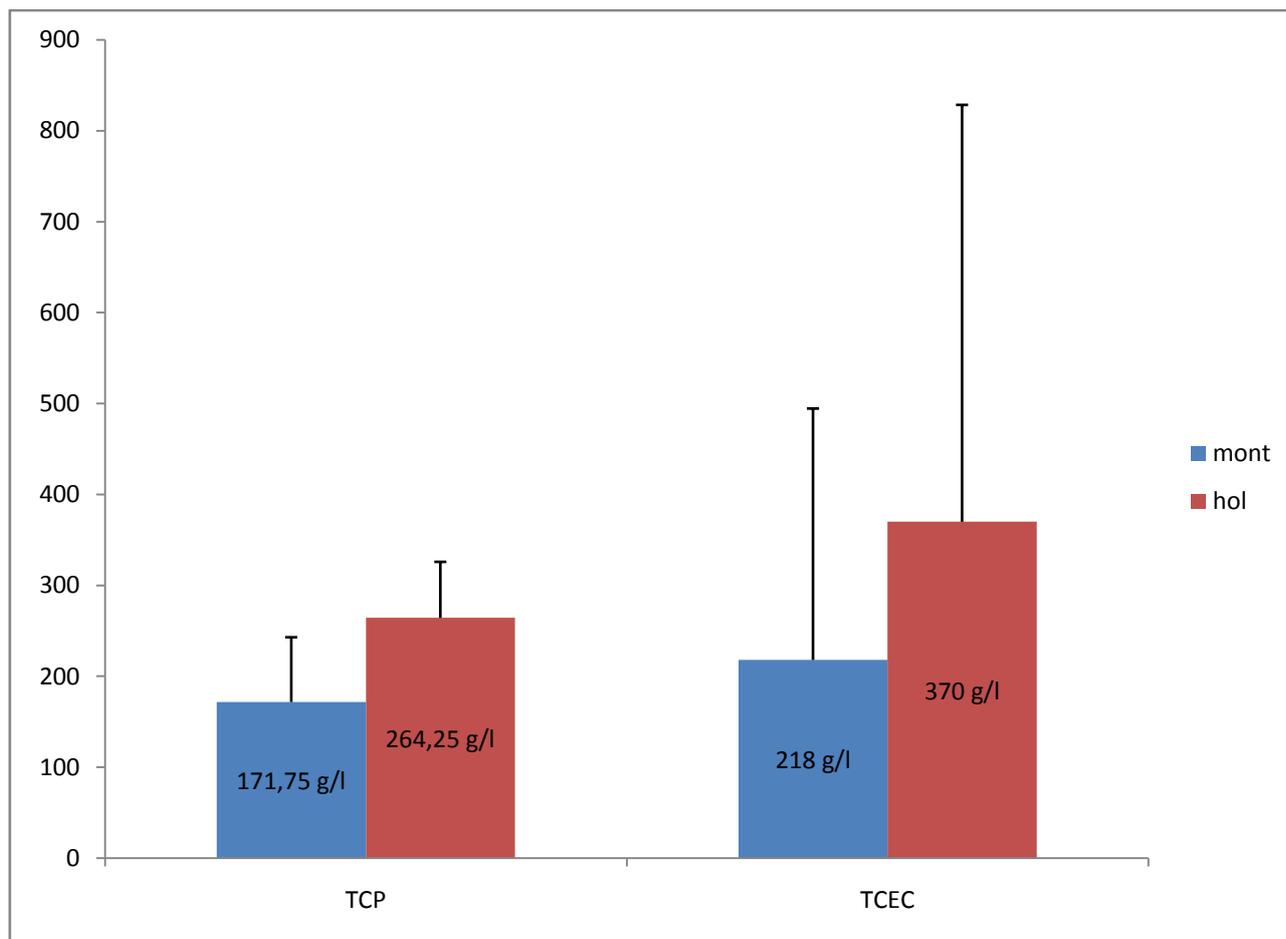


Figure n°16: variation de temps de coagulation par la présure et la pepsine ovine en fonction de la race.

D'après la figure ci-dessus, on constate que le temps de coagulation par la présure et la pepsine ovine sont mieux appréciés chez la race Montbéliard par rapport à la race Holstein, ce qui est dû vraisemblablement à la teneur réduite en protéines et caséines dans le lait de cette dernière.

