

OPTIMISATION DES PARAMETRES DE FLOCCULATION ET DE COAGULATION DU LAIT CAMELIN AVEC LA PEPSINE DE POULET EN COMPARAISON AVEC LE LAIT BOVIN PAR LA METHODE DES SURFACES DE REPONSE

Biya BOURAS^{1,2*}, Ouarda AÏSSAOUI-ZITOUN¹, Ferial-Aziza BENYAHIA-KRID¹, Fairouz DJEGHIM³, Mohammed Nassereddine ZIDOUNE³

¹Laboratoire du Génie Agro-Alimentaire (GENI.A.A.L), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA). Université Frères Mentouri, Constantine-25000, Algérie.

²Laboratoire de recherche en Biodiversité et Application de la Biotechnologie dans le domaine Agricole (BABDA). Université d'El Oued. El Oued-39000, Algérie.

³Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA). Université Frères Mentouri, Constantine-25000, Algérie.

*bouras-biya@univ-eloued.dz

RÉSUMÉ

La pepsine de poulet, succédanée de présure est une enzyme protéolytique extraite du proventricule du poulet (*Gallus gallus*), considéré comme un sous-produit d'abattage. L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet de la variabilité des conditions de coagulation (pH et de température) sur l'action de la pepsine de poulet dans le lait camelin en exploitant la méthode statistique des surfaces de réponse. Cette méthode a été utilisée pour étudier l'influence des variations de pH et de température sur le temps de floculation et de coagulation du lait camelin avec la pepsine de poulet en comparaison avec le lait bovin. Les treize combinaisons des paramètres donnés par la méthode de surface sont pour une variation de pH de 5 à 6.7 et de température de 30°C à 42°C. Ces combinaisons ont été utilisées pour mesurer le temps de floculation et le temps de coagulation des laits après ajout de l'enzyme. Cette méthode nous a permis de déterminer une relation d'approximation entre les variables d'entrée (pH et température) et la réponse de sortie (temps de floculation et temps de coagulation). Il y a un effet significatif du pH (effet linéaire) sur la floculation du lait camelin avec la pepsine de poulet. Pour le lait bovin, l'effet du pH est unique et quadratique positif. Concernant la coagulation, les résultats montrent que les deux types de lait sont sensibles au changement du pH avec la pepsine de poulet avec uniquement un effet linéaire pour le lait camelin et un effet linéaire et quadratique pour le lait bovin. En conclusion, cette enzyme du proventricule de poulet peut être bien valorisée dans la transformation laitière.

ABSTRACT

Optimization of the flocculation and coagulation parameters of camel milk with chicken pepsin in comparison with cattle milk by the response surfaces method

Chicken pepsin, a rennet substitute, is a proteolytic enzyme extracted from the proventriculi of chicken (*Gallus gallus*), considered to be a slaughter by-product. The objective of this work is to determine the effect of the variability of the coagulation conditions (pH and temperature) on the action of chicken pepsin in camel milk by exploiting the statistical method of response surfaces. This method was used to study the influence of variations in pH and temperature on the flocculation and coagulation time of camel milk with chicken pepsin in comparison with bovine milk. The thirteen combinations of the parameters given by the surface method are for a variation of pH from 5 to 6.7 and temperature from 30°C to 42°C. These combinations were used to measure the flocculation time and the clotting time of milks after addition of the enzyme. This method allowed us to determine an approximation relationship between the input variables (pH and temperature) and the output response (flocculation time and coagulation time). For flocculation, our result shows that there is a significant effect of pH (linear effect) on the flocculation of camel milk with chicken pepsin. Whereas for cow milk, the effect of pH is unique and quadratic positive. Concerning coagulation, the results show that the two types of milk are sensitive to the change in pH with chicken pepsin with only (linear effect) for camel milk and linear and quadratic effect for cow milk. In conclusion, this enzyme from the chicken proventriculus can be well valued in dairy processing.

