

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

**UNIVERSITE MENTOURI**

**INSTITUT DE LA NUTRITION DE L'ALIMENTATION ET DES  
TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES (INATAA)**

n° d'ordre 087/Mag/2007

n° de série 002/INA/2007

## **Mémoire**

présenté pour l'obtention du diplôme de **MAGISTER**

en Sciences Alimentaires

Option Biochimie et Technologies Alimentaires

# *Coagulation du lait par la pepsine de poulet*

par

**Halima BOUGHELLOUT**

**Soutenu le 16/04/2007**

Devant le jury composé de

Président : Mouats C. Prof. Fac. Sc. Exactes Univ. Mentouri Constantine

Rapporteur : Zidoune M.N. Prof. INATAA Univ. Mentouri Constantine

Examineurs : Agli A. Prof. INATAA Univ. Mentouri Constantine

Namoune H. Prof. INATAA Univ. Mentouri Constantine

Sommaire	
Résumés	
Liste des figures et tableaux	
Liste des abréviations	
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	4
<b>1- Généralités sur le lait et le fromage</b> .....	4
<b>2-Caséines</b> .....	5
2-1 Fractions caséiniques.....	5
2-2 Micelle de caséine.....	6
<b>3- Enzymes utilisées en fromagerie</b> .....	11
3-1 Enzymes d'origine végétale.....	12
3-2 Enzymes d'origine microbienne.....	13
3-3 Enzymes d'origine animale.....	13
3-3-1 Présure.....	13
3-3-2 Pepsines .....	14
3-4 Comparaison des différentes enzymes coagulantes.....	16
<b>4- Coagulation du lait</b> .....	17
4-1 Aptitude du lait à la coagulation.....	17
4-2 Mécanisme de la coagulation.....	18
4-3 Rôle des sels de calcium .....	19
<b>5- Interactions impliquées dans la formation du gel</b> .....	20
<b>6- Mécanisme de la synérèse et de l'égouttage</b> .....	22
<b>7- Propriétés rhéologiques du caillé</b> .....	24
<b>I- Matériels et Méthodes</b>	
<b>I-1 Le lait</b> .. .....	26

<b>I-2 La présure.....</b>	<b>26</b>
<b>I-3 La pepsine de poulet.....</b>	<b>26</b>
I-3-1 Préparation des proventricules.....	28
I-3-2 Extraction.....	28
<b>I-4 Techniques d'analyses.....</b>	<b>29</b>
I-4-1 Caractérisation du lait.....	29
I-4-1-1 Détermination du pH et de l'acidité.....	29
I-4-1-2 Détermination de l'extrait sec.....	29
I-4-1-3 Détermination de l'azote total et de l'azote non protéique.....	30
I-4-1-4 Détermination de la teneur des protéines totales.....	31
I-4-2 Caractérisation de l'extrait enzymatique.....	32
I-4-2-1 Détermination de l'activité coagulante.....	32
I-4-2-2 Détermination du temps de prise .....	32
<b>I-5 Cinétique de la protéolyse .....</b>	<b>33</b>
<b>I-6 Etude des interactions impliquées dans le gel .....</b>	<b>34</b>
<b>I-7 Etude du comportement rhéologique du gel .....</b>	<b>35</b>
I-7-1 Evolution de la viscosité au cours de la coagulation.....	36
I-7-2 Courbe d'écoulement du gel.....	37
<b>I-8 Etude de la synérèse.....</b>	<b>38</b>
<b>I-9 Capacité de rétention d'eau.....</b>	<b>39</b>

## **II- Résultats et Discussions**

<b>II-1 Caractéristiques du lait.....</b>	<b>41</b>
<b>II-2 Caractéristiques de la pepsine de poulet.....</b>	<b>41</b>
<b>II-3 Cinétique de la protéolyse.....</b>	<b>43</b>
<b>II-4 Etude des interactions impliquées dans le gel.....</b>	<b>47</b>
II-4-1 Dissociation par le SDS.....	48
II-4-2 Dissociation par l'urée.....	50

II-4-3 Dissociation par l'EDTA.....	52
<b>II-5 Comparaison du comportement rhéologique.....</b>	<b>53</b>
II-5-1 Evolution de la viscosité au cours de la coagulation.....	53
II-5-2 Courbes d'écoulement des gels présure et pepsine.....	57
<b>II-6 Etude de la synérèse .....</b>	<b>59</b>
I-6-1 Cinétique de la synérèse.....	60
I-6-2 Effet de la concentration enzymatique sur la synérèse.....	62
<b>II-7 Capacité de rétention d'eau .....</b>	<b>65</b>
<b>Conclusion Générale.....</b>	<b>66</b>
<b>Liste Bibliographique.....</b>	

## Liste des abréviations

**AFNOR** : Association française de normalisation

**ANOVA** : Analyse de la variance

**$\alpha$ -CN** : Caséine  $\alpha$

**$\beta$ -CN** : Caséine  $\beta$

**CCP** : Phosphate de calcium colloïdal

**Da** : Dalton

**°D** : Degré Dornic

**DO** : Densité optique

**EDTA** : Acide Ethyl diamine tetra acétique

**E.S.T** : Extrait sec total

**FAO** : Food and alimentation organisation

**FIL-IDF** : Fédération international du lait

**$\kappa$ -CN** : Caséine  $\kappa$

**$\gamma$**  : Vitesse de cisaillement

**$\eta$**  : Viscosité apparente

**$\tau$**  : Contrainte de cisaillement

**NPN** : Azote non protéique (non proteique nitrogen)

**NT** : Azote total (total nitrogen)

**SDS** : Sodium dodecyl sulphate

**TCA** : Acide trichloro acétique

**TF** : Temps de floculation

**U.A.C.** : Unité d'activité coagulante

**WHC** : Capacité de rétention d'eau (water holding capacity)

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Composition moyenne de la micelle de caséine.....	05
<b>Tableau 2</b> : Principales caractéristiques des caséines.....	06
<b>Tableau 3</b> : Types d'interactions impliquées dans la formation et le maintien des gels Présure et acide.....	22
<b>Tableau I-1</b> : Concentration des différents agents dissociants.....	35
<b>Tableau I-2</b> : Conditions expérimentales des mesures réalisées à partir du rhéoviscosimètre.....	37
<b>Tableau II-1</b> : Caractéristiques physico-chimiques du lait.....	41
<b>Tableau II-2</b> : Caractéristiques de l'extrait enzymatique.....	42
<b>Tableau II-3</b> : Teneur en azote non protéique libéré.....	43
<b>Tableau II-4</b> : Taux de dissociation des protéines par le SDS.....	48
<b>Tableau II-5</b> : Taux de dissociation des protéines par l'urée.....	50
<b>Tableau II-6</b> : Taux de dissociation des protéines par l'EDTA.....	52
<b>Tableau II-7</b> : Paramètres rhéologiques d'écoulement des gels pepsine et présure...	59
<b>Tableau II-8</b> : Capacité de rétention d'eau pour le gel pepsine et présure.....	65

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Modèle micellaire noyau-enveloppe de Waugh.....	08
<b>Figure 2</b> : Modèle de Horne à double liaison.....	10
<b>Figure 3</b> : Micrographe d'une micelle de caséine individuelle.....	10
<b>Figure 4</b> : Anatomie du complexe stomacale (Proventricule, gésier).....	15
<b>Figure 5</b> : Courbes d'écoulement et de viscosité d'un liquide Newtonien et d'un fluide rhéofluidisant.....	25
<b>Figure I-1</b> : Diagramme de préparation des proventricules et d'extraction de la pepsine de poulet.....	27
<b>Figure I-2</b> : Courbe d'étalonnage de la caséine.....	31
<b>Figure II-1</b> : Cinétique de la libération du NPN pour la coagulation pepsine et présure.....	43
<b>Figure II-2</b> : Dissociation des protéines en fonction de la concentration du SDS.....	49
<b>Figure II-3</b> : Dissociation des protéines en fonction de la concentration de l'urée.....	50
<b>Figure II-4</b> : Evolution de la viscosité au cours de la coagulation pepsine.....	53
<b>Figure II-5</b> : Comparaison de l'évolution de la viscosité au cours de la coagulation pepsine et présure.....	54
<b>Figure II-6</b> : Courbes d'écoulements des gels pepsine et présure.....	58
<b>Figure II-7</b> : Courbes de viscosité des gels pepsine et présure.....	58
<b>Figure II-8</b> : Cinétique de la synérèse pour la coagulation pepsine (TF 15 min).....	60
<b>Figure II-9</b> : Comparaison de la cinétique de la synérèse pour la coagulation pepsine et présure.....	61
<b>Figure II-10</b> Cinétique de la coagulation pepsine (TF : 8, 15 et 30min) .....	62
<b>Figure II-11</b> : Cinétique de la coagulation pepsine et présure (TF 30min).....	63

## Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier la possibilité de substituer la présure par la pepsine de poulet comme agent coagulant du lait.

Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé à l'extraction de la pepsine de poulet à partir des proventricules, et la caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu.

Afin de comparer l'effet de la pepsine à celui de la présure, nous avons approché la cinétique de la protéolyse, le type d'interactions impliquées dans la formation du gel, le comportement rhéologique, la cinétique de la synérèse et la capacité de rétention d'eau du gel.

Les résultats obtenus ont montré que la floculation par la pepsine de poulet se produit à un taux de libération d'azote non protéique inférieure à celui de la présure.

L'étude des interactions a permis de montrer l'importance des liaisons hydrophobes et les liaisons hydrogènes dans la formation du gel. Nous n'avons noté aucune différence entre les deux gels pour les interactions hydrophobes, alors que pour les liaisons hydrogène le gel pepsine présente un taux supérieur à celui du gel présure. L'approche des liaisons calciques n'a pas été concluante et nécessite une expérimentation complémentaire.

L'étude rhéologique, menée avec le système destructif des cylindres coaxiaux, a permis de montrer l'évolution du caractère visqueux lors de la coagulation. Nous avons remarqué, une légère diminution de la viscosité avant la floculation visible à l'œil nu ; suivie d'une phase caractérisée par l'augmentation rapide de la viscosité. Après formation du gel, la viscosité atteint un maximum puis tend à diminuer. Le gel présure présente le même comportement rhéologique que le gel pepsine.

Les gels pepsine et présure semblent être des gels de type rhéofluidifiant à caractère pseudoplastique.

La cinétique de la synérèse a montré que pour un temps de floculation de 15 min ; il n'existe aucune différence significative entre les deux gels. L'augmentation de la concentration enzymatique et par conséquent le temps de floculation, entraîne une augmentation du taux d'exsudation du lactosérum.

En conclusion, nous n'avons noté aucune différence significative pouvant empêcher la substitution de la présure par la pepsine de poulet lors de la phase de

coagulation, il serait très intéressant, d'étudier l'effet de cette substitution sur différents fromages affinés.

---

Mots-clés : coagulation, pepsine de poulet, présure, protéolyse, interactions, rhéologie, synérèse

## Introduction

Le fromage, dont il existe des centaines de variétés, est le plus ancien moyen de conservation de la qualité nutritionnelle du lait.

L'étape clé de la réussite d'un fromage est la coagulation, qui se traduit par la formation d'un gel, résultat des modifications physico-chimiques intervenant au niveau des micelles de caséines. Les propriétés du gel formé diffèrent selon la nature de l'agent coagulant et le type de fromage. En fromagerie, il existe essentiellement deux types de coagulation, l'une lactique et acide, réalisée à l'aide de ferments lactiques par dégradation du lactose en acide lactique, et l'autre enzymatique par dégradation de la caséine  $\kappa$  par la présure ou autre succédané.

La présure de veau est l'agent coagulant le plus utilisé pour la coagulation du lait. C'est l'extrait de la caillette de veau non sevré, qui comprend la chymosine, enzyme majoritaire, et la pepsine, dans un rapport massique supérieur à 1.38 (Desmazeaud, 1997).

Bien que la présure soit encore l'enzyme coagulante la plus utilisée en fromagerie, sa production connaît une pénurie mondiale croissante. Cette pénurie est due essentiellement à une augmentation croissante de la production et 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).

Ces problèmes sont aggravés, dans les pays musulmans, par des raisons religieuses, dues aux rituelles de l'abattage, et l'interdiction de certains agents coagulants tels que la pepsine porcine.

Ces raisons ont fait que de nombreuses recherches ont été entreprises afin de trouver des succédanés efficaces et compétitifs utilisables industriellement.

Parmi ces succédanés, les plus anciens sont des protéases d'origine végétale employées dans des préparations traditionnelles telles que celles provenant du gaillet, de l'artichaut, du chardon, ou la ficine du figuier et la papaine. Pour pallier le déficit en présure, d'autres enzymes ont été envisagées telles que les protéases d'origine fongique synthétisées par *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* et *Endothia parasitica*. Existente aussi des succédanés d'origine animale tels que les pepsines porcines ou bovines, les protéases gastriques d'animaux marins (morue de l'atlantique et le phoque du canada) et les pepsines extraites des proventricules de volailles telles que le poulet et le canard.

L'Algérie connaît un développement notable du secteur laitier où la consommation du lait et produits laitiers a augmenté de 2.7 million de tonne en 1990 à 3.4 million de tonne en 2004, et la production fromagère a atteint 1540 tonne en l'an 2000 avec une consommation moyenne de 0.7 kg/personne/an (FAO).

Vu la pénurie mondiale de la présure et les fluctuations de son prix, son importation présente un handicap majeur pour le développement de la production locale. En plus de ces considérations économiques, le facteur religieux joue également un rôle important dans le choix du type de coagulant utilisé, de son origine et des conditions de sa préparation. Pour cela, le choix d'un succédané de présure de production locale, est souhaitable. Il permettrait un approvisionnement permanent limitant la dépendance avec l'importation et les fluctuations de prix et répond mieux à nos exigences religieuses.

La pepsine de poulet semble être un succédané de présure adéquat, vu le développement notable du secteur aviaire en Algérie (253000 t en 2004 contre 194000 t en 1990), et la disponibilité de plus en plus assurée d'une matière première non encore valorisée.