Selon **Macheboeuf et al. (1993)**, l'aptitude à la coagulation du lait est meilleure chez les Montbéliardes surtout en raison du taux de caséines plus élevé, ce qui concorde avec nos résultats.

Bibliographie

A

Agoune S., Amrane O., 2007. Caractérisation d'un extrait coagulant le lait obtenu à partir de caillettes caprines en vue de son utilisation en fromagerie. Mém.Ing.Agr., Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 59p.

Ait amer meziane L., 2008. Aptitudes à la coagulation du lait de brebis et de chèvre par des protéases d'origine animale poulet, (*Gallus gallus*) et poisson (*Seriola dumerili*). Mémoire magister, Institut National Agronomique, Alger, 136p.

Alais C., 1984. Science du lait, principes des techniques laitières. Ed. Sepaic.Paris.p.p.68-814.

Alias C., 2003. Abrégé en biochimie alimentaires. Paris, Donud, 250p.

Andelot L, 1983. Le contrôle laitier, Facteur d'amélioration technique. Rev lait Franç, 4,6 : 15-16.

Anifantakis E.M. et Kandarakis J.G., 1983. Utilisation de la pepsine bovine en fabrication de fromage feta fait à partir du lait de brebis. Le lait, n. 63, p.p. 416-424.

Anonyme, 2007. Les Premières Assises de la Recherche Agronomique, Atelier 4 : Synthèse Globale Problématique des Filières Animales. INRAA, 22p.

Anonyme, 2007. Manuelle d'utilisation des drèches de distillerie .US GRAIN , Etats –unis – d'Amirique .

Auldist M.J., Mullins C., O'Brien B., O'Kennedy B.T., Guinee T., 2002. Effect of cow breed on milk coagulation properties.Michwissenschaft. 57,p.p. 140 -143.

B

Baomy I. J., Brulé G., 1986 : Etude comparée de la solution de caséinates et paracaéinate de sodium en présence de calcium. Le lait, n. 66, p. p. 65-77.

-Belhamiche N., 2005. Extraction et purification de la coagulase obtenue de *Mucorpusillus*. Mémoire magister, Institut National Agronomique, Alger, 58p.

Benaicha et Sahi, 2009. Influence de la race sur la composition du lait bovin. Essai de fabrication d'un fromage avec un succédané de présure (pepsine ovine). Mém.Ing.Agr., Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harach (Alger), p.p.79-141.

Benaissa et ferroukli, 1995 in Boulahhchiche, 1997. étude de l'élevage bovin laitier moderne : cas du bassin versant de la Metidja. Mem.Mag.Agr.,Institut National Agronomique,El Harrach (Alger),175p.

Bencharif A., 2001. Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie : état des lieux et problématiques, In Options méditerranéenne, pp. 25-45.

Boudier J.F., 1974. Présure et succédanés de présure. Ed. Technique et Documentation. APRIA. France. 74p.

Boulahchiche N., 1997. étude de l'élevage bovin laitier moderne: Cas du bassin versant de la Metidja. Mem. Mag.Agr., Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 175p.

Brewer P., Helbig N., Haard N.D. 1984. Atlantic cod pepsin characterization and use as rennet substitute. Canadian institute of food science and technology journal. 17: (1), (38- 43) p.

Broome M.C., Limsowtin G.K.Y. ,1998. Milk coagulants. Australien journal of dairy technologie, vol.53, n.3, pp.188-201

Brulé G., Lenoir J., Remeuf R., 1997.La micelle de caséine et la coagulation du lait in : Eck A., Gillis G. C., Le fromage de la science à l'assurance qualité. Technique et Documentation-Lavoisier, Paris, 891p.

C

Cabezasl., Esteban M. Esteban M .A., Marcos A., 1981. Agargel diffusio of cynara humilis (L.) prote inases and other enzymes. Alimentation, 128 17-22. Cah. Sci.Hum, 24(1), 137-144.

Cattaneo T.M .P., Nigro F., Messina G., Giagiacomio R., 1994. Effet of an anzymatic couple from pineapple pulpon The primary clotting phase. Milchwissens halft , 49,269-272.

Cauty I, Perreau J M.2003. La conduite du troupeau laitier. Paris, France agricole.288p.

Chadat R., Rouge E., 1906.In : les succédanés de la présure. Le lait, vol, 48, n. 471-472, pp.53-59.

