

UTILISATION DE LA PEPSINE DE POULET DANS LA COAGULATION DU LAIT DE CHAMELLE

**Ouarda Aïssaoui-Zitoun^{1*}, Fériat-Aziza Benyahia-Krid¹, Lamia Arar¹, Dounia Korichi¹,
Halima Boughellout¹, Faiza Adoui¹, El-hocine Siar¹, Amani Harkati¹, Mohammed
Nassereddine Zidoune¹**

*¹Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.), équipe
(TEPA), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires
(INATAA). Université Frères Mentouri, Constantine 1, Route Ain El Bey, Constantine-25000,
Algérie.*

**azouarda@yahoo.fr*

RÉSUMÉ

La pepsine de poulet est une enzyme protéolytique peu valorisée dans la coagulation des laits en dehors du lait de vache. L'objectif de ce travail est l'étude de la coagulation du lait de chamelle, connu pour sa faible aptitude coagulante, par la pepsine de poulet en comparaison avec la présure de commerce et le lait de vache. Les résultats ont montré que l'extrait clarifié de pepsine a une teneur en protéines de 3,20 mg/ml, une activité coagulante de $10,2 \pm 1,14$ UP (unité présure), et une force coagulante estimée à 1/19282,44. En ce qui concerne l'activité spécifique, l'extrait de pepsine a une activité de 3,18 UP/mg. Son activité protéolytique a été estimée à 1075,9 µg/ml. Le lait de chamelle présente une faible aptitude à la coagulation par rapport au lait de vache marquée par un temps de floculation lent. A 35°C, la pepsine de poulet montre une force coagulante sur le lait de vache 6 fois plus importante que sur le lait camelin et ceci au pH natif de chaque type de lait. Cependant, et à 42°C, le temps de coagulation du lait de chamelle sous l'action de la pepsine a été similaire à celle du lait de vache. Le coagulum du lait camelin par la présure apparaît comme un précipité granulé dispersé dans le lactosérum, alors qu'avec celui de la pepsine le coagulum forme un gel homogène et ferme. La pepsine de poulet peut donc être valorisée dans la coagulation du lait camelin et offre la possibilité de varier les produits laitiers à partir de ce lait.

ABSTRACT

USE OF CHICKEN PEPSIN IN CAMEL MILK COAGULATION

The chicken pepsin is a proteolytic enzyme, poorly developed in no-cow's milk coagulation. The objective of this work is the study of the camel milk coagulation, known for its weak coagulating aptitude, by the chicken pepsin in comparison with cox's milk and standard rennet. Results showed that the clarified pepsin extract has a content of proteins of 3.20 mg/ml, a coagulating activity of 10.2 ± 1.14 UP, and a coagulating force estimated at 1/19282.44. With regard to the specific activity, the pepsin extract has an activity of 3.18 UP/mg. Its proteolytic activity was estimated to 1075.9 µg/ml. The camel milk exhibits a weak aptitude for coagulation compared to the cow's milk marked by a slow flocculation time. At 35 ° C, chicken pepsin shows a coagulant force on cow's milk 6 times higher than on camel milk at the native pH of each milk. However, and at 42°C, the coagulation time of camel milk by pepsin was similar to that of the cow's milk. Camel milk coagulum with rennet appears as a granulated precipitate dispersed in the whey, whereas with that of pepsin the coagulum form a homogeneous and firm gel. The chicken pepsin can thus be developed in camel milk coagulation and offers the possibility of varying the dairy products starting from this milk.

INTRODUCTION

La pepsine de poulet est une enzyme protéolytique extraite du proventricule de poulet. C'est une enzyme peu valorisée dans la coagulation des laits en dehors du lait de vache. La coagulation, première étape de la fabrication, est la clé de la réussite de n'importe quel fromage. Elle consiste en la transformation du lait en gel suite à des modifications physico-chimiques intervenant sur les micelles de caséines et elle est souvent le résultat de l'action d'enzymes de différentes origines (animales, végétales et microbiennes). La présure, initialement extraite de la caillette de jeunes ruminants, est constituée d'un complexe enzymatique de chymosine et de pepsine (A et B). C'est la principale enzyme protéolytique utilisée. Les présures commercialisées en France contiennent au moins 520 mg L⁻¹ de chymosine active et un rapport chymosine/pepsine A supérieur à 1,38 (Choisy *et al.*, 1997). Cependant, sa production connaît une pénurie mondiale croissante due essentiellement à une augmentation de la production et de la consommation du fromage, et l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production de présure. Cette pénurie a provoqué des fluctuations très importantes de son prix (Cuvellier, 1993).