Il faut noter que la pepsine de poulet est utilisée comme substitut de la présure dans différents pays et notamment en Israël où en 1973/1974 plus que 50% de la

production fromagère étaient préparées à l'aide de pepsine de poulet (Andren, 2002 ; Scott, 1979 ; cité par Cuvellier, 1993)

Notre travail a pour objectif de substituer la présure par la pepsine de poulet pour de la coagulation. Pour répondre à cet objectif nous suivrons les étapes suivantes :

- Extraction de la pepsine de poulet à partir des proventricules, et la caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu
- Détermination de la cinétique de protéolyse lors de la phase de coagulation
- Détermination du type d'interactions impliquées dans la formation et le maintien du gel
- Etude du comportement rhéologique au cours de la coagulation et la détermination de la nature du gel
- Détermination de la cinétique de la synérèse et la capacité de rétention d'eau du gel pepsine.

# *Synthèse bibliographique*

## **1 Généralités sur le lait et le fromage**

Par définition «le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée ; il doit être recueilli selon les règles de l'hygiène et ne pas contenir de colostrum » (Lucey, 1974).

D'un point de vue physico-chimique, le lait est une suspension colloïdale dans laquelle les particules en suspension sont responsables de sa consistance, de son opalescence et de sa couleur blanche. Ces particules sont représentées par les globules de matière grasse (en émulsion dans la phase aqueuse) et les micelles de caséine constituant protéique majeure du lait. La phase aqueuse est essentiellement composée d'eau, de sels minéraux, de lactose et de matières azotées.

Le fromage est défini par la FAO comme étant un produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir d'une matière d'origine exclusivement laitière suivante : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisée seule ou en mélange et coagulée en tous ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse. La teneur minimale en matière sèche du produit ainsi défini doit être de 23g/100g de fromage.

Le codex alimentaire donne la définition suivante "Le fromage est le produit frais ou affiné, solide ou semi solide, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait, obtenu par coagulation du lait grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés, et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation (FAO, 1999).

## 2 Caséines

### 2-1 Fractions caséiniques

Les caséines forment près de 80% des protéines du lait, et se regroupent sous une forme sphérique appelée micelle (Mathieu 1998, Ribadeau-Dumas, 1991, Alais, 1974).

La caséine entière est composée de quatre constituants majeurs les caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  et certains composés mineurs tels que la caséine  $\gamma$  (Tableau 1).

**Tableau 1 : Composition moyenne de la micelle de caséine g/100g (Schmidt, 1982)**

Caséines	Composants salins
$\alpha_{s1}$ .....35.6	Calcium.....2.87
$\alpha_{s2}$ .....9.9	Magnésium.....0.11
$\beta$ .....33.6	Phosphate inorganique.....2.89
$\kappa$ .....11.9	Citrate.....0.40
$\gamma$ .....2.3	Sodium.....0.11
	Potassium.....0.26
Total caséines.....93.3	Total composants salins.....6.6

Toutes les caséines sont des phosphoprotéines de 150 à 200 acides aminés, possédant des groupements phosphates unis à la chaîne latérale de la sérine (groupe phosphoséryl) (Cayot et Lorient, 1998).

Les sites phosphoséryls ne se répartissent pas uniformément tout au long de l'enchaînement, mais sont groupés dans certaines régions qui, de ce fait, sont les moins hydrophobes et les plus chargées négativement. La présence de groupements phosphoséryls confère aux caséines une très grande affinité vis-à-vis du calcium et du magnésium (Brulé et Lenoir, 1997).

Les groupements acides des résidus glutamyl, aspartyl et phosphoséryl plus nombreux que les fonctions  $-\text{NH}_2$  de la lysine et des autres acides aminés basiques, confèrent à la caséine entière un point isoélectrique de 4.65, une charge nette négative importante au pH du lait frais normal avec des propriétés acides (Mathieu, 1998).

En solution, les caséines adoptent une conformation ouverte par rapport aux structures plus compactes des protéines globulaires. Par conséquent, les nombreux

groupements hydrophobes que possèdent les caséines seront plus exposés que chez les protéines globulaires, ce qui explique leur forte tendance à l'association.

Les principales caractéristiques des caséines sont regroupées au tableau 2.

**Tableau 2: Principales caractéristiques des caséine d'après Fox,(1989)**

	$\alpha_{S1}$ ( $\alpha_{S0, 1}$ )	$\alpha_{S2}$ ( $\alpha_{S2, 3,4,6}$ )	$\beta$	$\kappa$ ( $\kappa_1$ à $\kappa_7$ )
Résidu d'acide aminé/mole	199	207	209	169
Poids moléculaire (Dalton)	23600	25200	24000	19000
Résidus cystéine	0	2	0	2
Groupements phosphoséryls	8-9	10-13	4-5	1
Groupements glycosylés	0	0	0	0 à 5
Groupements hydrophobes	88	69	111	88
Charge à pH 6.6	-20.9	-14.8	-12.3	-3.0
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-

La caséine  $\kappa$  présente des caractères spécifiques indiqués ci-dessous :

- Soluble à 20°C et pH 7 lors de l'addition de  $\text{CaCl}_2$  0.4 M alors que les autres caséines précipitent (De Kruif et May 1991) ;
- Contient environ 5% de glucides, donc hydrophile (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989 ; Alais,1974) ;
- Contient des résidus cystéine, 2 par molécule, ce qui laisse prévoir la formation de ponts disulfure lors de la formation du gel (Cayot et Lorient, 1998).
- Permet de stabiliser les autres caséines en empêchant leur précipitation par le calcium, grâce à la formation dans le lait d'un complexe colloïdal micellaire stable (De Kruif et May, 1991) ;
- Détient le rôle clé dans la coagulation du lait par la présure par la séparation de 2 parties, la partie N-terminale (1-105) légèrement cationique et très hydrophobe, et la partie correspondant au glycomacropéptide (106-169) très hydrophile, donnant un caractère très amphiphile à la protéine (Cayot et Lorient 1998, Creamer et *al.*, 1998).

Lors de l'hydrolyse par la présure, la para-caséine  $\kappa$  (1-105) reste accrochée à la micelle alors que le glycomacropéptide (106-169) hydrophile est perdu dans le lactosérum. La micelle en perdant son pôle hydrophile stabilisant, précipite.

## 2-2 Micelle de caséine

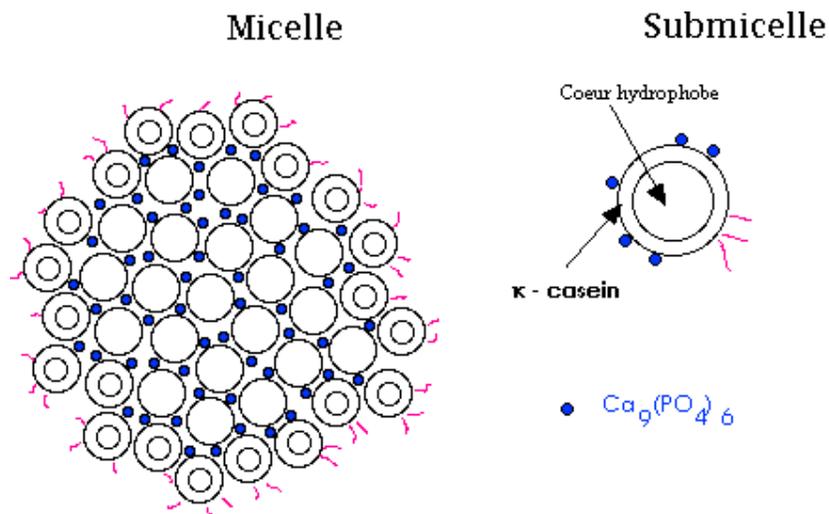
La micelle de caséine est une particule de taille variant de 100 à 500 nm avec un diamètre moyen de 180 nm (Amiot *et al.*, 2002; Fox 2000; Alais, 1974), elle est formée par l'association des caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  et de quelques fragments peptidiques les caséines  $\gamma$  (issus de la protéolyse de la caséine  $\beta$ ) et de composants salins dont le calcium et le phosphate. Son poids moléculaire moyen est de l'ordre de  $10^8$  Da et renferme entre 20 000 et 150 000 molécules de caséine.

### Structure des micelles de caséine

Les micelles de caséine ont fait l'objet de nombreux travaux, et plusieurs modèles sont avancés pour tenter d'expliquer la façon dont les différents constituants protéiques et minéraux s'associent aux seins des micelles de caséines.

Trois modèles théoriques ont été proposés pour expliquer la structure des micelles de caséine (Cayot et Lorient, 1998) :

- Le modèle noyau-enveloppe : il est représenté par 2 modèles, le modèle de Waugh et collaborateurs (1971) (figure 1), basé sur la présence de complexe  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  caséine au cœur de la micelle, en présence de calcium, leur précipitation est évitée par la formation de complexes caséine $\alpha$ -caséine $\kappa$  situés en monocouches en surface de la micelle (enveloppe). Au contraire Parry et Carroll (1969) cités par Cayot et Lorient (1998), affirment que la caséine  $\kappa$  sert de point de nucléation sur lequel les caséinates de calcium insolubles peuvent être fixés et stabilisés.
- Le modèle de structure interne uniforme : ce modèle proposé par Ribadeau-Dumas (1970) cité par Cayot et Lorient (1998) est basé sur les propriétés des monomères de caséine dans la micelle. Un trimère de caséine  $\kappa$  se lie à 3 chaînes de caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  qui peuvent elles-mêmes s'associer à d'autres caséines  $\kappa$ . Ce modèle est très poreux et ouvert.
- Le modèle sub-micellaire : proposé par Shimmin et Hill en 1964 puis repris par Morr en 1967 (cités par Cayot et Lorient, 1998), il suggère que la micelle est composée de submicelles structurées comme le modèle de Waugh mais reliées entre elles par du phosphate de calcium.



**Figure 1 : Modèle noyau enveloppe (modèle de Waugh)**

Cet aperçu des principaux modèles micellaires illustre la diversité des hypothèses qui ont été formulées pour essayer de décrire la structure des micelles de caséine. Aucun de ces modèles n'a été admis de façon irrévocable, néanmoins, certains modèles peuvent être éliminés. En particulier, il semble que la localisation superficielle généralement attribuée à la caséine  $\kappa$  soit en désaccord avec les modèles Parry et Carroll (1969) et Ribadeau-Dumas (1970). Par ailleurs, il a également été montré que d'importantes quantités de caséines  $\alpha$ s étaient localisées à la surface des micelles ce qui va à l'encontre du modèle noyau-enveloppe. Par suite il ne reste que le modèle submicellaire qui pourrait éventuellement répondre aux caractéristiques connues de la micelle et son comportement (Rollema, 1992).

Afin d'établir un modèle descriptif de la structure des micelles de caséine, il est indispensable de prendre en compte un certain nombre d'observations.

a- L'organisation interne des micelles : en microscopie électronique, les micelles apparaissent plus ou moins sphériques, hétérogènes en taille et d'aspect granuleux (Walstra, 1999, 1990). L'existence d'une sous-structure micellaire est suggérée par l'existence de régions qui semblent plus denses que d'autres.

b- La localisation de la caséine  $\kappa$  : la caséine  $\kappa$  semble préférentiellement localisée à la périphérie des micelles; ce qui est en accord avec les images obtenus par microscopie électronique et par RMN (Dalglish *et al.*, 2004, Horne, 2002<sup>a</sup>).

c- Le degré d'hydratation des micelles : les micelles sont très hydratées et le pH influence fortement leur teneur en eau; elles contiennent 3.7g d'eau /g de protéine (Walstra, 1990).

d- La stabilité des micelles : les micelles de caséines restent stables face à des variations plus ou moins modérées du pH, de la concentration en sels, de la température et de la concentration en solvants non-aqueux. Le calcium et le phosphate semblent jouer un rôle très important dans le maintien de cette stabilité (Horne, 2002<sup>a</sup>, 1998 ; Walstra, 1990).

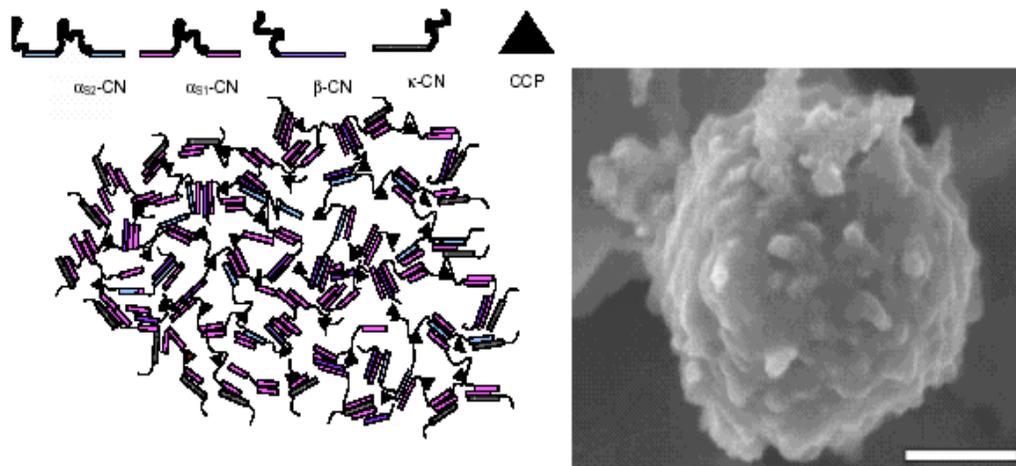
e- La composition protéique des micelles : les micelles sont constituées de caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  dans les proportions 3/1/3/1.

La nature et le mécanisme impliqués dans l'interaction des sous-unités restent également un point de désaccord entre différents auteurs. Certaines observations concernant notamment le comportement de dissociation des caséines en fonction du pH et de la température, la possibilité de déplacer le calcium de la micelle sans perturbation apparente de cette dernière si le lait est acidifié à des températures inférieures à 20°C ; suggère que le calcium ne lie (cimente) pas les micelles entre elles et permet de rejeter le modèle qui considère que le phosphate de calcium est seul à l'origine des interactions inter-submicellaire. Il est aussi clair que les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la micelle, ceci est prouvé par la destruction de la structure de la micelle après addition d'agents dissociants tels que l'urée ou le sodium dodecyl sulfate (SDS) sans dissolution du phosphate de calcium colloïdal, et l'impossibilité de former un gel après action enzymatique à des températures inférieures à 15°C (Lucey, 2002<sup>a</sup> ; Dalgleish, 1998).