Charron C, 1986. Les productions laitières. Tec & Doc Lavoisier, Paris.

Chillard Y., Ferlay A.,Doreau M.,2000. Rumunant milk fat plasticity: nutritionnel control of saturated, polyunsaturated, Trans and conjugated fatty acids. Ann. Zootech., 49,p.p. 181-205.

Collin J.C., Grappin R., Legraet Y., 1977. Etude de la method de mesure, selon Berridge, du temps de coagulation. Revue laitière française, pp. 389-394.

Coulon J.B. , Chilliard Y. , Redmond B., 1991. Effets du stade physiologique et de la saison sur la composition chimique du lait de vache et ses caractéristiques technologiques (aptitude à la coagulation, lipolyse).INRA.Prod.Anim . , Vol.4.N°.3, p.p.219-228.

Coulon J.B., Hutraud C., Remond B., Verite R., 1998. Facteurs de variation de la proportion de caséines dans les protéines du lait de vache
.I.N.R.A., Prod. Anim., Vol. 11, n. 4, p. 299-310.

D

Desmazeaud M.J., 1981. Principales utilisations des enzymes en industries laitières aspects scientifiques et techniques. IAA, pp. 195-204.

Desmazeaud M. J., 1994. Le lait milieu de culture. In : Les bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. LORIKA, vol. 2 613p.

Drogoul C., Gadoud R., Joseph M.-M., Collectif, Jussiau R., 2004. Nutrition et alimentation des animaux d'élevage, Vol. 2, (educagri). 312 p.

Durand K., 1974. La production laitière bovine. I. Lenore. Paris. 147p.

E

ECK, 1987. Le fromage. Paris, Lavoisier, pp. 339-539. (Techniques et documentations).

ECK A, 1990. Le fromage. 2^{ème} édition. Technique et documentation. Lavoisier. Paris. 539p.

ECK A., Gillis J.C.e, 1997. Le fromage: De la science à l'assurance-qualité. 3^{éd}. Paris, Technique & documentation, 891p.

Esvan S., Dragan C. Varenne A., Astruc J-M. et al., 2010. Rapport PhénoFinlait, 1^{ers} résultats: influence de l'alimentation, de l'état physiologique et de la génétique sur la composition en acides gras des laits de vache, brebis et chèvre. INRA UMR.

F

FAO., 1995. Lait et produits laitiers dans la nutrition humaine. Rome, n. 28, 271p.
(Alimentation et nutrition).

Fox P.F., Mulvihill L., 1990. In structure et technofonctions des protéines du lait. Mathieu J. Ed. Harris P. Elsevier Sci. Pub. Co. New York. (121-177)p.

Froc J., Gilibert J., Daliphar T., Durand P., 1988. Composition et qualité technologique des laits des vaches Normandes et Pie-Noires : effet de la race. Inra. Prod. Anim., 1, P.P. 171-177.

Froc J., 2001. Des jus de fruits ou de plantes pour faire du fromage. INRA mensuel n° 110, 41-42.

G

Garnot P., Martin P., 1979. La présure : Composition détermination de l'activité, son rôle en fromagerie. Technique laitière, vol. 930, n. 3, p. 27-30.

Genin G., 1968. Les succédanés de la présure, le lait, vol.48, n. 471-472, pp.53-59.

Goursaud J., 1999. Réacteurs enzymatiques à enzymes libres et à enzymes immobilisées. In : scriban R. Biotechnologie. Paris, Lavoisier, pp.365-390.

Graindy P., 1978. Détermination de l'activité enzymatique d'extraits coagulants d'origine animale. Technicien du lait, n. 83, p.p. 5-47.

Green M. L., Stackpoole A., 1975. The preparation and assessment of a suitable *Mucor pucillus* Lindt proteinase-swine pepsin mixture for cheddar cheese-making, journal of dairy research, vol. 42, p. p. 297-312.

H

Hassas O., 2000. Contribution à l'étude de la situation actuelle du bovin laitier importé en Algérie. Ecole nationale Supérieur Agronomique, El Harrach (Alger), 78p.

J

Jeanet R., Croguennec T., Schuck P., Brulè G., 2007. science des aliments : Biochimie, microbiologie, procédés, produits .Paris, Lavoisier, Tec.et Doc., 456 p.