INTRODUCTION

La pepsine de poulet est une enzyme extraite à partir des proventricules du poulet (*Gallus gallus*) considérés comme un sous-produit d'abattage. Ces organes de longueur moyenne de 3 cm sont situés au-dessus du gésier et recouverts d'une couche d'épithélium formé de cellules cylindriques visibles à l'œil nu. Ces cellules sont responsables de la sécrétion de pepsinogène et de l'acide chlorhydrique [1]. La pepsine de poulet est sensible au changement de pH. En effet, l'optimum de son activité est entre pH 1,5 et 4,5. A pH 1,5 elle est active à 90%, et elle perd son activité avec l'augmentation de pH pour atteindre 35 % de son activité maximale à pH 4,5, et reste stable jusqu'à pH de 8 et elle est totalement inactivée au-delà de pH 8,5 [2]. La filière avicole en Algérie a connu un développement considérable suite à des politiques avicoles incitatives. Compte tenu du déficit des productions animales classiques, l'Algérie a opté pour le développement d'une production avicole intensive, cette production atteint 250000 tonnes en 2011 [3]. Cette évolution de la production aviaire, ainsi que l'importation continue et croissante d'enzymes coagulantes pour la transformation laitière, suggèrent à d'exploiter un des substituts de la présure bovine disponible en Algérie. Ceci est pour limiter la dépendance vis-à-vis des importations et pour mieux valoriser les pratiques et la biodiversité qu'offre notre patrimoine traditionnel. Il s'agit ici de la pepsine de poulet [3].

Le lait camelin et les produits laitiers jouent un rôle important dans l'alimentation quotidienne des communautés rurales en Asie, en Afrique et au Moyen-Orient [4]. Ce lait contient tous les nutriments essentiels présents dans le lait de vache [5]. La production de lait de chamelle, journalière et annuelle, en Algérie est respectivement de 3 kg/j et 1,460 kg/an [6]. La coagulation de ce lait est connue pour être très difficile [7,8]. L'aptitude à la coagulation du lait de chamelle avec de la présure bovine et des enzymes gastriques de dromadaire a été étudiée des essais préliminaires dont les résultats ont été probants [9,10,11]. La disponibilité du proventricule et probablement son coût dérisoire seraient des arguments valables pour proposer ce type de valorisation en Algérie [3]. Dans ce travail, notre objectif est l'optimisation de deux paramètres clés la coagulation (pH et température) du lait camelin avec la pepsine de poulet en comparaison avec le lait bovin.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériel

1.1.1. Lait : Les échantillons de lait de chamelle ont été collectés à partir de troupeaux de dromadaires de

race Sahraoui, en élevage extensif dans des parcours naturels de la région d'El Oued (Sud-Ouest de l'Algérie).

Le lait a été acheminé directement après la traite dans une glacière contenant des glaçons au laboratoire, puis conservés à -18°C jusqu'à utilisation. Les échantillons de lait de vache utilisés dans notre étude, provenaient d'une ferme localisée dans la même région. Le substrat standard de BERRIDGE a été préparé en dissolvant 12 g de poudre de lait écrémé dans 100mL d'une solution de chlorure de calcium 0,01 M [12]. Le lait en poudre écrémé (1Kg) provenait de la laiterie SoufLait (El Oued). Le lait ainsi préparé a été stocké à 4°C pendant 12 h afin de permettre l'établissement de l'équilibre physico-chimique. Il a été utilisé pour étudier l'activité coagulante de la pepsine de poulet et le temps de la floculation.

1.1.2. Pepsine de poulet : La pepsine de poulet est préparée à partir de proventricules. Les proventricules de 8 et 10 g, ont été récupérés après abattage, incisés, puis rincés à l'eau et répartis en lots de 100 g. Ils ont été utilisés pour l'extraction de l'enzyme en suivant le protocole proposé par **Bohak (1970)** [13] cité par **Nouani et al. (2011)** [14]. Les proventricules hachés ont été mis dans une solution saline de macération (30 g/L de NaCl et 7g/L de NaHCO₃), à raison de 300 mL de la solution de macération pour 100g de proventricules. Après 3h de macération sous agitation, le pepsinogène a été activé par ajout d'HCl (3N) jusqu'à pH=2. Ensuite, le mélange a été maintenu à température ambiante pendant 15 minutes, puis filtré pour récupérer l'extrait brut de pepsine de poulet. Le filtrat a enfin été centrifugé (à 3200g pendant 30 min à 4°C; centrifugeuse SEGMA model 3-30K, Allemagne). Le pH du surnageant obtenu a été ajusté à pH 6,4 par une solution de NaOH (3N). Il représentait l'extrait de pepsine clarifiée.