A partir de ces observations, un nouveau modèle a été proposé par de récents travaux de Horne (2002<sup>a</sup>, 1998) (figure 2). L'auteur propose un modèle basé sur la polymérisation du réseau caséinique, c'est le modèle à double liaison. Il s'agit d'un assemblage de caséines individuelles par des liaisons hydrophobes et des ponts de phosphate de calcium colloïdal. La formation et l'intégrité des micelles sont contrôlées par un équilibre entre les forces attractives et répulsives des micelles de caséines (forces hydrophobes, forces électrostatiques). D'un autre côté, du fait que la caséine  $\kappa$

ne peut avoir que des liaisons hydrophobes avec les autres caséines, elle semble agir comme une chaîne terminale (superficielle) stabilisante.

D'autres travaux de Dalgleish *et al.*, (2004) réalisés par microscopie électronique à balayage à haute résolution, ont porté sur la structure submicellaire des caséines, et montré que la chevelure de la  $\kappa$  caséine ne peut couvrir toute la surface, mais qu'elle peut également comporter des nanoréseaux de calcium (figure 3).



**Figure 2 : Modèle de Horne à Double liaison (Horne, 1998, 2002)**

CN : caséine

CCP : Phosphate de calcium colloïdal

**Figure 3 : micrographe d'une micelle de caséine individuelle (Dalgleish *et al.*, 2004)**

En conclusion, et vue la diversité des modèles proposés et les techniques utilisées pour appuyer les différentes hypothèses, il est impossible d'admettre de façon irrévocable ou de favoriser un modèle précis. Cependant, la plupart des travaux récents semblent être d'accord sur certaines données structurales et fonctionnelles. Il s'agit en particulier, de la localisation superficielle de la  $\kappa$  caséine, de la composition de sous unité protéique de composition variable reliée par des interactions hydrophobes, électrostatiques et des liaisons calciques.

### **3- Enzymes utilisées en fromagerie**

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

Traditionnellement, l'enzyme protéolytique utilisée est la présure extraite des caillottes de jeunes veaux non sevrés. L'utilisation de succédanés d'origine animale, végétale et microbienne s'est développée au courant des trente dernières années et cela pour des raisons économiques, religieuses ou culturelles (Dalglish, 1997). En effet, selon Nelson, (1975) (cité par Michael Eskin 1990), en 1973, la présure ne pouvait répondre qu'à 37% de la demande de l'industrie fromagère des Etats-Unis d'Amérique. D'autre part, et selon Scott, (1979) cité par Cuvellier, (1993), 50% des fromages produits en Israël dans les années 1973/1974 étaient préparés à partir de la pepsine du poulet.

Selon la FAO, et afin d'introduire toute nouvelle enzyme, celle-ci doit respecter les modalités habituelles du déroulement des différentes phases de la fabrication en particulier :

- L'activité coagulante doit être bonne dans les conditions physico-chimiques des laits habituellement transformés en fromagerie ;
- Les propriétés rhéologiques des coagulums doivent évoluer après la floculation de façon à permettre le travail mécanique du gel dans les délais habituels ;
- La synérèse du coagulum au cours de la phase d'égouttage doit permettre d'obtenir un fromage d'extrait sec et de composition chimique caractéristiques, dans un délai au plus égal à celui observé avec la présure ;
- Les modalités de l'affinage doivent permettre d'obtenir un produit fini présentant les normes organoleptiques habituelles après une durée de maturation voisine de celle des fromages fabriqués avec la présure ;
- Les rendements fromagers, exprimés en poids sec de fromage, doivent être au moins égaux à ceux relevés lors de l'emploi de la présure.

Différents types d'enzymes ont été utilisés depuis longtemps pour faire coaguler le lait, parmi ces enzymes on peut distinguer selon la source, les enzymes d'origine végétale, celles d'origine animale et celles d'origine microbienne.

### 3-1- Enzymes d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale sont par ordre d'intérêt en technologie laitière la papaïne extraite d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*), la broméline extraite de l'ananas (*Ananas comosus*), la ficine issue de la figue (*Ficus glabrata*). (Cuvellier, 1993)

- *La papaïne* : La papaïne extraite du latex de *Carioca papaya*, est caractérisée par une activité coagulante assez forte, mais également un fort pouvoir protéolytique (Dastur, 1948, cité par Ernstrom et Wongt, 1983 ; Cuvelier, 1993).

- *La ficine* : est une sulfhydryl enzyme, extraite du latex de *Ficus genus* ou *Ficus carica*. Comme la papaïne, elle a un pouvoir coagulant important mais son utilisation est limitée par son fort pouvoir protéolytique.

- *La broméline* : est une enzyme extraite de l'ananas (*Ananas comosus*), elle a été considérée comme substituant possible de la chymosine. Des travaux de Murachi (1970) ; cité par Ernstrom, (1983), ont prouvé qu'elle a un pouvoir protéolytique défavorable au rendement et à la qualité organoleptique dans l'industrie fromagère.

### I-3-2- Enzymes d'origine microbienne

L'industrie de fermentation s'est intéressée à la production de protéases susceptibles de remplacer la présure, à partir de micro-organismes. Dans ce but, de multiples espèces de bactéries et de champignons inférieurs ont été étudiées afin de pallier la pénurie mondiale de présure.

En effet, il a été estimé qu'en 1974 environ 60% de la technologie fromagère aux Etats-Unis d'Amérique utilisaient des protéases d'origine microbienne (Sternberg, 1976 ; cité par Dalgleish, 1997).

a- *Origine bactérienne* : La recherche d'enzymes pour substituer la présure a conduit à de multiples travaux sur plusieurs bactéries: *Streptococcus liquifaciens*, *Micrococcus caseolyticus*, *Bacillus cereus*, et *Bacillus coagulans*. Les protéases extraites de ces bactéries ont plusieurs inconvénients, tels que la non spécificité de l'hydrolyse, la protéolyse excessive qui a pour conséquence un faible rendement fromager et une

modification des caractéristiques organoleptiques des fromages (goût acide, amertume) (Ernstrom, 1983).

De récents travaux de génie génétique ont permis de préparer une présure formée de chymosine pure, par clonage de gène sur *Escherichia coli* (Alais et Linden, 1997).

b- *Origine fongique* : Les travaux réalisés sur différents types de levures et moisissures, ont permis de sélectionner trois types de moisissures dont les propriétés coagulantes et protéolytiques de leurs enzymes se rapprochent le plus de celles de la présure. Ces moisissures sont : *Endothia parasitica* , *Mucor miehei* et *Mucor pusillus* (Goursaud, 1999).

### **3-3- Enzymes d'origine animale**

Les protéases gastriques des mammifères adultes sont désignées de pepsine A et pepsine C (gastriscine), alors que la chymosine est associée au développement néonatale du très jeune mammifère.

Les protéases extraites du jus gastrique sont secrétées sous formes inactives (zymogène), et sont activés par les conditions acides du jus gastrique.

#### **3-3-1 Présure**

La présure est l'extrait provenant de caillettes de jeunes bovidés nourris au lait constituée de deux fractions actives, l'une, majeure, la chymosine, l'autre, mineure, la pepsine dans un rapport de masse de chymosine active/ masse de pepsine bovine active est  $\geq 1.38$  (Desmazeaud, 1997).

Une présure préparée à partir de caillettes d'agneau a été utilisée avec succès pour la préparation d'un fromage local grec, son utilisation n'a posé aucun problème ni à la technologie ni à la maturation (Anifantakis, 1976).

La chymosine est une holoprotéine dont le poids moléculaire est voisin de 31400. Elle hydrolyse la liaison phe<sub>105</sub>-met<sub>106</sub> de la caséine  $\kappa$  et possède une activité protéolytique générale faible pendant l'affinage du fromage.

L'activité protéolytique de la chymosine est fortement influencée par les facteurs de milieu et principalement par le pH et la température. L'activité optimale de la présure se situe dans un intervalle de pH de 5 à 5.5 et à la température de 42°C.

### **3-3-2 Pepsines**

La pepsine est extraite de l'estomac des mammifères adultes ou des proventricules de volailles. Elle hydrolyse la plupart des protéines naturelles telles que la caséine, la globuline, et certaines enzymes telles que la trypsine, la papaïne et les amylases. Elle attaque préférentiellement les peptides contenant de la L-Phénylalanine ou de la L-Tyrosine et plus généralement les acides aminés à noyau aromatique (Yamamoto, 1975).

#### ***La pepsine porcine***

L'extraction et l'utilisation de la pepsine porcine ont débuté durant la première guerre mondiale pour pallier une pénurie de la présure, mais n'a été réellement industrialisé qu'à partir des années 60. Elle est extraite de l'estomac de porcs sous forme inactive, puis activée par acidification à pH 2, son poids moléculaire est de 34500 Da (Ernstrom, 1983).

L'emploi de la pepsine porcine présente pour la coagulation du lait des difficultés, à cause d'une activité protéolytique supérieure à celle de la présure, avec présence d'arrière goût et d'amertume pour certains fromages (Brulé et Lenoir, 1997).

#### ***La pepsine bovine***

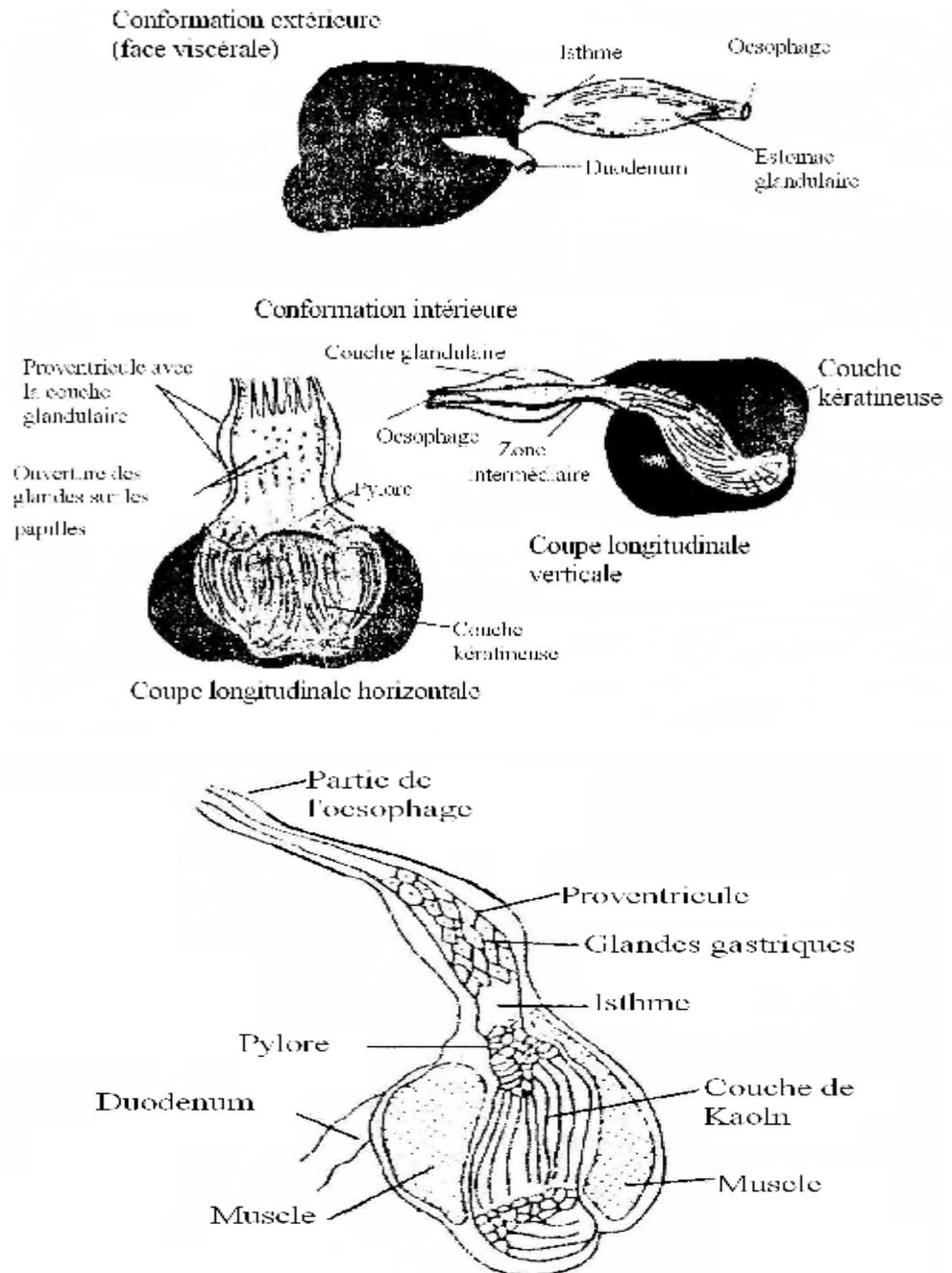
C'est un des constituants mineurs normaux de la présure, (Alais, 1974 ; Fox, 1969 ; cité par Ernstrom, 1983). Elle est extraite des caillottes de bovidés adultes, et son poids moléculaire est de 33400 Da.

L'activité coagulante de la pepsine bovine n'est pas aussi dépendante du pH que celle de la pepsine porcine, et peut coaguler le lait à des pH supérieurs à 6.9, son activité protéolytique est proche de celle de la présure. Elle est utilisée en fromagerie en mélange 50:50 avec la présure (Ramet, 1997<sup>a</sup>).

#### ***La Pepsine de poulet***

La pepsine du poulet est extraite du proventricule ou ventricule succenturié qui est un renflement fusiforme de 3 cm de long en moyenne, situé au dessus du gésier, il est revêtu d'un épithélium de cellules cylindriques (figure 4). Des glandes de type tubulaire ont des orifices formant des rangées de mamelons visibles à l'œil nu ; les alvéoles de ces glandes sont bordées de cellules spécialisées oxyntico-peptiques

secrétant à la fois de l'acide chlorhydrique et une proenzyme protéolytique : le pepsinogène. Le système de canaux collecteurs s'ouvrant sur des petites papilles, apporte le suc gastrique dans la lumière des proventricules (Alamareot, 1982). Le volume du suc gastrique qui varie de 5 à 20ml/ heure en période de jeûne, atteint 40ml/heure après stimulation. Le pH du suc varie de 1 à 2 (Larbier et Leclerc, 1992).