Jensen S.K., Johannsen A.k., Hermansenn J.E., 1999. Quantitative secretion and maximal secretion capacity of retinol, beta-carotene and alpha-tocopherol into cow's milk. J.Dairy Res., 66, p.p. 511-522

K

Korchi, 1990 in Boukir M., 2007. Relations entre les modalités de productions bovines les caractéristiques du lait. Cas des exploitations laitières de la wilaya de Tizi-Ouzou. Mem. Mag. Agro. Institut National Agronomique, El Harrach (Alger). 84p.

L

Lafri H et Mihaubi M., 2008. Caractérisation d'une coagulase extraite à partir du proventricule de la dinde «*Meleagris gallopavo*» et son utilisation dans la fabrication d'un fromage à pâte molle type «*Camembert*». Mém. Ing. Agro., Institut National Agronomique, El Harrach(Alger), 86p.

Lenoir J., Lamberet G., Schmidt JL., Tourneur C., 1985. La maîtrise du bioréacteur. Fromage. Biofuture. (23-50) p.

Lopiero A.R., Petrone., 2002. Characterization of lettuce, à serine-like protease from lactuca sativa leaves, as à novel enzyme for milk clotting. Journal Afric-Food Chem., vol. 50, pp.2439-2443.

Lowry ON., Rosbdrough NJ., Farr AL., Randall RJ., 1951.Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : (265-275) p.

M

Macheboeuf , Coulon ,J-B., 1993. Effet du numéro de lactation sur l'aptitude a la coagulation du lait de vache. INRA.Ann.zootech., N°43, p.p. 135-140.

Machesoeuf D., Coulon J. B ., D'Hour P., 1993. Aptitude à la coagulation du lait de vache : Influence de la race, des variantes génétiques des lactoprotéines du lait, de l'alimentation et du numéro de lactation. INRA production animales, vol. 6, NO. 5, p, p. 333-344.

Mahaut M.,Jeantet R.,Brule G.,2000. Initiation a la technologie fromagere.Paris, Techniques et documentation,194p.

Mahaut M., Jeantet R., Brulé G., 2003. Initiation à la technologie fromagère. Lavoisier, 194 p.

Malossin F., Bovolenta S., Piras C., Dalla Rosa M., Ventura W., 1996. Effect of diet and breed on milk composition and rennet coagulation properties.Ann.Zootech., 45,p.p. 29-40.

Matoub L., 2000.Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée (LC 33). Mém.Mag.Agr.,Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 91p.

Mc Mahon D., Brown R. J., 1984. Enzymic coagulation of caséin micelles. Journal Dairy Sci., vol. 67, p. p. 919-929.

Mieton B., Desmazeaud M., Deroissardh. Et Weberf. (1994). Transformation de lait en fromage ; in : « Bactéries lactique II» Technique et documentation, lavoisier. Paris.

Mimouni R, 2000. La consommation du lait et des produits laitiers à travers les statistiques. In Act séminaire SAFLAIT. Université de Blida, 20p.

Mistery V.V., Brouk M.J., Kasperson K.M., Martin E., 2002. Cheddar cheese from milk of Holsteins and brown swiss cows.Michwissenschaft, 57, p.p. 15-23

Morgan F., 1999. Cellules somatique du lait de chèvre : Conséquences sur la composition du lait et la technologie. [http://www. it plc. asso. Fr/](http://www.itplc.asso.fr/),4p.

Morsli A, 1996.Recherches sur les activités protéasiques des extraits de *cynara scolymus*, du latex de *Ficus carica* et du pro ventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Thèse Magister. INA. EL-Harrach(Alger).p.p 181-190.

Masson C., Decaen C., Rousseaux P., Bauty J. L., 1978.Variations géographique et saisonnière de la composition du lait destiné à la fabrication de gruyère de comté. Le lait, vol. 58, NO, 575-576, p.p.261.273.

N

Nedjraoui D., 2001. Profile des ressources fourragères en Algérie. Grassland and pasture corps, FAO.

Nôel Y., 1989. Comparaison des cinétiques de coagulation enzymatiques et mixte du lait : Influence au calcium. Lait, n. 69, p. p. 479-490.

O

Outaleb T., 2006. Aptitude à la coagulation du lait par la pepsine ovine. Mém.Ing.Agr., Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 54p.