Les différents types de lait utilisés en fromagerie sont le lait de vache, de chèvre et de brebis. Dans le cas du lait de chamelle la transformation en produits laitiers est très réduite. La production de lait de chamelle, journalière et annuelle, en Algérie est respectivement 3 kg/j et 1,460 kg/an (Farah, 2011). La coagulation de ce lait est connue pour être très difficile et très lente (Farah, 1987 ; Ramet, 1993). Elle a été particulièrement explorée par des essais préliminaires avec la présure bovine et avec les enzymes gastriques de dromadaire dont les résultats ont été probants (Wangoh *et al.*, 1993 ; Gorban et Izzeldin, 1997 ; Siboukeur *et al.* 2005). Ces premiers résultats sont encourageants, mais le problème de cette coagulation persiste toujours et nécessite une enzyme moins coûteuse et plus disponible. Notre travail visait à évaluer l'aptitude à la coagulation du lait camelin par des succédanés de présure traditionnellement utilisés dans la fabrication de fromages algériens et qui sont très peu valorisés, soit la pepsine de poulet. L'objectif de cette coagulation est la fabrication d'un fromage frais à partir de lait camelin. Sa caractérisation physicochimique et sensorielle a également été évaluée.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériel

1.1.1. Lait : Les échantillons du 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 OUAD SOUF distante de Constantine de 335 kms.

Le lait est congelé directement après la traite puis acheminé dans une glacière au laboratoire. Les échantillons sont vérifiés par mesure de pH et d'acidité, puis conservés à -18 °C jusqu'à utilisation. Les échantillons de lait de vaches utilisés dans notre étude, proviennent d'une ferme localisée à Masinissa (Constantine). Le substrat standard de BERRIDGE est préparé par la dissolution de 12 g de la poudre de lait écrémé dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01 M (Alais, 1974). Le lait en poudre écrémé (1 Kg) est de qualité « moyen chauffage » de marque SOLAREC S.A. (Belgique) et provient de la laiterie SAFILAIT (Constantine). Le lait ainsi préparé est stocké à 4°C pendant 12 h afin de permettre l'établissement de l'équilibre physico-chimique. Il est utilisé pour étudier l'activité enzymatique de la pepsine de poulet.

1.1.2. Enzymes de coagulation

1.1.2.1. Pepsine de poulet

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

1.1.2.2. Présure

La présure se présente sous forme de poudre (Fromase, France) de force coagulante 1/220000. La solution mère de présure est préparée par reconstitution de 1 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée. Cette solution est conservée à 4°C durant 3 jours maximum.

1.2. Méthodes

1.2.1. Analyse physicochimique des laits

La détermination du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre électronique (HANNA instruments, Roumanie), l'acidité titrable est mesurée avec la soude Dornic (0,1N) (AFNOR, 1993) et la teneur en matière grasse

du lait par la méthode de Gerber (AFNOR, 1993). La détermination de l'extrait sec est effectuée par un étuvage sous vide à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ jusqu'à poids constant de l'échantillon (AFNOR, 1993).