**Figure 4 :** Anatomie du complexe stomacal (proventricule et gésier)

Le pepsinogène du poulet est composé de 387 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 43000 Da. La pepsine elle, est composée de 308 résidus d'acides aminés et un poids moléculaire de 35000 Da (Bohak, 1969).

Le pH optimum de la pepsine du poulet est de 2.8. L'enzyme reste stable à pH 8, et devient inactive à pH 8,5. Cette stabilité est très liée à la température : Bohak (1969), rapporte qu'une solution de pepsine à pH 8,2 maintient 93% de son activité après 20 min à la température ordinaire (24°C) et seulement 10 % à 37° C. Cet auteur ajoute qu'à pH 7,8 l'enzyme perd seulement 10% de son activité après 24 heures à température ordinaire et 10%/heure à 37°C. De même, une solution de pepsine de poulet dans 0.02N ou 0.001N d'HCl est stable dans ces conditions, et perd moins de 5% après 24 heures à 37°C ou une semaine à 4°C (Donta et Van Vukis, 1970).

Plusieurs études ont été réalisées afin d'introduire la pepsine de poulet comme succédané de la présure. Des travaux de Green, (1972) cité par Michael Eskin, (1990), ont conduit à la fabrication de fromage de type cheddar à l'aide de la pepsine du poulet, mais le produit obtenu était de qualité inférieure, il présentait un corps mou, peu d'arômes et un arrière goût assez prononcé due à une protéolyse excessive. D'autres travaux de Green *et al.*, (1984), ont montré que le cheddar préparé par un mélange de pepsine de poulet et de pepsine porcine était similaire à celui préparé par de la présure. Gordin et Rosenthal, (1978) ont utilisé la pepsine de poulet pour la fabrication de l'emmental et un autre fromage traditionnel de type Kashkaval, qui sont des fromages à pâte molle ; ils ont obtenu de meilleurs résultats et des fromages de qualité comparable à celles obtenues par la présure. Ils ont attribué cette différence aux conditions de production et spécialement à la température de 85°C nécessaire pour l'emmental contre 52°C lors de la cheddarisation ; ce qui implique une inactivation de la pepsine et par conséquent une diminution de la protéolyse.

### **3-4- Comparaison entre l'action des différentes protéases**

Les différentes protéases acides ont un poids moléculaire voisins, compris entre 30000 et 40000 Da. Leur pH optimum varie de 1.5 à 5. Dans le lait leur activité augmente avec la diminution du pH.

L'activité coagulante diminue nettement quand le pH dépasse respectivement 6,8 – 6,6 et 5,5 pour la chymosine, la pepsine bovine et la pepsine porcine (Andren et DeKoning, 1982).

Ces enzymes sont irréversiblement dénaturées à des pH alcalins, uniquement la pepsine du poulet reste stable à pH 8 (Bohak, 1970) alors que la chymosine est instable à pH 6.5 (Fruton, 1971, cité par Dalglish, 1997) et la pepsine porcine à pH 6 (Foltmann, 1979, cité par Dalglish 1982).

Herriot, Bartz et Northop en 1938 (cité par Bohak, 1969) ont observé que la pepsine de poulet diffère de la pepsine bovine et porcine par sa stabilité dans les solutions à pH neutre et modérément alcalin. La pepsine de poulet est stable aux pH de 8 à 8,5 alors que la plupart des autres pepsines sont inactives à pH 6,5 à 7.

La chymosine attaque la liaison phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la  $\kappa$ -caséine, alors que l'hydrolyse de la  $\beta$ -caséine et la  $\alpha$ -caséine est très faible dans les conditions de la coagulation (pH, température et force ionique). La protéolyse générale est donc très réduite au cours de la coagulation, mais s'accroît lors de la maturation (Dalglish, 1997). La pepsine porcine possède un pouvoir protéolytique plus prononcé, (DeKoning, 1978 cité par Dalglish, 1997), alors que la pepsine bovine semble avoir un pouvoir protéolytique assez proche de la chymosine (Alais, 1974). Selon Richardson (1975) le taux de protéine totale du gel est stable entre 15 et 60 min pour la présure et la pepsine.

#### **4- Coagulation du lait**

##### **4-1- Aptitude du lait à la coagulation**

L'aptitude à la coagulation du lait est sa capacité à donner après action de la présure, un coagulum à caractère rhéologique précis, sans perte lors de l'égouttage. En effet, certains laits coagulent lentement, forment des gels mous qui tendent à se fragmenter, donnant des caillés humides dont l'affinage est difficile à maîtriser (Lenoir et Schneid, 1997). Les moyens de contrôle sont généralement le temps de coagulation, la vitesse de raffermissement du gel, sa fermeté maximale et enfin la vitesse et l'importance de la synérèse.

L'aptitude du lait à la coagulation dépend de certaines caractéristiques, telles que la composition chimique du lait et notamment sa richesse en caséines et leurs

dimensions et la composition minérale du lait (rapports (Ca/N et P/N faibles) (Alais, 1974).

#### **4-2- Mécanisme de la coagulation**

La coagulation du lait par des protéases acides se fait en deux étapes distinctes, l'une enzymatique et l'autre non enzymatique.

##### **Étape enzymatique (Hydrolyse de la $\kappa$ Caséine)**

La phase primaire de la coagulation est une étape enzymatique, durant laquelle la protéase attaque la liaison phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la  $\kappa$  caséine. Cette coupure conduit à la destruction des propriétés stabilisantes de la  $\kappa$  caséine par la libération du glycomacropéptide (Dagleish 1997, 1982 ; Alais , 1974).

Les travaux de Berridge (1954) et Alais (1953) cités par MacKinlay et Wake, (1971) ont démontré que la phase primaire est suivie par l'augmentation d'azote non protéique (NPN) soluble dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12%. Le taux de NPN augmente graduellement avant la floculation visible à l'œil nu, et correspond au glycomacropéptide perdu dans le lactosérum. La paracaséine  $\kappa$  reste accrocher à la micelle qui perdant son pôle hydrophile stabilisant, précipite.

Quand le lait est coagulé dans des conditions normales de pH et de taux de protéines, la viscosité n'augmente que lorsque 80 à 85% de la phase enzymatique soient achevés, et elle représente approximativement 60% du temps de floculation visible (Mickael Eskin, 1990 ; Lenoir et Veisseyere, 1987 ; Cheftel *et al.*, 1985). Cette étape est complètement indépendante des ions calciques.

La coagulation du lait par la présure se produit rapidement à pH 6.3-6.8 et dans des conditions où l'activité protéolytique est très basse (MacKinlay et Wake, 1971).

La phase primaire de la coagulation dépend essentiellement du pH, de la température, de la force ionique, et des différents traitements subits par le lait.

##### **Étape non enzymatique (phase d'agrégation)**

La phase secondaire est la phase de floculation, non enzymatique et dépend strictement de Ca<sup>2+</sup> et du phosphate de calcium colloïdale (Fox ,1982). Durant la phase secondaire, les micelles de caséine se regroupent en présence de Ca<sup>2+</sup>, cette agrégation

se produit avant l'apparition visible de la floculation (Lucey, 2002<sup>a</sup> ; Dalgleish, 1997, 1982 ; Guthy et Novak, 1977 ; Alais, 1974).

Lorsqu'une proportion suffisante de la  $\kappa$  caséine est hydrolysée, le potentiel électrocinétique et le degré d'hydratation des micelles sont réduits. Les forces qui empêchaient primitivement le rapprochement de celles-ci sont affaiblies et la diminution de la couche périphérique d'eau d'hydratation permet l'établissement de liaisons nouvelles, provoquant l'agrégation des micelles et la formation du gel (Lenoir et Veisseyere, 1987).

Au début de l'agrégation, le réseau protéique du gel est constitué de courtes chaînes. Les particules de micelles sans glycomacropéptide, sont initialement liées entre elles par des ponts calciques et ne se touchent pas. Les micelles libres s'agrègent soit sur la matrice protéique soit entre elles. Les particules de caséine associées entre elles finissent par fusionner et forment des blocks, des grappes pour former à la fin un réseau spongieux (Lucey, 2003 ; 2002<sup>b</sup> ; Fox et Mulvihill 1990 ; cités par Cayot et Lorient, 1998 ).

La réduction du pH ou l'augmentation de la température du lait emprésuré permet la coagulation du lait pour un degré d'hydrolyse de la caséine  $\kappa$  moins important (Kowalchuk et Olson, 1977 ; cités par Cayot et Lorient, 1998). Lorsque la présure est additionnée à une température inférieure à 15°C, l'agrégation ne se produit pas ; ce qui montre l'importance des liaisons hydrophobes lors de la formation du gel (Lucey, 2003 ; Dalgleish, 1997). Le résultat de la coagulation est la formation d'un réseau tridimensionnel à mailles très lâches emprisonnant le lactosérum (Lenoir et Veisseyere, 1987). L'augmentation de la température de 31 à 40 °C augmente la vitesse de précipitation des caséines 5 fois plus (Kay *et al*, 1977; cités par Dalgleish, 1982). La diminution du pH de 6.8 à 6.3 accélère l'agrégation des micelles de caséine par deux (Kowalchuk, 1977 ; cité par Dalgleish, 1982).

#### **4-3 Rôle des sels de calcium et du phosphate sur la coagulation**

La fraction minérale du lait est constituée de plusieurs composés qui existent surtout sous forme de sels solubles. Les éléments majeurs, le calcium, le potassium, le magnésium et le sodium forment des sels avec les éléments acides : protéines, phosphates et chlorures. Une partie des éléments minéraux se retrouve sous forme

colloïdale en association avec les caséines c'est le cas des phosphates et des citrates de calcium et de magnésium (St-Gelais *et al.*, 2002).

Le calcium présent dans le lait est en partie en solution, sous forme de sels et d'ions libres, et en partie à l'état colloïdal (phosphate de calcium colloïdal), dans ce dernier cas, le calcium est associé aux caséines dans les micelles (Lucey et Fox, 1993).

La stabilité des caséines du lait dépend dans une large mesure d'un équilibre entre les formes solubles et colloïdale et les formes ioniques et non dissociées. Cet équilibre peut être modifié par un changement de pH ou d'acidité, de température, d'addition de sel de sodium, de calcium et de citrate.

Les sels de calcium et de phosphate ont un rôle important dans la coagulation présure et dans la structure des gels. L'addition du calcium réduit le temps de coagulation en neutralisant les charges négatives des résidus de caséine, ce qui augmente l'agrégation des micelles de caséine (Lucey et Fox, 1993).

La phase primaire de la coagulation est indépendante du calcium, alors que la phase secondaire est liée aux deux formes de calcium, forme ionique  $\text{Ca}^{2+}$  et forme colloïdale en réduisant le potentiel des para-caséines en résidus de phosphosérine négative ou les groupes carboxyliques des caséines  $\alpha$  et  $\beta$  conduisant à une augmentation de la vitesse d'agrégation des micelles de caséine (Dalglish, 1983 cité par Lucey et Fox 1993 ; Richardson, 1975).

Dans les fromages de type présure, plus de la moitié du phosphore du calcium et du magnésium sont retenus dans le caillé, alors que le sodium et le potassium sont éliminés dans le lactosérum (St-Gelais *et al.*, 2002)

## **5- Interactions impliquées dans la formation d'un gel**

L'association des micelles de caséine lors de la coagulation nécessite un équilibre entre les interactions protéiques, entre protéine et solvant d'un côté, et entre les forces répulsives entre les chaînes polypeptidiques adjacentes de l'autre côté. La force, la flexibilité, la géométrie de la matrice et le comportement rhéologique du gel dépendent de la nature des interactions impliquées, du type de la coagulation (acide ou présure) ainsi que des conditions de la coagulation tels que le pH, la température et la force ionique (Lucey *et al.*, 2003 ; Lucey 2002<sup>b</sup> ; Lucey et Singh, 1998).

Lors de l'hydrolyse de la  $\kappa$ -caséine, l'élimination du glycomacropéptide réduit la charge de surface de la micelle d'un tiers et diminue par conséquent les répulsions électrostatiques intermicellaires, ce qui facilite leur association. Les interactions ioniques sont également possibles entre les charges positives de la paracaséine  $\kappa$  et les charges négatives des caséines  $\alpha$  et  $\beta$ . Des ponts phosphocalciques peuvent également s'établir entre micelles (Cayot et Lorient, 1998 ; Dalgleish, 1997 ; Mickael Eskin, 1990 ; Ernstrom, 1983).

Les interactions électrostatiques dues aux groupements ionisables engendrent des forces attractives et contribuent à la stabilité de la structure secondaire ou tertiaire des micelles de caséine (Bernhardt, 1969). Les interactions électrostatiques impliquent des énergies comprises entre 42 et 84 kJ/mole (Cheftel *et al.*, 1985), et sont détruites par des solutions salines, des pH faibles ou forts.

Les liaisons hydrogènes s'établissent entre un atome électronégatif possédant au moins un doublet électronique et un atome d'hydrogène lié par covalence à un atome électronégatif. Dans les protéines, les liaisons hydrogènes peuvent apparaître entre l'oxygène d'un groupement carbonyle d'une liaison peptidique et l'hydrogène du NH d'une autre liaison peptidique (C=O...H-N). L'énergie de ces liaisons est comprise entre 8 à 40kJ/mole. Ces liaisons jouent un rôle important dans la stabilisation des structures secondaires et tertiaire des protéines. Elles sont renforcées avec le froid et détruites par la chaleur, les détergents et l'urée (Cheftel *et al.*, 1985 ; Tanford, 1968) .

Les interactions hydrophobes sont des interactions impliquant les résidus d'acide aminé à chaîne latérale aliphatique ou aromatique qui auront tendance à s'associer dans des régions hydrophobes internes de la protéine. Elles ont une énergie comprise entre 4 et 12 kJ/mole et sont détruites par l'addition de détergent et de solvants organiques, et renforcées par la chaleur (Cheftel *et al.*, 1985 ; Tanford, 1968).