P

Payens, 1976 in Brule et lenoir, 1984- Le fromag. 3éd.Paris. Technique & documentation (Lavoisier), p.p. 62-100.

Payens CN., 1989. Bases and experiences of expressing the protein content of milk. J. Dairy Sci. France. (75) ,11.

Pougehon S. I. A.S., 2001. Contribution a l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse Docteur Vétérinaire, Université Paul-Sabatier, Toulouse, 95p.

R

Ramet J.P.1997.Les agents de transformation du lait. In : Le fromage ; de la science à l'assurance qualité. Paris, Lavoisier, pp. 165-193. (Tech. Et Doc).

S

Sbadio O. A., Tercero E. J., Coutaz V. R., Luna J. A., Martinez E., 1997.Simultaneous interaction of PH, CaCl₂ addition, température and enzyme concentration on milk coagulation properties. Food science and technology international. n.3, p. p. 291-298.

Scriban R. Biotechnologie.Paris, Lavoisier,pp. 365-390 .

Scriban R., 1993. Biotechnologie. Ed. Technique et Documentation. Lavoisier. 4^{eme} Edition, 904 p.

Slamani R., 2003.Optimisation d'une méthode d'extraction de la pepsine ovine. Essai de purification et de caractérisation. Mém.Mag.Agr., Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 43p.

Sollberger H., Scharen W., Collomb M., Badrtscher R., Butikofr U., Sieber R.,2004. Beitrag zur kenntnis der zusammensetzung von ziegenmilch schweizerischer herkunft. ALP Sci., 473, p.p. 1-16

Stoll W., 2003. Vaches laitières : l'alimentation influence la composition du lait, RAPPOSIEUX, Agri., vol 09, N°15, p. 19.

V

Valles E., Furet J. P., 1981. Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine. Le lait, vol. 61, pp. 590-618.

Vierling E., 1999. Aliment et boissons : Filière et produits. Paris, Doin, 271 p. (Science des aliments).

Y

Yakhlef H., 1989. La production extensive de lait en Algérie. In Option méditerranéennes. n. 6, pp. 135-139.

Annexe 01

Préparation de la solution tampon (Kamoum ,1977)

- **Le tampon acétate de sodium 0,1M, PH 5 :**
 - Solution A : Acétate de sodium (Na) 0,1N :8,204g/l
 - Solution B : Acide acétique 0,1N :6,005g /l. pour avoir le tampon on mélange : 67,8ml de(A) + (100-67,8) ml de (B).
- **Solution acidifiée 0,2M d'HCL utilisée dans la macération.**
 - 19.68 ml HCL (d=1.159 ; concentration =37.5%) /1000 ml d'eau distillée.
- **Solution 0,01M de CaCl₂ entrant dans la composition du substrat de Berridge :**
 - 1,471g de CaCl₂/1000 ml d'eau distillée
- **Solution saturée de Nacl.**

120g de Nacl dans 300ml d'eau distillée, agité quelques minutes.
- **Préparation de l'extrait enzymatique concentré.**

On ajoute 300g de la solution saturée contenant 1% (v/v) d'HCL à 150g de l'extrait enzymatique.

Annexe 02

Préparation du substrat de Berridge :

I. Le constituant du substrat de berridge.

I.1 Le lait en poudre :

Le lait en poudre utilisé est de type LOW-HEAT obtenue à partir d'un lait écrémé pasteurisé de bonne qualité microbiologique (-5000 germes /ml).

C'est une poudre n'ayant subi qu'un chauffage faible qui entraîne un respect de l'état physico-chimique de protéines solubles du sérum, elle est conservée dans des sachets en plastique à +4°C

I.1 Solution de Ca Cl₂

La solution de CaCl₂ de qualité anhydre utilisé à une concentration de 0,01M, elle est préparée à partir d'une solution mère de CaCl₂ 1M. Conserver à 4°C.