1.2.2. Caractérisation des extraits enzymatiques

La teneur en protéines des extraits est réalisée selon la méthode de Lowry (1951). L'activité protéolytique est déterminée en mesurant les unités aspartyl-protéases (Anson et al. 1938, cité par Mechakra *et al.* 1999). Son principe consiste à mesurer l'accroissement des produits d'hydrolyse obtenus par action enzymatique sur la caséine solubilisée dans l'acide trichloracétique (T.C.A.) à 12% concentration finale. Le mélange réactionnel est constitué de 2 ml de la solution de caséine 1% (1g de caséine dans 100 ml du tampon acétate de sodium, pH=5,2) à la quelle est ajouté 1 ml de d'extrait enzymatique. Le mélange est incubé à 35°C pendant 1heure, la réaction est arrêtée par l'ajout de 5 ml de T.C.A. à 12%, après un temps de repos de 15 min les produits d'hydrolyse sont séparés par une centrifugation à 6200g pendant 10 min. Dans notre étude, l'évaluation du taux de dégradation du substrat (caséines) pendant la réaction d'hydrolyse est réalisée par le dosage de la tyrosine soluble dans le T.C.A. à 12% selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). L'unité d'activité coagulante est évaluée dans le substrat standard de Berridge à 30°C (Alais, 1974) et la force coagulante est exprimée en force coagulante de Soxhlet (Veisseyre, 1979) 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. Selon Ramet (1993), la température optimale de coagulation du lait camelin se situe à $40-42^{\circ}\text{C}$. Le temps de coagulation du lait camelin a donc été évalué à 42°C en comparaison avec le lait de vache à la même température. Il en va de même pour la force coagulante du lait de chamelle mesurée à 42°C . La température de 35°C est la température optimale pour le lait de vache. 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 enzymatiques et exprimée en UP (unité présure)/mg (Nouani *et al.*, 2009).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Caractéristiques des laits

Les résultats des analyses physico-chimiques des deux types de lait utilisés pour l'étude de la coagulation avec la pepsine de poulet sont résumés dans le tableau 1. Le lait camelin a un pH de $6,54 \pm 0,01$ qui est légèrement plus faible que celui de vache. L'acidité du lait de vache est comprise dans l'intervalle cité par FAO (1995). L'acidité du lait de chamelle est proche de celle donnée par Siboukeur *et al.* (2005). Cependant elle est supérieure à celle rapportée par Elamin et Wilcox (1992) en Arabie Saoudite (15°D) et Kamoun (1994) en Tunisie ($15,6 \pm 1,4^{\circ}\text{D}$). En effet, le lait de chamelle a une forte concentration en

acides gras volatiles (Yagil, 1985) et une teneur relativement élevée en vitamine C (Saley, 1993) qui peuvent influencer son acidité. La teneur moyenne en extrait sec total enregistrée pour le lait de vache est de $12,4\% \pm 0,2\%$ qui est comparable à la teneur donnée par la FAO (1995) (12,8 %). Pour le lait de chamelle, la valeur enregistrée est de l'ordre de $11,6 \pm 0,2\%$. Elle est du même ordre de grandeur que celle rapportée pour la race Hamra ($11,6 \pm 1,1$) selon Mehaia *et al.* (1995). Cependant, elle se situe entre les teneurs rapportées par Debouza *et al.* (2014) ($10,24 \pm 0,46\%$); et par Abu-Lehia (1989) du lait des races Majaheem et Somali (12,15 %). L'une des principales caractéristiques du lait camelin est en effet, sa teneur en matière sèche réduite par rapport à celle des laits d'autres espèces (Ramet, 1994). La teneur en matière grasse enregistrée dans le lait de vache est supérieure à l'intervalle donné par AFNOR (1993) ($28,5$ à $32,5$). Pour le lait de chamelle, elle est comparable à celle rapportée pour la race Hamra $28,5$ g/l et supérieure à celle de la race Wadah ($24,6$ g/l) (Mehaia *et al.*, 1995).

2. Caractéristiques des extraits enzymatiques

Les caractéristiques des extraits enzymatiques (teneur en protéines, activité protéolytique, l'activité et la force coagulante et l'activité spécifique) utilisés dans notre étude sont présentées dans le tableau 2.