La diminution du pH lors de la coagulation acide, réduit la barrière énergétique, les répulsions d'hydrogènes permettent la formation des interactions électrostatiques entre particules. Cette création de nouvelles interactions, peut faciliter d'avantage les liaisons intermoléculaires tels que les liaisons hydrophobes et hydrogène entre protéines voisines ou polypeptides de la matrice du gel. Dans les gels présure, les micelles de caséines sont liées par des interactions entre le calcium, les groupes

carboxyliques et les phosphosérine (Lucey, 2002<sup>b</sup> ; Lefebvre-Cases *et al.*, 1998 ; Lucey et Singh, 1998).

Selon Lucey et Singh, (2003), la matrice du gel est composée de particules de caséine reliées ensemble par des forces de natures diverses, les interactions impliquées dans la formation du gel et sa stabilité, et par conséquent ceux responsables de ses propriétés rhéologiques sont constituées spécialement de ponts calciques, de forces de Van Der Waals et d'interactions hydrophobes et des interactions électrostatiques. Les liaisons covalentes sont importantes dans les gels acides cuits à température élevée tels que le ricotta et le quarg. Le tableau 3 montre les différents types d'interactions impliqués dans un gel acide et gel présure.

**Tableau 3 : Types d'interactions impliquées dans la formation et le maintien des gels acides et des gels présure. (VanVliet et al 1989 cités par Cayot et Lorient 1998)**

Types d'interactions	Gel acide (pH 4.6)	Gels présure (pH6.65)
Interactions hydrophobes	+	++
Attractives via charges +/-	++	+
Phosphates de calcium micellaire	0	++
Calcium ionisé	+	++
Répulsives	+	++
VanderWaals, hydrogène,	?	?

Peu de littérature explique avec exactitude, la nature et le type d'interactions responsables de la formation et de la rhéologie des différents gels.

Roefs et Van Vliet, (1990), ont pu montré l'importance des interactions électrostatiques, hydrophobes et des attraction de type Van der Waals dans la formation d'un gel acide.

Les travaux de Lefebvre-cases *et al.*, (1998) et Keim et Hinrichs (2003) sur les interactions impliquées dans la formation et la stabilité des gels présure et acide, en utilisant des agents dissociants ont permis de conclure que les interactions hydrogènes sont impliquées dans la formation des deux types de gel, et que les interactions

hydrophobes et les liaisons calciques sont principalement impliquées dans la formation et le maintien du gel présure.

## **6- Mécanisme de la synérèse et de l'égouttage**

Un coagulum obtenu par voie enzymatique (présure) maintenu au repos, après un certain temps de sa formation, présente une "sueur" sur toute sa surface composée de gouttelettes de lactosérum, ces dernières grossissent et se rejoignent pour constituer une enveloppe liquide autour du gel, ce phénomène est la synérèse, où il y'a concentration et diminution de volume du coagulum par élimination d'eau et de constituants solubles (Weber, 1997).

Après formation du gel, et sous l'influence de nouvelles liaisons qui s'établissent entre les micelles, ou du renforcement des liaisons existantes, il se produit une rétraction du gel aboutissant à l'expulsion d'une fraction du lactosérum (Lodaite *et al.*, 2000 ; Lenoir et Veisseycere, 1987 ; Alais, 1974), cette expulsion est favorisée par le tranchage et l'agitation du gel (Calvo et Balcones, 2000, Daviau *et al.*, 2000).

La séparation du lactosérum expulsé par synérèse qu'il soit à l'extérieur ou entre les couches du caillé est une étape clé dans la fabrication fromagère, cette séparation se fait généralement par décantation et filtration, ou sous une action mécanique telle que la pression après tranchage. L'ensemble des opérations de synérèse et d'évacuation du lactosérum, constitue l'opération d'égouttage (Weber, 1997).

Les quantités d'enzymes retenues après égouttage varient de 40% (pour le camembert) à 6% pour le cheddar. Ces taux sont fonction du pH : plus le pH du lait est bas plus la quantité de présure retenue est importante (Holmes *et al.*, 1977 ; cité par Desmazeaud, 1997).

Selon Weber, (1997) les mécanismes fondamentaux de la synérèse et de l'égouttage d'une coagulation présure sont répartis sur 3 étapes principales :

La première étape débute sous l'action de la protéase coagulante par libération de composés hydrophiles (le glycomacropéptide). L'eau qui entoure les micelles et les agrégats de micelles empêche leur réunion, et s'oppose à la synérèse par l'établissement de liaisons secondaires. Le traitement thermique (cuisson des pâtes pressées) diminue le

degré d'hydratation des micelles en favorisant l'établissement des liaisons intermoléculaires et accentue l'égouttage.

Dans la deuxième étape, la protéolyse due à l'enzyme coagulante et la réduction progressive de l'eau d'hydratation libère des sites réactionnels favorables à l'établissement de nouvelles liaisons variées entre les agrégats micellaires. Ces liaisons devenant de plus en plus nombreuses et fortes provoquent la contraction du coagulum et l'expulsion du lactosérum.

En troisième étape, lorsque la synérèse est suffisamment avancée, des ponts disulfures s'établissent entre les molécules protéiques par les acides aminés soufrés, caractéristiques de la fin de la synérèse. L'accroissement progressif de la force et du nombre des liaisons produit un resserrement du réseau filamenteux de caséine et une expulsion du lactosérum interstitielle.

L'aptitude à l'égouttage varie avec l'intensité et la spécificité de l'activité protéolytique de l'enzyme utilisée (Knoop *et al.*, 1975 ; Ramet, 1976 cités par Weber, 1997).

L'acidification favorise la synérèse, cela est due à deux raisons, d'une part, la baisse du pH diminue l'eau d'hydratation des micelles, et d'autre part, la solubilisation d'une partie du calcium lié aux protéines favorise l'établissement de liaisons en libérant des sites (Alais, 1974).

## **7 Propriétés rhéologiques du caillé**

La rhéologie est l'étude de la déformation d'un corps sous l'effet d'une force externe, elle permet de suivre le comportement dynamique d'un corps en le soumettant à une contrainte physique et en étudiant la déformation qui lui est associée. Les deux grandeurs physiques fondamentales de la rhéologie sont la contrainte (stress) et la déformation (strain) (Roudot, 2002).

La contrainte ( $\tau$ ) est une grandeur dynamique qui correspond à la force de contact qui est appliquée au système par unité de surface ; elle s'exprime en  $\text{N/m}^2$ .

La déformation ( $\varepsilon$ ) est une grandeur cinématique qui décrit la modification du système dans l'espace ; c'est une grandeur sans dimension.

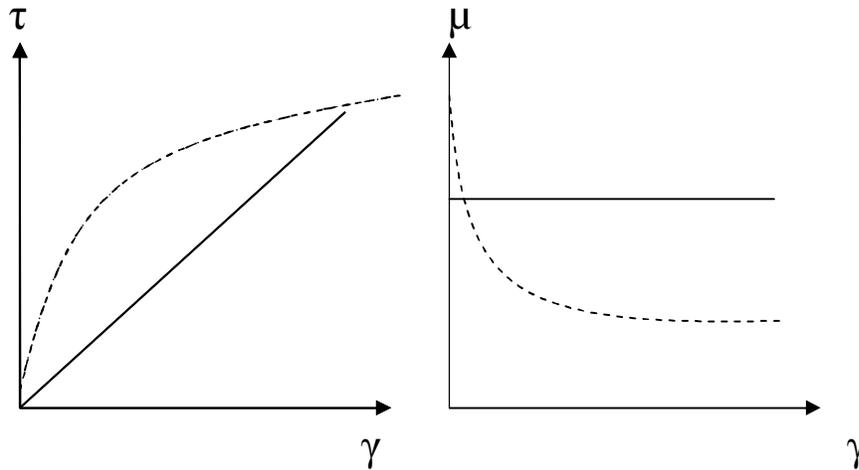
Le comportement rhéologique d'un corps dépend de ses propriétés visqueuses et élastiques. En rhéologie, il est rare de rencontrer un liquide complètement visqueux (dit newtonien) ou un solide élastique parfait.

Il est possible de décrire la consistance "le corps" d'un gel par un ensemble de paramètres rhéologiques ayant un sens physique précis : module d'élasticité, viscosité et temps de relaxation. Le gel est un corps viscoplastoélastique, autrement dit, il présente, lorsqu'il est soumis à une contrainte physique (compression mécanique, pénétration par une aiguille, cisaillement etc....) une déformation globale, qui est une combinaison de déformations élémentaires qui sont l'élasticité, la viscosité et la plasticité (Lucey, 2003 ; Tunick, 2000). Ce comportement dépend de plusieurs facteurs tels que le temps et la vitesse de déformation, le type de déformation, la composition du gel, la température et la géométrie de l'échantillon (Tunick, 2000).

La coagulation est un changement d'état physique irréversible : un lait initialement liquide passe à l'état semi-solide, souvent désigné par le terme général de gel, ou le terme plus spécifique de coagulum. C'est une structure évolutive, poreuse, constituée d'un réseau de chaîne protéique emprisonnant le sérum. Comme pour tous les gels, le liquide empêche le réseau de s'effondrer en une masse compacte, tandis que le réseau retient le liquide (Dickinson et Eliot, 2003).

Au début de la coagulation, le lait se comporte essentiellement comme un liquide, caractérisé par sa résistance à l'écoulement, la viscosité. La formation du réseau protéique introduit une résistance à la déformation ou élasticité.

La corrélation entre la vitesse de cisaillement et la contrainte ou la viscosité apparente définit la capacité d'écoulement d'un fluide et définit la nature du gel. La figure5 montre les différents types de gels.



**Figure 5 : Courbes d'écoulement et de viscosité d'un liquide Newtonien et d'un fluide rhéofluidisant**

——— Liquide Newtonien  
 - - - - - Fluide rhéofluidisant

$\gamma$  : vitesse de cisaillement ;  $\tau$  : Contrainte de cisaillement ;  $\mu$  : viscosité apparente

# *Matériels et Méthodes*

## **I- Matériels et méthodes**

### **1 Le lait**

Le lait utilisé a été reconstitué à raison de 12% (p/v) à partir d'une poudre de lait écrémé de qualité moyen chauffage (middle heat, Clover regular skimmed powder S. Africa). Au cours de la préparation, le lait est enrichi en calcium (0.01M), et stabilisé par de l'azide de Sodium (0.04%) afin de prévenir tout développement microbien. Il est ensuite stocké à 4°C pendant au moins 12 heures afin de permettre l'équilibre physico-chimique.

La poudre de lait utilisée provient d'un seul et même lot, et conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité.

### **I-2 La présure**

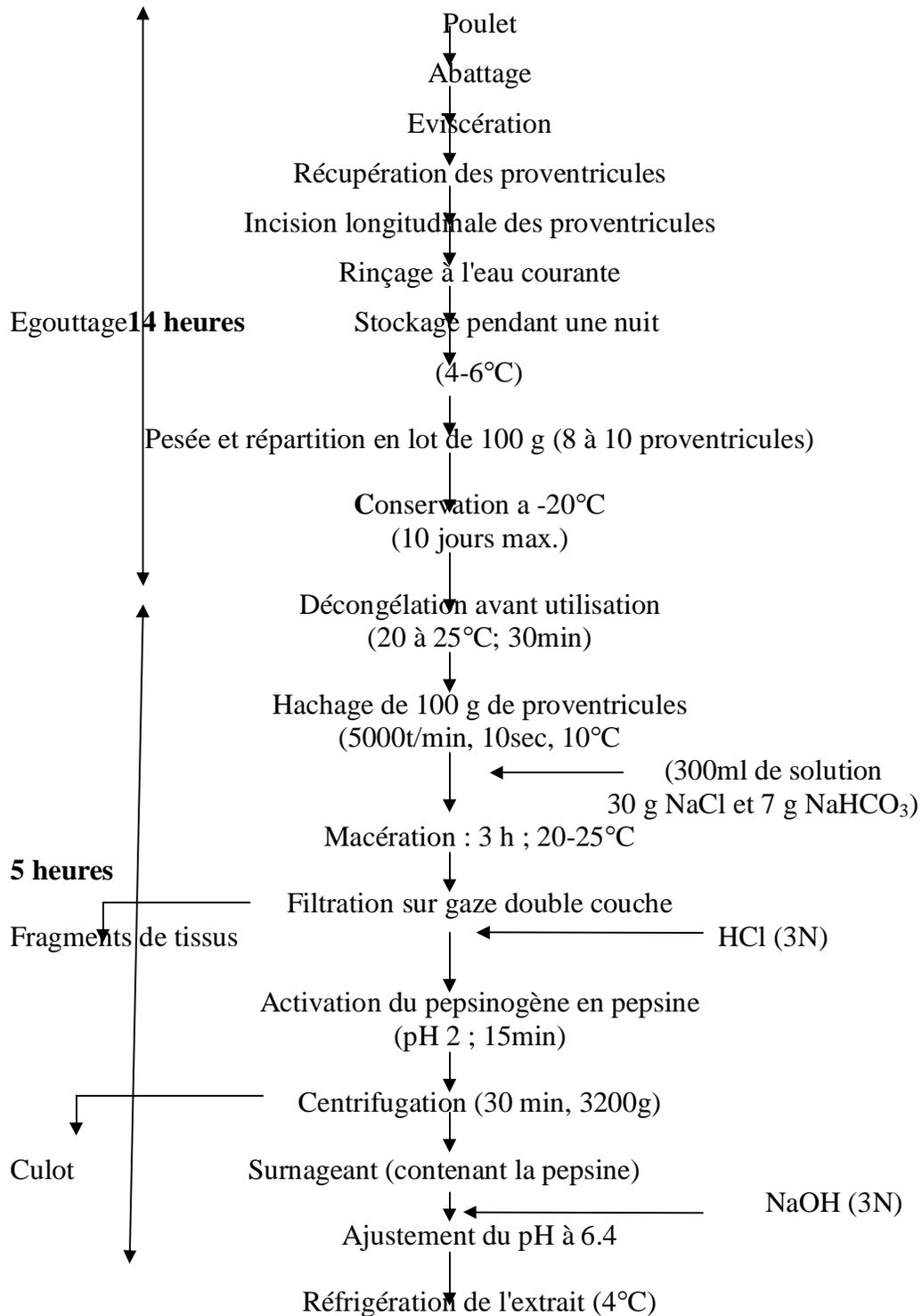
La présure utilisée est une présure en poudre commerciale (Rhodia food, Marshall TM, France) de force 1/100.000 à 520mg de chymosine/100g. La poudre de présure est conservée à 4°C.