II Mode opératoire :

Pour préparé 100 ml du substrat de berridge, on dissous 12g de lait en poudre dans 100ml de CaCl_2 à 0,01M. on verse tout d'abord une petit quantité de solution sur la totalité de la poudre humer manuellement avec un agitateur de façon à obtenir une bouillé homogène, le reste de la solution de CaCl_2 est alors ajouté sur cette bouillé, puis agité avec un agitateur magnétique pendant 30mn en évitant une agitation trop violente susceptible de produire une mousse. Puis vitrifié le pH de la solution obtenue est l'ajusté s'il ya lieu à 6.4 par l'ajout d'une solution de HCl ou de NaOH 0.1N. La température du substrat est ramenée à 35°C afin de mesurer le temps de coagulation, qui correspond à l'apparition des premiers flocons sur les parois internes du tube dans les conditions de réaction

Annexe 03

Dosage des protéines totales (lowry et al, 1951)

- **Solutions :**

- Solution(A) : 5% Na_2CO_3 , 2g dans 100ml de NaOH (0.1N).

- Solution(B) : 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in sodium-potassium tartrate à 1% (50mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 0.5%+100mg de tartrate de sodium- potassium à 1%) dans 100ml d' H_2O

- Solution(C) : 50ml de (A) +1ml de (B). (Réactif de lowry)

- Solution(D) : Na OH (0.1N). (4g /1l H_2O).

- Solution (E) : Réactif de folin-ciocalte au dilué 1/2l

- Solution (F) : B.S.A : 2mg dans 20ml d' H_2O .

- **Mode opératoire**

Ajouter 1ml de l'extrait enzymatique (clarifié et concentré) à 5ml de réactif de lowry, agitation (10min) puis on ajoute 0.5ml de réactif de Folin, en suit on incube le mélange pendant 30min à l'obscurité après une agitation rapide.

- **Courbe d'étalonnage :**

Préparation des solutions diluées croissantes : 10, 25, 50,75et 100 mg/ml à partir de la solution mère de B.S.A (200mg/ml).

Le tableau suivant explique les étapes de préparation :

	Témoin	01	02	03	04	05
[] BSA $\mu\text{g/ml}$	0	10	25	50	75	100
Solution filles BSA (μl)	0	100	250	250	750	1000
H ₂ O distillée (μl)	1000ml	900	750	500	250	0
Réactif de lowry (ml)	5	5	5	5	5	5

On agite et on attend 10min, en suite on ajoute 0.5ml de réactif de Folin pour chaque tube .on agite encore une fois puis on met les tubes à l'obscurité au minimum 30 min.Une coloration bleue se développe correspondant à la réaction du cuivre.

Lecture : La lecture des densités optique ce fait au spectrophotomètre après étalonnage à750 nm contre un blanc contenant 0.5ml d'eau distillée

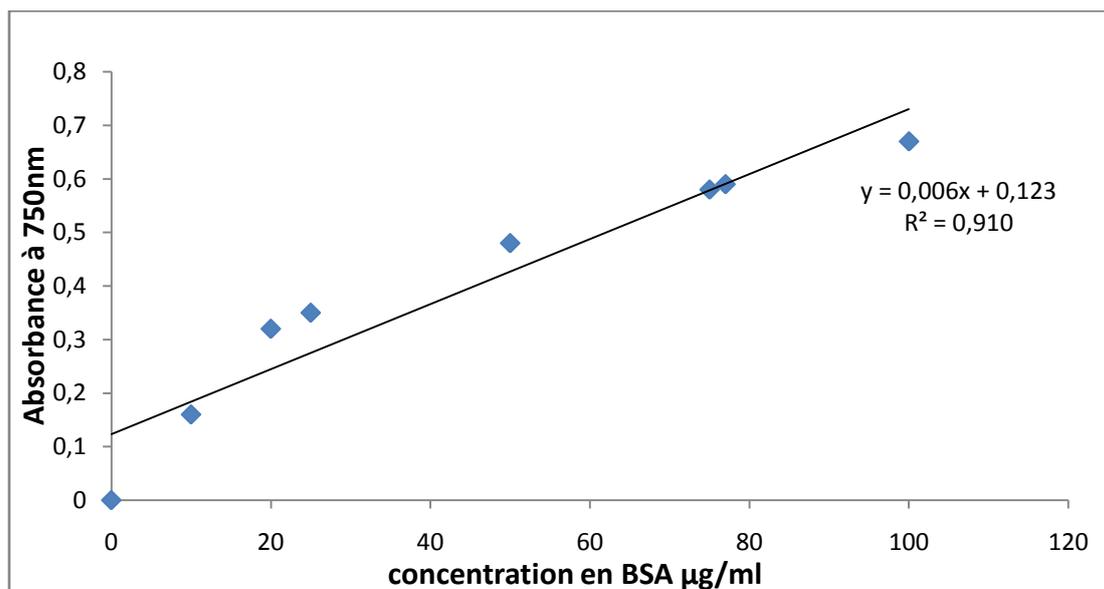


Figure n°1 : courbe étalon de B.S.A.