L'extrait de présure est caractérisé par une teneur en protéines de $0,305 \pm 0,20$ mg / ml, une activité coagulante de $11,67 \pm 0,90$ et une force de $1/13924$. Par ailleurs l'extrait clarifié de pepsine dispose d'une teneur en protéines de $3,20$ mg/ml et son activité coagulante est de $10,2 \pm 1,10$ U.P. Cette activité est proche à la valeur trouvée par Nouani *et al.* (2011). En termes de force coagulante l'extrait de la pepsine que nous avons obtenu a une force de $1/19282$ et une activité spécifique de $3,20$ UP/mg. L'ensemble de ces caractéristiques montrant l'activité protéolytique importante de la pepsine et la possibilité de son utilisation dans la coagulation du lait de chamelle.

L'activité protéolytique des deux enzymes est schématisée en figure 1. La figure montre la quantité de produits d'hydrolyse libérés par la même quantité d'enzyme (présure ou pepsine de poulet) sur les caséines de lait de vache. Dans le cas de la présure, c'est principalement la chymosine qui agit sur le lait. Pour la pepsine de poulet plusieurs auteurs ont signalé une activité protéolytique supérieure à celle de la présure (Stanley *et al.*, 1980; Findlay *et al.*, 1984). Cependant, pour assurer un bon rendement fromager et pour éviter certains défauts de goût et de texture qui peuvent apparaître sur les fromages, ces protéases doivent présenter une protéolyse générale faible.

2. Allure de la coagulation

Concernant l'allure de la coagulation, proprement dite, sur le lait après ajout de l'extrait enzymatique, nous avons noté une différence dans le temps de coagulation du lait de vache et du lait de chamelle avec la présure et avec la pepsine de poulet à 35°C .

La pepsine de poulet dispose d'une force coagulante sur le lait de vache 6 fois plus importante que sur le lait camelin et ceci au pH natif de chaque lait et à une température de 35°C. Cependant, à 42°C, la coagulation du lait de chamelle sous l'action de la pepsine a été similaire à celle du lait de vache. Le coagulum prend forme à partir de 30 min environ (figure 2).

Il ressort de ces figures que la coagulation du lait de vache par la présure a été la plus courte (7 min) suivie par la pepsine de poulet (30 min). D'autre part, la coagulation du lait de chamelle a été similaire à celle du lait de vache avec la pepsine. Le gel camelin de pepsine semble être plus ferme et tranchable en comparaison avec celui de présure où le coagulum reste dispersé dans la phase aqueuse, sans prise de gel proprement dite.

CONCLUSION

La pepsine de poulet, au vu de sa forte activité protéolytique, est une enzyme qui peut être valorisée dans la coagulation du lait camelin et offre la possibilité de varier les produits laitiers à partir de ce lait et 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 et nécessite une meilleure valorisation dans l'industrie agro-alimentaire, notamment dans celle de la fromagerie. Tout au contraire de la présure de ruminants dont les disponibilités sont moindres et le coût est plus important.