A partir de cette poudre, nous avons préparé une solution mère par reconstitution de 1g de poudre dans 100ml d'eau distillée. Cette solution est conservée à 4°C durant une semaine maximum.

Lors de chaque utilisation nous avons procédé à une dilution dans de l'eau distillée à raison de 2% (v/v) à partir de la solution mère (soit à  $2 \cdot 10^{-4}$ g de poudre de présure/ml d'eau) correspondant à un temps de floculation à 30°C compris entre 12 et 15 min.

### **I-3 La pepsine**

La pepsine est extraite à partir de proventricules de poulets selon la méthode de Bohak, (1969). Le protocole d'extraction est résumé en figure I-1.



## **Figure I-1 : Diagramme de préparation des proventricules et d'extraction de la pepsine de poulet**

### **I-3-1 Préparation des proventricules**

Les proventricules sont récupérés d'un abattoir situé dans la région du "Meridj" (Constantine). Après abattage et éviscération des poulets, un lot d'environ 4 kg de proventricules est récupéré, débarrassé de la matière grasse qui l'entoure puis lavé (figure I-1).

Les proventricules de poulet de poids variant entre 8 et 10 g sont ouverts à l'aide d'un couteau et rincés à l'eau de robinet pour éliminer les particules d'aliments adhérentes puis égouttés. Ils sont ensuite réfrigérés et acheminés vers le laboratoire où ils sont immédiatement répartis en portion de 100g (8 à 10 pièces), puis congelés à -20°C jusqu'à utilisation.

### **II-3-2 Extraction**

Pour chaque extraction une portion de 100 g est décongelée à température ambiante (20 à 25°C) pendant 30 min, puis hachée dans un hachoir à viande (Grindomix GM100 Retsh) tournant à 5000t/min pendant 10 secondes (figure I-1) Le tissu haché est laissé pour macération dans une solution de 3% de NaCl et 0.7% (p/v) de NaHCO<sub>3</sub> (p/v) à 25°C pendant 3 heures avec une agitation continue. Après macération, le mélange est filtré à travers une gaze à double couche.

L'activation du pepsinogène en pepsine est obtenue par acidification du filtrat à pH 2 pendant 15 min, suivie d'une centrifugation à 3200g pendant 30min permettant l'élimination du mucilage. L'extrait obtenu est ajusté à pH 6.4 et conservé au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation.

Avant chaque utilisation l'extrait est dilué à raison de 1.65% (v/v) (soit 1:60) dans de l'eau distillée afin d'obtenir un temps de floculation à 30°C compris entre 12 et 15min (Green, 1982).

L'extrait clarifié (avant dilution) et l'extrait dilué ne peuvent être conservés par réfrigération au delà d'une semaine à cause de la perte d'activité.

## **I-4 Techniques d'analyse**

### **I-4-1 Caractérisation du lait**

#### **I-4-1-1 Détermination du pH et de l'acidité**

Le pH et l'acidité titrable sont deux mesures d'acidité du lait. Le pH permet de déterminer les ions  $H^+$ , alors que l'acidité titrable exprime la quantité d'acide lactique. Cependant, le résultat de l'acidité titrable exprime une acidité due en partie à la caséine, aux acides organique et aux substances minérales, en acide lactique.

Le pH du lait à 25°C, change normalement dans une marge relativement étroite de 6,5 à 6,7 et une acidité titrable de 0,12 à 0,18% acides lactiques soit 12 à 18°D (1°D représente 0.1g d'acide lactique) (FAO, 1999).

Le pH du lait est mesurée par pHmètre (Knick pHmeter 766 calimatic).

L'acidité exprimée en degré Dornic, est déterminée par titration directe de l'acide lactique par l'hydroxyde de sodium 0.1N en présence de phénolphtaléine.

La mesure est réalisée sur le lait après reconstitution et avant chaque utilisation.

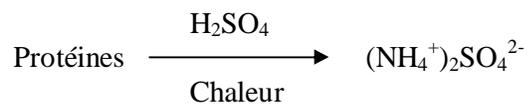
#### **I-4-1-2 Détermination de l'extrait sec**

La matière sèche correspond au poids du résidu restant après dessiccation de l'échantillon à 105°C dans un humidimètre (Precisa HA 60, Swiss). Le principe consiste à sécher 1ml de lait par infrarouge et à contrôler en continu le poids à l'aide d'une balance intégrée jusqu'à poids constant. Le pourcentage d'humidité est calculé par la différence entre le poids initial et le poids finale sur base humide.

L'extrait sec est déterminé pour 1g de poudre de lait, et 1ml pour le lait reconstitué.

### I-4-1-3 Détermination de l'azote total et de l'azote non protéique

Le dosage de l'azote est effectué par la méthode de Kjeldahl (McKenzy et Murphy 1970). Sous l'effet de la chaleur, l'échantillon est minéralisé dans l'acide sulfurique concentré en présence de catalyseurs. L'azote organique est transformé en sulfate d'ammonium.



La distillation permet la libération des molécules de  $\text{NH}_3^+$  et leur entraînement par la vapeur après alcalinisation du minéralisât par du NaOH 10N. L'ammoniac libéré est fixé dans une solution d'acide borique (4%).



La titration est réalisé par de l'acide sulfurique 0.01N.

Un volume 5ml du lait sont minéralisés pendant 3 heures dans deux types de minéralisateurs : BUCHI K429 et Velp Scientifica (Italy).

L'opération de distillation et de titration sont réalisées dans un appareil automatique BUCHI 329 (unité de distillation et titration automatique).

Le taux de protéine totale est obtenu en multipliant la teneur d'azote par un facteur de 6.38 (les protéines du lait contiennent 15.6% d'azote)

Le taux d'azote non protéique (NPN) est déterminé après précipitation des protéines du lait avec une solution d'acide trichloroacétique (T.C.A.) à une concentration finale de 12% suivi d'une filtration.

Le taux d'azote totale et d'azote non protéique sont déterminés sur un échantillon de 5ml de lait reconstitué et sur 1g de poudre de lait.

#### I-4-1-4 Détermination du taux de protéine totale (Méthode de Lowry)

Le dosage des protéines totales est déterminé par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). C'est une mesure colorimétrique où l'addition d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu à une solution protéique donne une coloration bleue foncée. Cette coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine. Les espèces réduites absorbent la lumière à 750 nm.

Une solution de caséine de concentration variant entre 0 et 100 µg/ml est utilisée pour tracer la courbe étalon (figure I-2).

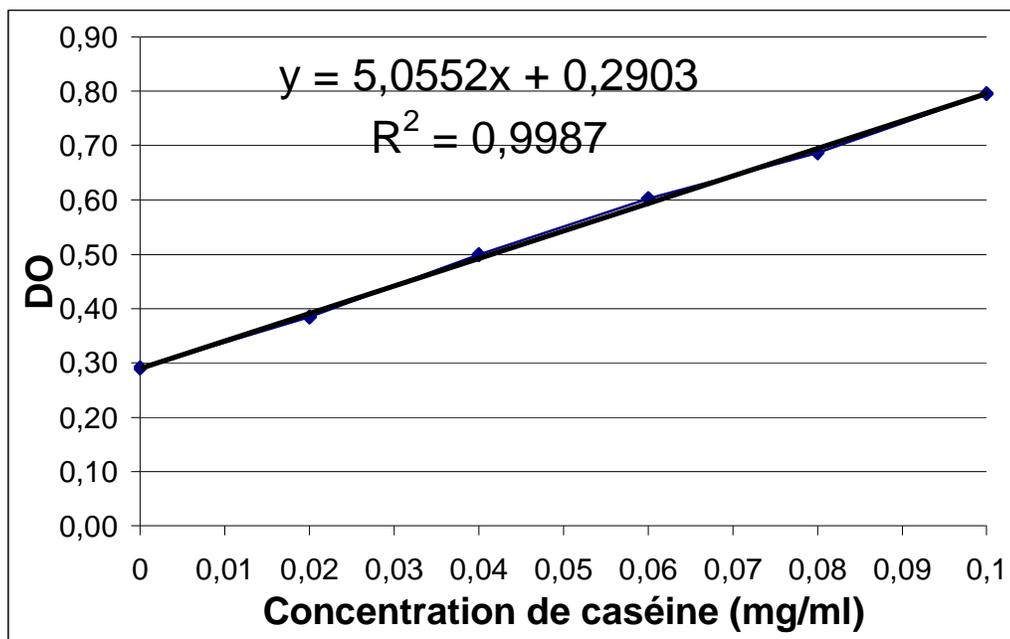


Figure I-2 : Courbe d'étalonnage de caséine

## **I-4-2- Caractérisation de l'extrait enzymatique**

### **I-4-2-1 Détermination de l'activité coagulante**

L'activité coagulante est déterminée par mesure du temps de floculation selon la méthode de Berridge (1955). Le temps de floculation est l'intervalle de temps, compris entre le moment de l'emprésurage et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'oeil nu.

L'unité d'activité coagulante (U.A.C) ou l'unité présure est défini par la quantité d'enzyme contenu dans 1ml, qui peut coaguler 10 ml de lait (substrat standard de Berridge: 12% p/v de lait écrémé en poudre dissout dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  0.01M) en 100sec à 30°C (Alais (1974)).

$$\text{U.A.C.} = 10 \cdot \frac{V}{T \cdot V'}$$

Où

V: volume du lait

V' Volume de l'extrait enzymatique

T : temps de floculation

Un volume de 10ml de lait est versé dans un tube à essai et porté à 30°C dans un bain marie. Au temps zéro, 1 ml de la solution enzymatique est ajouté et le chronomètre déclenché. Le tube immergé est maintenu incliné, de telle sorte que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du lait. Il est régulièrement animé d'un mouvement rotatif autour de son axe. Le lait forme ainsi un film mince et homogène. Au moment de la floculation, des petits flocons apparaissent au sein même de ce film.

### **II-4-2-2 Détermination du temps de prise**

Le temps de prise est le point 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 (Alais, 1974).

Un volume de 10ml de lait est versé dans un tube à essai maintenu à 30°C dans un bain marie, puis additionné de 1 ml de la solution enzymatique, le tube est laissé jusqu'à la solidification du gel et l'apparition des premières gouttelettes du sérum sur la surface du gel. Le temps écoulé représente le temps de prise.

Pour la coagulation présure, le temps de prise représente généralement environ le double du temps de floculation ; ainsi pour un temps de coagulation compris entre 12 et 15 min, le temps de prise est compris entre 25 et 30 min (FAO, 1990).

## **II-5 Cinétique de la protéolyse**

L'activité protéolytique d'une enzyme coagulante se traduit par l'augmentation du taux d'azote non protéique (non proteique nitrogen : NPN). La comparaison du rapport NPN/NT (où NT représente l'azote total) entre la coagulation pepsine et la coagulation présure, permet d'évaluer la différence de la protéolyse entre les deux enzymes.

Le dosage de l'azote non protéique, est réalisé après précipitation, avec l'acide trichloracétique (TCA) à 12% de concentration finale, des protéines du lait mis en contact avec l'enzyme. Après filtration, l'azote est dosé par la méthode Kjeldahl.

Une série de 11 tubes à essais contenant 10ml de lait (substrat standard) chacun sont maintenus à 35°C pendant 1 heure dans un bain marie. Au temps 0, 1ml de l'enzyme est ajouté pour chaque tube, et le chronomètre est déclenché. Pour chaque temps de la cinétique, 10ml d'une solution de TCA 24% sont ajoutés, et le tube est bien agité.

Il faut signaler que nous avons utilisé des concentrations de présure et de pepsine assurant un temps de floculation compris entre 12 et 15min pour toute l'analyse.

Chaque tube est filtré, et le sérum est récupéré pour déterminer la teneur en azote par la méthode de Kjeldahl.

La cinétique de la protéolyse des deux enzymes est étudiée en dosant le NPN à des intervalles de temps de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 35, 45 et 55 min.

L'expérience permettant l'obtention de cette cinétique est répétée cinq fois, et nos résultats exprimeront la courbe moyenne. L'étude statistique (ANOVA) déterminera le niveau de signification des différents points de la cinétique.

## **II-6 Etude des interactions impliquées dans le gel**

La méthode utilisée est celle pratiquée par Lefebvre-Cases *et al.*, (1998). Le principe est basé sur la destruction des interactions impliquées dans la formation et le maintien des structures des gels présure ou pepsine par des agents dissociants : Sodium dodecyl sulfate (SDS), urée, et acide éthyle diamine tétra acétique (EDTA).

L'urée établit des liaisons hydrogènes fortes avec les liaisons peptidiques et dénature la protéine en rompant les liaisons hydrogènes intramoléculaires. Les détergents ioniques tels que le SDS sont incapables de détruire les liaisons hydrogènes des peptides qui stabilisent la structure secondaire des protéines. Cependant le SDS réagit avec les groupes chargés des chaînes latérales des protéines provoquant des répulsions électrostatiques intramoléculaires conduisant à une destruction compétitive des interactions hydrophobes. L'EDTA est utilisé comme agent chélateur du calcium et permet de situer l'importance des liaisons calciques.

Le lait destiné à l'approche des interactions est maintenu à 30°C pendant 2 heures pour s'équilibrer, puis la présure ou la pepsine est additionnée.

Après un temps de floculation de 15 min, suivie de 15 min supplémentaires, le gel formé est dilué avec la solution dissociante à raison de 1/5 (V/V) (4ml de gel dans 16ml de l'agent dissociant). Pour l'échantillon témoin, le gel est dilué dans de l'eau distillée. L'échantillon est ensuite homogénéisé rapidement à l'aide d'un Polytron (swiss SEV) pendant 30 sec à 20000t/min. Les dispersions de gel ainsi obtenues sont ensuite

ultracentrifugées (centrifugeuse CentriKon, T-42K Italie, Rotor A21C) à 34000g pendant 90 min.