Annexe 04

Mesure de l'activité protéolytique (GREEN et STACKPOOLE, 1975).

I. Mode opératoire :

➤ Condition d'hydrolyse :

1ml de la solution de caséine à 2% dans le tampon acétate de sodium (0.1N, PH5) (Annexe 03) est additionné à 1ml d'extrait enzymatique dilué. Le mélange ainsi obtenu est incubé pendant 10, 30, 60, 90, 180 min à 35°C.

Après l'incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 5ml d'une solution trichloracétique (T.C.A) à 12%(p/v), suivie d'un temps de repos ne dépassant pas 15min.

Le précipité blanc qui se forme est séparé par centrifugation à 6200T /min pendant 10min.

• Préparation de l'échantillon :

1ml de filtrat (surnageant obtenu) sont additionnées à 5ml de la solution(C). (Annexe 03)

On mélange puis on laisse incubé pendant 10min dans le bain marie à 30°C. Chaque tube reçoit 0.5ml de réactif de Folin, on agite immédiatement et on continue l'incubation pendant 20min.

➤ Préparation de témoin (blanc) :

1ml de la solution caséinique à 2% sont additionnés à 5ml de T.C.A à 12% (pour empêcher la réaction enzymatique) puis on ajoute 1ml d'extrait enzymatique dilué. Le mélange ainsi préparé et traité de la même façon que précédemment.

II. Courbe étalon de tyrosine :

Préparer des solutions diluées croissantes : 20, 40, 60, 80 et 100mg/ml.

Le tube témoin contient 1ml d'eau distillé.

Selon le tableau suivant les principales étapes sont résumées comme suite :

Tube	Témoin	1	2	3	4	5
[] de tyrosine ($\mu\text{g/ml}$)	0	20	40	60	80	100
Solution fille de tyrosine (μl)		200	400	600	800	1000
Eau distillé (ml)	5	5	5	5	5	5

-Ajouter dans chaque tube 5ml de la solution (C).

-Incuber pendant 10min à 35°C au bain marie.

-Ajouter dans chaque tube 0.5ml de la solution (D) et agiter fortement

-Laisser incuber 20min à 35°C .

- **Lecture de l'absorbance :**

La lecture de la densité optique se fait au spectrophotomètre après étalonnage à une longueur d'onde 660nm.

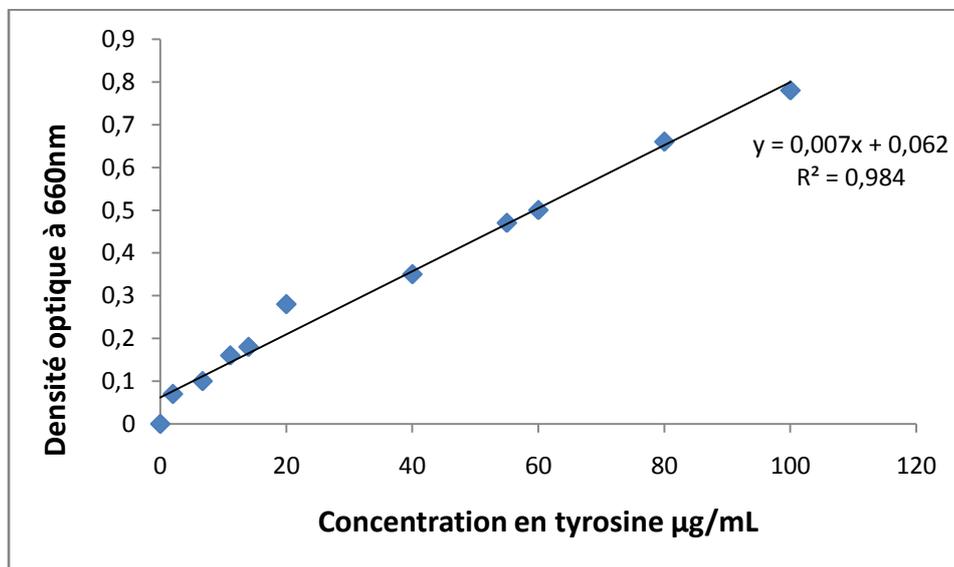


Figure n°2 : courbe étalon de tyrosine.