REFERENCES

- Abu-Lehia I. H., 1989. Food Chemistry, (34), 261-71.
- AFNOR, 1993. Contrôle de la qualité des produits alimentaires. Paris La Défense : AFNOR, 4 éd, 581 p.
- Alais C., 1974. Principes des techniques laitières : science du lait. Ed : Publicité, Paris. 513 p.
- Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J. C., Lamberet G. et Lenoir J., 1997. La biochimie de l'affinage in « Le fromage, Eck, A., et Gillis J.C. (coord.) », pp : 87-161, 3ème édition, Lavoisier Tec. & Doc. 891 p.
- Cuvellier G.F., 1993. Production des enzymes In : Biotechnologie. Edition Scriban R. Coord 4ème édition Tec. et Doc. Lavoisier, 904 p.
- Debouza A., Guerguer L., Hamid Oudjana A et Hadj Seyd A.E.K., 2014. Revue El Wahat pour les Recherches et les Etudes, (7) 2, 10 – 17
- Elamin F.M. and Wilcox C.J., 1992. In J.Dairy Sci. (75), 3155-3157.
- FAO (1995). Lait et produit laitier dans la nutrition humaine, Rome, 269p.
- Farah Z. and Bachman M.R., 1987. In Milchwissenschaft, (42), 689-692.
- Farah Z., 2011. Camel Milk, In Encyclopedia of Dairy Sciences, (2nd ed.) Editor-in-Chief., pp. 512-517.
- Findlay C.I., Stanley D.W. et Emmons D.B., 1984. In Can. Inst. Food Sci. Technol. J. (17), 97-101.
- Gorban A.M.S. and Izzeldin O.M., 1997. In J. Dairy Technol. (64), 471-474.
- Kamoun M., 1994. Actes du Colloque « Dromadaires et chameaux, animaux laitiers » 24-26 octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., 1951. In J. Biol. Chem. (193), 265-275.
- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F., et Lenoir J., 1999. In Sciences des aliments (19), 663-675.
- Mehaia M. A., Hablas M. A., Abdel-Rahman K. M., El-Mougy S. A, 1995. In Food Chem. (52) 115-122.
- Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M.M. et Dadie A., 2009. In J. Food Technol., 7: 39, 1-13.
- Nouani A., Hamrani L., Bellal M. M., 2011. Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 29 et 30 mars.
- Ramet J.P. 1994. Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication de fromage au lait de dromadaire. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- Ramet, J.P., 1993. Etude F.A.O., Production et santé animales, pp. 113.
- Saley M., 1993. La Production Laitière du Dromadaire. CIRAD, Ed Maison-Alfort, Paris.
- Siboukeur O., Mati A. et Hesses B. 2005. In Cahiers Agricultures, 5, 473-478.
- Stanley D. W., Emmons D.B., Modler H.W. et Mirvine D., 1980. Can. Inst. Food Sci. Technol. 1. 13: 97-102.
- Veisseyre R., 1979. Technologie du lait, maison rustique, 3ème édition refondue de techniques laitière, 715 p.
- Wangoh J., Farah Z. and Puhan Z., 1993. Milchwissenschaft, 48, 322-325.
- Yagil R., 1985. The Desert camel; comparative physiological adaptation. Ed Karger, Basal. New York, pp. 163.

Tableau 1. Caractéristiques du lait de vache et du lait de chamelle

	Lait de vache*	Lait de chamelle*
pH	6,80 ± 0,01	6,54 ± 0,01
Acidité titrable(°D)	16,33 ± 0,57	17,33 ± 0,01
Extrait sec total (%)	12,40 ± 0,20	11,60 ± 0,20
Matière grasse (g /l)	35,00±0,00	28,00±0,00
Densité	1,03 ± 0,01	1,03 ± 0,00

* moyenne de trois essais.

Tableau 2. Principales caractéristiques des enzymes extraites

Caractéristiques	Pepsine	Présure
Taux de protéine (mg/ml)	3,20 ± 0,60	0,305 ± 0,20
Activité protéolytique (µg /ml)	1075,9 ± 0,03	83,48 ± 0,08
Activité coagulante (UP)	10,2 ± 1,10	11,67 ± 0,90
Force coagulante	1/19282	1/13924
Activité spécifique (UP/mg)	3	3

Figure 1. Quantité des produits d'hydrolyse protéiques libérés (tyrosine en µg/ml) sous l'action des extraits enzymatiques

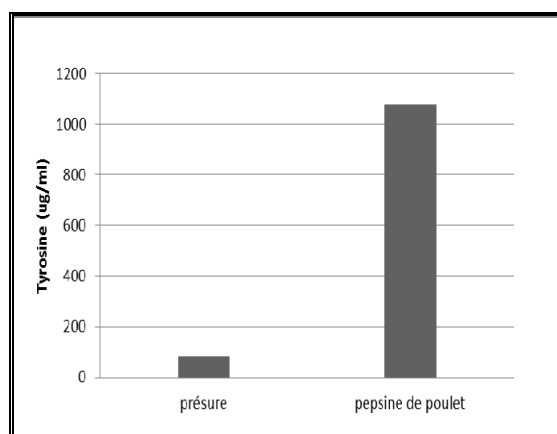


Figure 2. Temps de coagulation lait de vache et au lait de chamelle avec les différentes enzymes à 42°C