1.2. Méthodes

1.2.1. Caractérisation de l'extrait enzymatique

L'unité d'activité coagulante a été évaluée dans le substrat standard de Berridge à 30°C [12] et la force coagulante a été exprimée en force coagulante de Soxhlet [15] qui correspond au volume de lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique en 40 minutes, à 35°C et pH 6,4 du lait cru. La teneur en protéines a été déterminée selon la méthode de Kjeldahl (**ISO 8968-1**). Le temps de coagulation correspond au moment où apparaissent les premières gouttelettes du lactosérum sur la surface du gel, le coagulum devient rigide et ne coule plus sur les parois du tube [13]. Ce temps de coagulation est réalisé directement sur le lait cru à 35°C. Selon la (**FAO, 2005**), la coagulation enzymatique ou le temps de prise est entre 25 et 30 min.

L'activité spécifique des enzymes est exprimée par le rapport entre l'activité coagulante de l'extrait enzymatique et le taux de protéines de cet extrait

enzymatique est exprimée en UP (unité présure) /mg [16].

1.2.2. Optimisation du temps de floculation et de la coagulation de pepsine de poulet

Dans le but d'optimiser les meilleures conditions de pH et de température pour la coagulation du lait camelin et du lait bovin par la pepsine de poulet et aussi de minimiser le nombre d'expérimentation, nous avons choisi d'utiliser la méthode statistique du plan d'expérience. Cette méthode nous permet de fixer les paramètres d'expérimentation en fonction des limites des variables étudiées. Les résultats sont schématisés par la méthode des surfaces de réponse (MSR). Un plan composite central à deux facteurs a été étudié à cinq niveaux ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$). Les treize couples donnés correspondent à une gamme de pH entre 5 et 6.7 et une gamme de température entre 30°C et 42°C.

La modélisation de la réponse a été réalisée à l'aide de techniques de régression qui permettent de relier les réponses « Y » aux facteurs « X_1 » et « X_2 » selon les relations suivantes : $Y = f(X_1, X_2)$. Le comportement des surfaces de réponse des deux formulations a été expliqué par le modèle de second ordre selon l'équation suivante :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

Y : représente la fonction de réponse ;

b_0 : est une constante qui exprime l'effet moyen général ;

b_1 et b_2 : sont les coefficients des effets linéaires ;

b_{11} , et b_{22} : sont les coefficients des effets quadratiques ;

b_{12} : est le coefficient des effets interaction ;

X_1 et X_2 : représentent les variables codées indépendantes.

Le logiciel MINITAB 19 est utilisé pour déterminer les coefficients pour chaque réponse. Le degré de signification des coefficients a été déterminé à l'aide de la valeur de p , le seuil de significativité a été fixé à 0,05, le d entre 0,7 et 1 et le R^2 entre 50% et 100%.

La représentation graphique de ces équations a été effectuée, en utilisant le logiciel statistique STATISTICA 10.

Dans notre étude, nous avons fixé les valeurs cibles de (200s) pour la floculation, c'est le temps pour nécessaire pour calculer l'activité coagulante et de 15 min (900s) pour la coagulation [17].

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Caractéristiques de l'extrait enzymatique

Les caractéristiques de l'extrait enzymatique (teneur en protéines, activité coagulante, force coagulante, activité spécifique et temps de coagulation) utilisées dans notre étude sont présentées dans le **tableau 1**.