Les concentrations des agents dissociants utilisées sont regroupées dans le tableau I-1 :

**Tableau I-1: Concentration des différents agents dissociants**

SDS (g/l)	0	2	4	6	8	10	-
Urée (M)	0	1	2	3	4	5	6
EDTA (mM)	0	2	4	6	-	-	-

Le surnageant est délicatement récupéré et stocké à 4°C jusqu'à analyse.

L'estimation des protéines libérées dans le surnageant est déterminée par dosage selon la méthode de Lowry.

Pour chaque type d'agent nous avons procédé à trois répétitions, les résultats seront exprimés en moyenne  $\pm$  écart type.

Le niveau de signification des différences de l'effet de chaque agent dissociant par type de gel sera étudié par une analyse de la variance.

### **I-7 Comparaison du comportement rhéologique du gel**

Les propriétés rhéologiques des gels sont étudiées à l'aide d'un rhéoviscosimètre HAAKE VT550. Le produit à analyser est cisailé entre deux cylindres coaxiaux MVdin, où le rotor interne est à l'origine du cisaillement. Le viscosimètre est piloté par ordinateur muni d'un logiciel d'analyse VT 1.x OS550.

La température de l'échantillon est maintenue à 30° ( $\pm 0.3^\circ\text{C}$ ) pendant toute la durée de la mesure grâce à un bain thermostaté (HAAKE K115).

Le principe des essais réalisés avec ce rhéomètre consiste à cisailier l'échantillon avec un certain gradient de cisaillement  $\gamma$  et à mesurer la contrainte  $\tau$  ou la viscosité ( $\eta$ ) qui en résulte en fonction du temps.

La viscosité apparente (dynamique) du lait  $\eta$  en fonction du temps  $t$  est ensuite déterminée à partir de l'équation de Newton  $\eta = \tau/\gamma$

Le lait a un comportement newtonien tant qu'il se trouve dans un état liquide, mais dès que ses propriétés viscoélastiques apparaissent, l'équation de Newton ne devrait plus être appliquée. Toutefois en choisissant un gradient de cisaillement assez élevé, le lait coagulé tend à se comporter comme un liquide newtonien.

### **I-7-1 Evolution de la viscosité au cours de la coagulation**

Le but de cette étude viscosimétrique est de suivre l'évolution de la viscosité apparente du lait au cours du processus de la coagulation. Pour cela, nous avons été amené à effectuer plusieurs essais avec différents gradients de cisaillement compris entre 100 et 1000  $\text{sec}^{-1}$  (Bolmstedt, 2000). Nous avons retenu un gradient de 380  $\text{sec}^{-1}$  pour la suite des études parce qu'il permet d'avoir un comportement Newtonien du lait et du gel à cette valeur (les conditions expérimentales de la mesure sont résumées dans le tableau I-2.

**Tableau I-2 : Conditions expérimentales des mesures réalisées à partir du rhéoviscosimètre**

Paramètres de la mesure	
Durée totale de la mesure	60 min
Nombre de points mesurés	60
Durée entre chaque point	1 min
Vitesse de cisaillement	380 $\text{sec}^{-1}$
Viscosité du lait à t=0	2.45 mPa.s
Température	30°C

Un volume de 10ml de lait (substrat standard) est maintenu dans le cylindre (MVdin) à une température de 30°C pendant 1 heure. Au temps 0 ; l'enzyme est ajoutée, et la mesure est déclenchée. Le rhéoviscosimètre détermine la viscosité du lait chaque minute au cours de la coagulation, et cela pendant 60 min. Ceci nous permet de visualiser l'évolution de la viscosité en fonction du temps.

L'expression des résultats est donnée par une courbe moyenne issus de 5 répétitions.

### **I-7-2 Courbe d'écoulement du gel**

Nous avons également étudié le type de gel formé en déterminant la courbe d'écoulement et de viscosité des deux gels. La corrélation entre le gradient de vitesse et la contrainte de cisaillement ou la viscosité apparente définit la capacité d'écoulement d'un fluide et donc la nature du gel.

Après formation d'un gel ferme, nous avons déterminé la viscosité apparente et la contrainte de cisaillement en fonction d'un gradient de cisaillement de 250 à 500sec<sup>-1</sup>.

Un volume de 10ml additionné de 1ml de la solution enzymatique est maintenu dans le cylindre (MVdin) à une de température de 30°C pendant 30 min. Après formation d'un gel ferme, la mesure de la viscosité apparente et de la contrainte de cisaillement est déclenchée par le rhéoviscosimètre. La vitesse de cisaillement passe de 250 à 500sec<sup>-1</sup> pendant 5min.

Les résultats seront exprimés par une courbe moyenne de trois répétitions.

### **I-8- Cinétique de la synérèse et de l'égouttage**

La synérèse est l'expulsion spontanée du lactosérum et la séparation de ce dernier du gel, c'est une étape importante en fromagerie, car elle détermine les propriétés rhéologiques et l'extrait sec final du produit.

La cinétique de la synérèse est déterminée par la méthode de Marshall, (1982), cité par Calvo et Balcon, (2000), qui consiste à préparer un gel, le trancher en cubes de 1cm<sup>3</sup>, puis de récupérer le lactosérum exsudé en fonction du temps à intervalle constant.

Dans un bécher maintenu à une température de 30°C, nous avons procédé à la coagulation de 100 ml du lait. Après floculation puis prise, le gel est coupé, de façon à

obtenir des cubes de  $1\text{cm}^3$  (il faut noter que le volume du lait doit occuper 1cm de hauteur dans le bécher). Une gaze double est placée sur la surface du bécher afin de retenir les particules du gel au cours de l'écoulement.

Le bécher est maintenu dans le bain marie à  $30^\circ\text{C}$ , et le volume du lactosérum écoulé est récupéré et mesuré en fonction du temps pendant 4 heures à 15 min d'intervalle.

L'expérience permettant l'obtention de cette cinétique est répétée cinq fois. Les résultats seront exprimés en une courbe moyenne du volume exsudé/volume initiale du lait en fonction du temps.

Afin de déterminer l'effet de la concentration de l'enzyme et par conséquent le temps de floculation sur la synérèse, nous avons déterminé la cinétique de la synérèse à différentes concentrations d'enzymes correspondant à 8, 15 et 30 min de temps de floculation, soit des dilutions de l'extrait de pepsine de 2.5%, 1.6% et 1.2%.

Le point de départ de notre cinétique ou temps 0 correspond au temps de prise où le gel est tranché.

### **I-9 Capacité de la rétention d'eau**

La capacité de rétention d'eau est la quantité d'eau en gramme retenue dans 100g de gel après centrifugation (Le Meste et Colas, 1990), c'est une caractéristique qui affecte certains paramètres tels que le rendement, le comportement rhéologique, les propriétés sensorielles et l'humidité finale du gel.

La capacité de rétention d'eau (Water holding capacity : WHC) est mesurée selon la méthode de Pandey *et al.*, (2000). Cette méthode consiste à centrifuger 10 ml de lait après coagulation avec 1ml d'enzyme à  $30^\circ\text{C}$  pendant 30 min, le gel ainsi formé est maintenu à  $30^\circ\text{C}$  pendant 30min supplémentaires. La centrifugation est réalisée à 4500g pendant 10 min.

$$\text{WHC} = \frac{M.m_0}{100} \cdot \frac{100}{\text{}} = \frac{M.m_0}{\text{}} \cdot \frac{100}{\text{}}$$

$$100 - E \quad M-E$$

Où :

M : Masse du gel avant centrifugation (g)

$m_0$  : Pourcentage initial de l'humidité (exprimée sur base humide)

E : Masse de l'exsudat (g)

### *Analyse statistique*

Les résultats sont la moyenne d'au moins trois essais, et présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type.

L'étude statistique par analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée par le logiciel MINITAB version 13.31

## *Résultats et Discussions*

## **II- Résultats et Discussion**

La coagulation enzymatique du lait provoque d'importantes modifications biochimiques qui affectent la structure des micelles de caséines et provoquent leur agrégation.

La coagulation du lait par la présure a été largement étudiée ; cependant, la substitution de la présure par la pepsine de poulet et la caractérisation de l'étape de la coagulation, n'a fait l'objet que de très peu d'études.

Les études menées sur la coagulation par la pepsine de poulet ont porté sur la comparaison des fromages affinés (cheddar, emmental, kashkaval) produits avec la pepsine de poulet à ceux préparés par la présure ou autres enzymes coagulantes (Green, 1984 ; Gordin et Rosenthal, 1978).

Notre travail a pour but la caractérisation des phases de la coagulation par la pepsine de poulet et la comparaison à celle de la coagulation par la présure.

Pour répondre à cet objectif, nous avons, tout d'abord, commencé par l'extraction de la pepsine de poulet à partir des proventricules et la caractérisation de l'extrait enzymatique. Ensuite nous avons déterminé la cinétique de protéolyse, et étudié le comportement rhéologique du gel formé. D'autre part, nous avons tenté d'approcher les interactions impliquées dans la formation et le maintien du gel et de déterminer la cinétique de la synérèse. Ces paramètres sont toujours comparés à ceux du gel présure.

## II-1 Caractéristiques du lait

Le lait utilisé présente les caractéristiques suivantes (tableau II-1)

**Tableau II-1 : Caractéristiques physico-chimiques du lait**

Composition	Moyenne±écart type	Méthode utilisée
Humidité (lait reconstitué) (%)	88.38±0.087	Dessiccation à 105°C
Protéine totale (g/100ml)	3.971±0.078	Kjeldahl
NPN (g/100ml)	0.236±0.001	Kjeldahl
%NPN/NT	5.9	
Acidité (°D)	18.83±0.29	
pH	6.41±0.02	pHmètrie
Humidité (poudre de lait) %	5.33±0.12	Dessiccation à 105°C

Le lait utilisé est un lait préparé à raison de 12% (p/v) dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 0.01 M à partir d'une poudre de lait écrémé de qualité moyen chauffage. Ce lait présente un taux de protéines totales de 39,7g/l et un taux d'azote non protéique NPN/NT de 5.9%, légèrement supérieur à ceux donnés par différents auteurs : protéines totales 34 à 36g/l et taux d'NPN/NT de 4.9% à 5.2 % (Emmons *et al.*, 2003 ; Ribadeau-Dumas, 1991).

Le pH et l'acidité sont conformes à ceux donnés par les différents auteurs (Ribadeau-Dumas, 1991, FAO ; 1990).

## II-2 Caractéristiques de la pepsine de poulet

Les caractéristiques de l'extrait clarifié de pepsine de poulet et la dilution utilisée, ainsi que celles de la présure sont regroupées au tableau II-2.

Le volume moyen de l'extrait enzymatique obtenu à partir de 100g de proventricules est de 250 ml.

**Tableau II-2 : Caractéristique de l'extrait enzymatique**

	Pepsine		Présure	
	Extrait clarifié	Dilution 1.65%	Solution mère (1%)	Dilution (2%)
Temps de floculation (sec)	41,25±1,90	849±11,13	30,33±2,21	865±17,6
Temps de prise (sec)	62,13±3,56	1216±62,33	54,23±2,33	1869±78,32
Activité coagulante U.A.C/ml	2,42±0,10	0,11±0,0015	3,31±0.24	0,11±0,0022

Nous pouvons remarquer que l'extrait clarifié de la pepsine de poulet, donne un temps de floculation à 30°C d'environ 41sec. La dilution dans de l'eau distillée à raison de 1.65 % (v/v), donne un temps de floculation d'environ 14 min. Nous avons choisi ce taux de dilution après plusieurs essais, pour obtenir un temps de floculation compris entre 12 et 15min comme indiqué par Green, (1984).

La solution mère à 1% de poudre de présure donne un temps de floculation d'environ 30sec, la dilution nécessaire pour obtenir le même temps de floculation que la pepsine de poulet (12 à 15min), est de 2% (v/v) à partir de la solution mère.

L'unité d'activité coagulante (U.A.C.) qui représente la quantité d'enzyme contenue dans 1ml de la solution enzymatique, qui peut coaguler 10ml de lait en 100sec à 30°C, est de 2,42 unité/ml pour l'extrait clarifié de la pepsine de poulet, et de 3.31 unité/ml pour la solution mère (1%) de la présure. Pour un temps de floculation d'environ 14 min, les deux extraits enzymatiques ont 0.11 unité/ml.

### **II-3 Cinétique de la protéolyse**

La cinétique de la protéolyse au cours de la coagulation est suivie par la libération d'azote non protéique (NPN), soluble dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) à une concentration finale de 12%.

L'augmentation de la teneur en azote non protéique en fonction du temps est donnée dans le tableau II-3.

L'analyse de la variance a été réalisée pour déterminer le temps à partir duquel la différence devient non significative entre deux points successifs.