Annexe n°5 :

Dosage de la matière grasse du lait par la méthode de GERBER (AFNOR 1986, NFV 04-210)

1. Mode opératoire :

Introduire dans un butyromètre de Gerber :

- 11ml de lait
- 10ml d'acide sulfurique de densité 1,84
- 1ml d'acide iso amylique

Fermer le butyromètre à l'aide d'un bouchon, mélanger jusqu'à totale dissolution puis centrifuger pendant 3 minutes dans une centrifugeuse Gerber (1200 tours/ min).

2. Expression des résultats :

La lecture se fait directement sur les graduations du butyromètre et les résultats sont exprimés en g/l.

Annexe n°6

Dosage de la matière azotée totale selon la méthode de KJELDAHL (AFNOR, 1986) :

1. Mode opératoire :

a. Minéralisation :

Dans un matras KJELDAHL, introduire d'échantillon. Ajouter 15 à 20 ml d'acide sulfurique concentré, environ 2g de catalyseur composé de 100g de sulfate de potassium, 10g de sulfate de cuivre pur et 1g de sélénium en poudre pur, après homogénéisation laisser pendant 3 heures dans le minéralisateur jusqu'à obtention d'une solution limpide et ceux-ci par chauffage modéré, puis fort en évitant de surchauffer les parois du matras.

b. Distillation et dosage de l'ammoniac :

Après refroidissement, le minéralisât est récupéré avec précaution dans une fiole de 100ml avec l'eau distillé.

Transverser 20ml du minéralisât dilué dans un ballon additionné de 20ml de lessive de soude à 33% (d= 1,33), plus 80ml d'eau distillé.

- Placer le ballon dans le dispositif de distillation.
- Placer l'allonge qui termine le dispositif dans un bicher de 200ml contenant 20ml d'acide borique à 4% et 2gouttes d'indicateur (TASHIRO)

Après distillation tirer le distillat avec l'acide sulfurique à N /50 (d= 1,83).

2. Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche (M.S) de façon suivante :

$$N_{(g)} = X \cdot 280 \cdot y \cdot (100/Y) \cdot (100/A)$$

Ou :

X : densité de la burette (ml).

Y : prise d'essai (5ml).

A : volume du minéralisât 20ml.

Y : Constante (10^{-6})

$$\text{La teneur en M.A.T. (\%M.S)} = N_{(g)} \cdot (6,25/ M.S) \cdot 100$$

Annexe n°7



Figure n°3 : caillettes broyées

Annexe n°8



Figure n°6 : substrat de Berridge.

Annexe n°09



Figure n°7 : lait standard coagulé par l'EEB

Le résumé :

Le présent travail a consisté, d'une part, à extraire la pepsine ovine et étudier son effet coagulant sur le lait standard et le lait issu de différentes races. D'autre part, à mettre en évidence l'influence de la race sur la coagulation et la composition de lait,

Un extrait enzymatique utilisé comme succédané de présure a été préparé à partir des caillottes ovines. Il est caractérisé par une activité coagulante de 1/1714, celle-ci est optimale à pH 5,2, à une température de 55°C et pour une concentration en CaCl₂ 0,1 M. Il se caractérise aussi par une concentration en protéine de 2mg /ml.

Les agents coagulants d'origine animale restent prometteur et peuvent se révéler rentable, ils suscitent de se fait un intérêt particulier et méritent plus d'attention et de recherche.

Mots clé : lait, race, pepsine, présure, coagulation.

Abstract:

This work consisted, firstly, to extract ovine pepsin and study its coagulating effect on standard milk and milk from different breeds; secondly; to highlight the influence of race on coagulation and milk composition;

An enzyme extract used as a substitute for rennet was prepared from sheep rennet , it is characterized by a coagulation activity of 1/1714 , it is optimal at pH 5.2, at a temperature of 55°C and a concentration of CaCl₂ 0.1 M .It is also characterized by a protein concentration of 2mg/ml.

Coagulants agents of animal origin are promising and may prove profitable , they arouse is of particular interest and deserve more attention and research .

Key words: milk, breed, pepsin, rennet, coagulation.