L'extrait enzymatique de pepsine de poulet a une teneur en protéine de $20 \pm 0,00$ mg/mL ce qui est en

accord avec les résultats de **Siar (2014) [18]**. Elle est supérieure à la valeur rapportée par **Adoui (2007) [19]** et **Aissaoui-Zitoun et al (2017) [20]** et inférieure à celle rapportée par **Benyahia-Krid (2013) [3]**. L'activité coagulante était de $1,98 \pm 0,02$ UP.mL⁻¹, elle est proche de la valeur rapportée par **Aissaoui-Zitoun et al (2017) [20]** qui est de 2,613 UP.mL⁻¹. La pepsine de poulet a une force coagulante de 1/6153,85 US. Si l'on regarde le temps de coagulation, le lait bovin réagit mieux avec la pepsine que le lait camelin.

2.2 Optimisation de l'activité enzymatique

2.2.1 Effet du pH et de température sur le lait camelin

Le diagramme de surface du temps de floculation et de coagulation du lait camelin par la pepsine de poulet est illustré dans la **figure 1**.

Le pH a eu un effet significatif sur la floculation du lait camelin avec la pepsine de poulet. En effet, le coefficient de régression b_1 présente une valeur de P inférieure à 0,05 (0,004). Pour la coagulation, le pH a eu aussi un effet significatif avec la pepsine de poulet dont le coefficient de régression b_1 présente une valeur de P inférieure à 0,005 (0,003).

Le lait camelin semble sensible à la variation du pH avec la pepsine de poulet (effet linéaire).

En se basant sur la figure 1, on propose un couple de pH et de température pour un temps de floculation et de coagulation optimale du lait camelin : ($X_1=5/X_2=42$).

2.2.2 Effet du pH et de température sur le lait bovin

Le diagramme de surface du temps de floculation et de coagulation du lait camelin par la pepsine de poulet est présenté dans la figure 2.

Les résultats montrent l'effet linéaire du pH et l'effet quadratique positif sur la floculation du lait bovin par la pepsine de poulet où la valeur du P du coefficient de régression b_1 est (0,00) et b_{11} est (0,00) présentent des valeurs de P inférieures à 0,05. Concernant la coagulation, le pH a un effet significatif linéaire et quadratique (effet positif). Les coefficients de régression b_1 et b_{11} présentent une valeur de P inférieure à 0,05 : b_1 (0,010) et b_{11} (0,003).

Le lait bovin, semble également sensible à la variation du pH avec la pepsine de poulet (effet linéaire et quadratique).

En se basant sur la figure 2, on propose respectivement un couple de pH et de température pour un temps de floculation et de coagulation optimale du lait bovin : ($X_1=5,49/X_2=39,45$) et ($X_1=5,82/X_2=42$).

CONCLUSION

La pepsine de poulet est une enzyme qui peut être valorisée dans la coagulation du lait camelin. Cela offre la possibilité de varier les produits laitiers camelins principalement dans les zones semi-arides et arides de l'Algérie. Le proventricule de poulet,

source de l'enzyme, est un co-produit de l'industrie de poulets, qu'il est facile de se procurer tout au long de l'année. La pepsine peut être valorisée dans l'industrie agro-alimentaire, notamment fromagerie. Grâce à l'optimisation du pH et de la température de la coagulation, le lait camelin peut passer d'une valorisation traditionnelle à une valorisation industrielle.

REFERENCES

1. Alamareot J, 1982. Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaire (Edition du point vétérinaire-Alfort), pp 289.
2. Bohak Z, 1969. J. biological chemistry. Vol 244, N°17, pp 4638-4648.
3. Benyahia-Krid F.A, 2013. Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des proventricules de volailles au profit de la filière lait en Algérie, Thèse doctorat en sciences, Université Mentouri Constantine.
4. Pak V.V., Khojimatov O.K., Abdiniyazova G.J., Magay E.B, 2019. J. Ethn. Foods, 6:20.
5. Al haj O.A., Al Kanhal H.A, 2010. Int. Dairy J, (20), 811-821.
6. Farah Z, 2011. Camel Milk, In Encyclopedia of Dairy Sciences (2nd ed.) Editor-in-Chief, pp 512-517.
7. Farah Z., Bachman M.R, 1987. Milchwissenschaft, (42), 689-692.
8. Ramet J.P, 1993. Production et santé animales, Etude F.A.O, pp113.
9. Wangoh J., Farah Z., Puhan Z, 1993. Milchwissenschaft Milk Sci. Int., (48), 322-325.
10. Gorban A.M.S., Izzeldin O.M, 1997. In J. Dairy Technol, (64), 471-474.
11. Siboukeur O., Mati A., Hesses B, 2005. Cahiers agricultures vol 14, N° 5, septembre-octobre, 5(14), pp 473- 478.
12. Alais C, 1974. Principes des techniques laitières : science du lait (Ed Publicité, Paris), pp 513.
13. Bohak Z, 1970. Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes. (Ed G. E). Perlmann and L. Lorand, Acad. Press Inc., New York, V 19. 1042, pp 347-358.
14. Nouani A., Hamrani L., Bellal M. M, 2011. Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 29 et 30 mars.
15. Veisseyre R, 1979. Technologie du lait, maison rustique (3ème édition refondue de techniques laitière), pp 715.
16. Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M.M., Dadie A, 2009. J. Food Technol., 7: 20-29. Nutrition, (39), pp 1-13.
17. 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.
18. Siar E.H, 2014. Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait. Mémoire de magister, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaire, Université Mentouri Constantine 1.
19. Adoui F, 2007. Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir de proventricules de poulet, Mémoire de magister en sciences, Université Mentouri, pp 97.
20. Aïssaoui-Zitoun O., Benyahia-Krid F.A., Arar L., Korichi D., Boughellout H., Adoui F., Siar E.H., Harkati A., Zidoune M.N, 2017. Utilisation de la pepsine de poulet dans la coagulation du lait de chamelle, Douzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, 05 et 06 avril 2017.

Tableau 1. Principales caractéristiques de l'extrait enzymatique.

Enzyme	Protéine (mg/ml)	Activité coagulante (UP.ml ⁻¹)	Activité spécifique (UP.mg ⁻¹)	Force coagulante (US)	Temps de coagulation (s)	
					Lait camelin	Lait bovin
Pepsine de poulet	20±0,00	1,98 ± 0,02	0,1± 0,01	1/6153,85	119,4±0,6	88,2±4,2

Figure 1 : Diagramme de surface du temps de floculation et de coagulation du lait camelin par la pepsine de poulet.

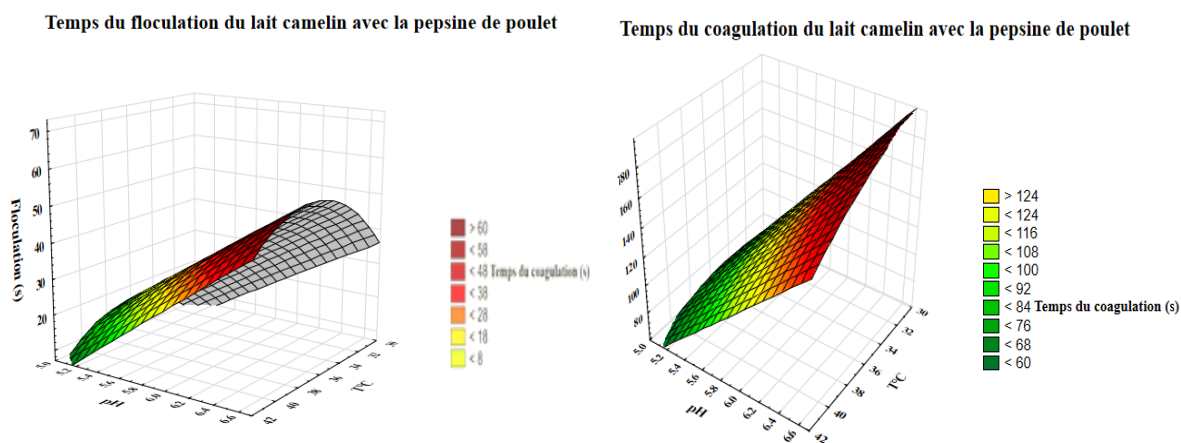


Figure 2 : Diagramme de surface du temps de floculation et de coagulation du lait bovin par la pepsine de poulet.