**Tableau II-3 Teneur en azote non protéique libéré**

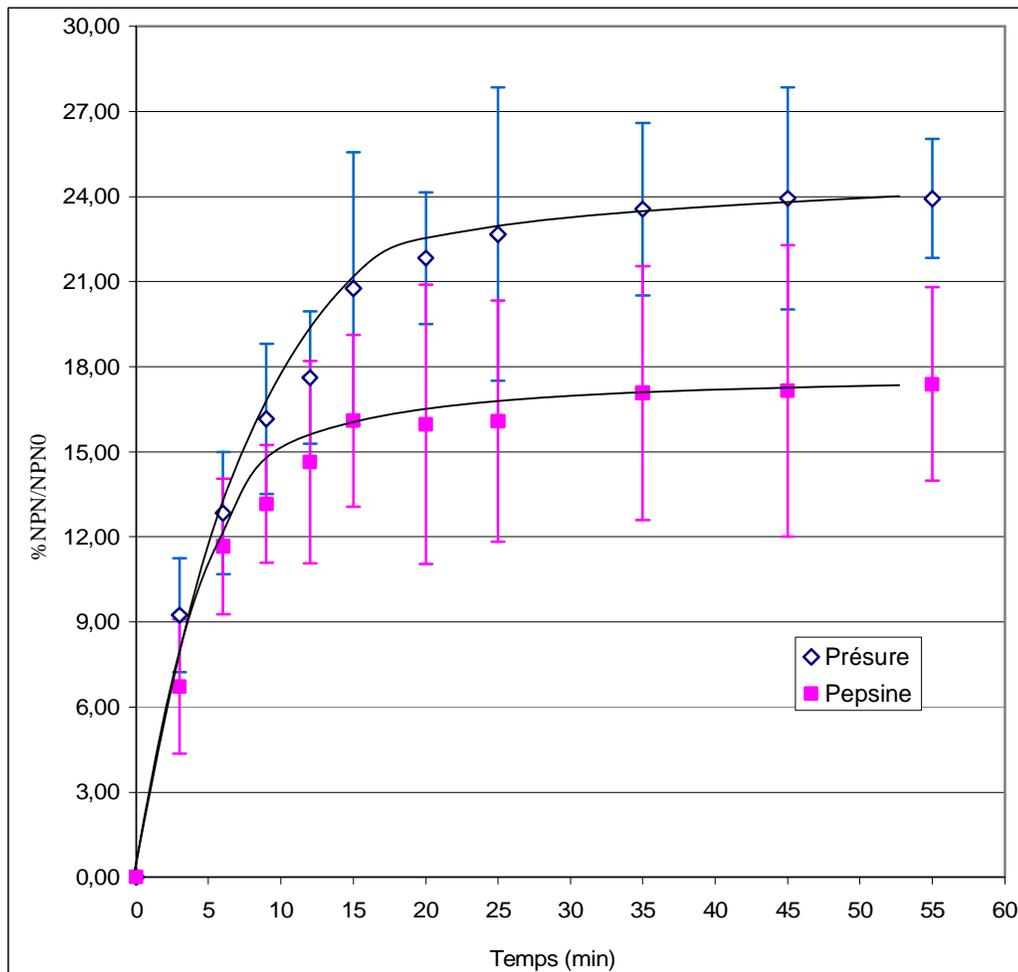
Temps (min)	Pepsine		Présure	
	NPN (g/100ml) ±Ecart type	%NPN/NT	NPN (g/100ml) ±Ecart type	%NPN/NT
<b>0</b>	0.236±0.001	5.90	0.236±0.001	5.90
<b>3</b>	0.252±0.005	6.30	0.261±0.008	6.54
<b>6</b>	0.264±0.007	6.59	0.266±0.006	6.66
<b>9</b>	0.267±0.005	6.67	0.273±0.002	6.83
<b>12</b>	0.271±0.007	6.76	0.275±0.002	6.88
<b>15</b>	0.272±0.007	6.82	0.278±0.007	6.95
<b>20</b>	0.273±0.016	6.83*	0.288±0.000	7.19*
<b>25</b>	0.275±0.009	6.85*	0.289±0.014	7.23*
<b>35</b>	0.276±0.010	6.90*	0.290±0.009	7.24*
<b>45</b>	0.276±0.012	6.90*	0.292±0.002	7.30*
<b>55</b>	0.277±0.007	6.93*	0.292±0.002	7.31*
<b>NT</b>	3.999±0.041	100.00	3.999±0.041	

\* Pas de différence significative (P>0.05)

La teneur en azote non protéique initial du lait est de 0.236g/100ml. Cette teneur augmente au fur et à mesure de la destruction de la  $\kappa$  caséine par la pepsine, et atteint lors de la floculation (15min) 0.273g/100ml. Après la floculation l'augmentation du NPN est très réduite et s'annule après 20 minutes.

Le taux du NPN/NT pour la coagulation pepsine augmente de 5.9 % à 6.83%, ce taux tend à se stabiliser à un taux de 6.9% pour la pepsine et près de 7.3% pour la présure.

La comparaison de la libération de l'azote non protéique entre la coagulation pepsine, et celle de la présure est représentée en figure II-1



**Figure II-1 : Cinétique de la libération du NPN pour la coagulation pepsine et présure**

Les deux cinétiques montrent une allure générale identique. Cependant, les taux du NPN libéré sont différents pour les deux enzymes. En effet, dès la neuvième minute, nous pouvons remarquer une différence significative entre les deux enzymes, cette

différence tend à s'accroître au cours du temps. Le taux du NPN/NPN0 (NPN0 : le taux du NPN initial du lait) atteint au temps de floculation 16.10% pour la pepsine, et 20.76% pour la présure. Le taux final est de 17.38% pour la pepsine et de 23.93% pour la présure.

Après 20min de temps d'action de la pepsine et de la présure, l'augmentation de l'azote non protéique est non significative au seuil de 5% ( $P = 0.86$ , et  $0.67$  respectivement pour la pepsine et la présure) et la courbe montre un palier jusqu'à la dernière minute (55 min). Il faut signaler que la libération du NPN ne s'arrête pas au temps de floculation mais se poursuit au-delà de ce temps.

La floculation visible à l'œil nu se produit après hydrolyse de 80% de la  $\kappa$  caséine (Mickel Eskin, 1990 ; Brulé et Lenoir, 1987), ce qui explique que la libération de l'azote non protéique se poursuit au-delà du temps de floculation.

La coagulation par la pepsine avec une libération d'azote non protéique inférieure à celle de la présure a été constatée par plusieurs auteurs. Cependant, d'autres auteurs ont confirmé que la protéolyse des différentes pepsines est supérieure à celle de la présure.

Gordin et Rosenthal, (1978) ont montré que la libération d'azote non protéique (soluble dans une solution de TCA 3%) par la pepsine de poulet d'une solution de caséine maintenue à pH 5.49, était égale à celle de la présure lors des premières 15 min (temps de floculation), après floculation, la libération du NPN (soluble dans une solution de TCA 3%) pour la coagulation pepsine est supérieure à celle de la présure. Cependant la libération de l'azote dans le lactosérum à partir d'un lait standard était égale entre les deux types d'enzymes jusqu'à 3 heures de temps d'incubation. Cette différence est due probablement au pH acide de la solution de caséine, car la pepsine de poulet montre une activité protéolytique élevée pour les pH acides.

Richardson (1975) a également rapporté sur les travaux de Mattenheimer et Nitschmann (1955), qu'après un temps de floculation de 10 min par la pepsine,

l'augmentation du taux du NPN/NPN0 était de 14.04%, alors que celle de la présure était de 28.57%, les deux taux restent constants au delà de 10 min.

En 1992, Barbano et Rasmussen, ont comparé le taux de protéolyse d'une chymosine transgénique, produite par introduction du code génétique de cette dernière chez différents microorganismes, avec d'autres enzymes coagulantes et ont trouvé un taux du NPN dans le lactosérum de la pepsine bovine inférieur à celui de la chymosine pure produite par fermentation et de la présure (33.13%, 35.00% et 35.63% respectivement) ; il faut signaler que le lait utilisé est un lait entier pasteurisé de pH 6.5 et la coagulation a été réalisé à 31°C.

Au contraire, Emmons et Beckett., (1990), qui ont utilisé du lait entier, ont étudié la protéolyse de différentes enzymes coagulantes à 31°C, et ont trouvé un taux de NPN/NPN0 de la présure inférieur à celui de la pepsine bovine et à celui des protéases d'origine microbienne (26.84% pour la présure, 29.43% pour la pepsine bovine, 38.69% pour la protéase de *Mucor pusillus*, 37.94% pour la protéase de *Mucor miehei*, et 59.61% pour la protéase d'*Endothia parasitica*).

Selon Alais (1974), il est possible qu'au moment de la coagulation, la proportion d'azote non protéique libéré par les pepsines, soit inférieure à celle de la présure pour le même temps de floculation et reste inférieure jusqu'à environ 60 min.

Dalgleish et Holt (1988) et McMahon et Brown (1990), expliquent que les micelles de caséine peuvent commencer à s'agréger avant que la réaction enzymatique ne soit complète. Donc des micelles où seulement une partie de la caséine  $\kappa$  est rompue, entrent en contact par collision, forment des grappes puis un réseau et enfin flocculent. Ce qui explique la possibilité de floculation par la coagulation pepsine à un taux de protéolyse inférieur à celui de la présure et pour le même temps de floculation.

Notre présente étude a montré que la coagulation par la pepsine présente les mêmes phases que la coagulation présure. Cependant la floculation se produit avec un taux de libération d'azote non protéique inférieur à celui de la présure. Il faut noter également que le taux du NPN/NT après 55min reste pour la coagulation pepsine inférieur à celui de la coagulation présure.

Une étude supplémentaire sur les produits de l'hydrolyse par la pepsine ou la présure par électrophorèse ou par HPLC est nécessaire pour expliquer cette différence.

#### **II-4 Etude des interactions impliquées dans le gel**

L'utilisation d'agents dissociants, permet de supposer la nature des interactions impliquées dans la formation et le maintien de la structure du réseau protéique du coagulum. Le taux de dissociation des protéines, reflète l'action de l'agent utilisé sur le réseau du gel, et par conséquent la présence d'interactions spécifiques détruites par cet agent. Les liaisons hydrogènes sont détruites par l'urée alors que les liaisons hydrophobes sont sensibles à l'action des détergents tels que le SDS, les liaisons calciques sont détruites par les agents chélateurs tels que l'EDTA (Lucey *et al.*, 2003 ; Vidal *et al.*, 1998 ; Cheftel, 1985 ; Tanford, 1968).

L'étude des interactions impliquées dans la formation et le maintien du gel pepsine a été approchée par l'utilisation du SDS pour la destruction des liaisons hydrophobes, de l'urée pour la destruction des liaisons hydrogènes et de l'EDTA pour les ponts calciques.

##### **II-4-1 Dissociation par le SDS et approche des liaisons hydrophobes**

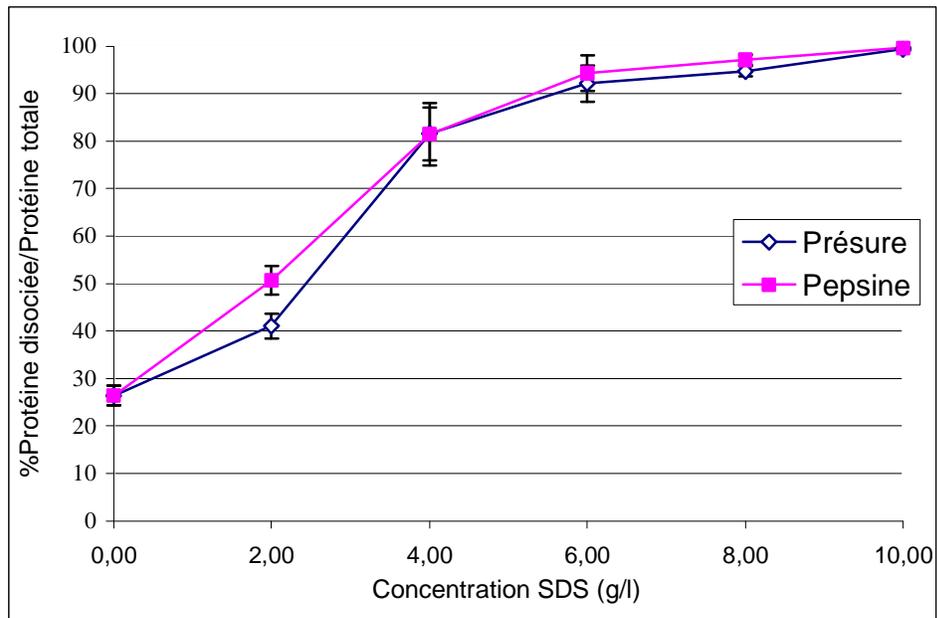
Les résultats obtenus montrent que le taux des protéines dissociées varie avec la concentration et la nature de l'agent dissociant utilisé (tableau II-4).

Le SDS semble avoir un effet dissociant important sur le gel pepsine, en effet, à une concentration de 4g/l, 81% des protéines du gel pepsine sont dissociées, et à 10g/l, toutes les protéines sont dissociées (99%).

**Tableau II-4: Taux de dissociation des protéines des gels pepsine et présure par le SDS (protéines dissociées/Protéines totalesX100)**

Concentration SDS (g/l)	Gel pepsine (Moy ± écart type)	Gel présure (Moy ± écart type)
0	26.41±2.07	26.41±2.07
2	50.65±3.04	41.07±2.56
4	81.48±5.65	81.52±5.59
6	94.28±3.76	92.12±3.85
8	97.10±1.08	94.69±1.11
10	99.35±0.18	99.35±0.35

L'effet du SDS sur le gel présure est comparable à celui de la coagulation pepsine (Figure II-3), où 81% des protéines sont dissociées pour une concentration de 4 g/l, et 99% pour une concentration de 10g/l.



**Figure II-3 : Dissociation des protéines en fonction de la concentration du SDS**

L'analyse de la variance des résultats obtenus, sur le gel pepsine et le gel présure, nous a permis de conclure qu'il existe une différence significative uniquement

pour la concentration du SDS de 2g/l ( $p=0.039$ ). Pour les autres concentrations il n'existe aucune différence significative entre la coagulation pepsine et la coagulation présure.

Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus par Lefebvre-Cases *et al.*, 1998 ,où 80% des protéines du gel présure sont dissociées à une concentration du SDS de 2g/l et 97% à 10g/l.

L'importante dissociation des protéines sous l'effet du SDS reflète la contribution des interactions hydrophobes dans la formation des deux types de gel. Il faut noter que la plupart des travaux sur le gel présure et notamment ceux de Walstra, (1990) ; Lefebvre-Cases *et al.*, (1998) ; Mellema *et al.*, (1999), Lucey *et al.*, (2003) et Keim et Hinrichs (2003), confirment le rôle des interactions hydrophobes lors de la formation et du maintien du gel. L'importance des interactions hydrophobes explique la faible agrégation, voire l'absence de floculation après action enzymatique, pour des températures inférieures à 15°C ; les liaisons hydrophobes ne peuvent pas se former aux basses températures (Dalgleish, 1997 ; Alais, 1974). Iametti *et al.*, (1993) ont démontré également la dominance des liaisons hydrophobes par l'utilisation de sondes hydrophobes à fluorescence lors de l'observation de la coagulation enzymatique du lait.

#### **II-4-2 Dissociation par l'urée et approche des liaisons hydrogènes**

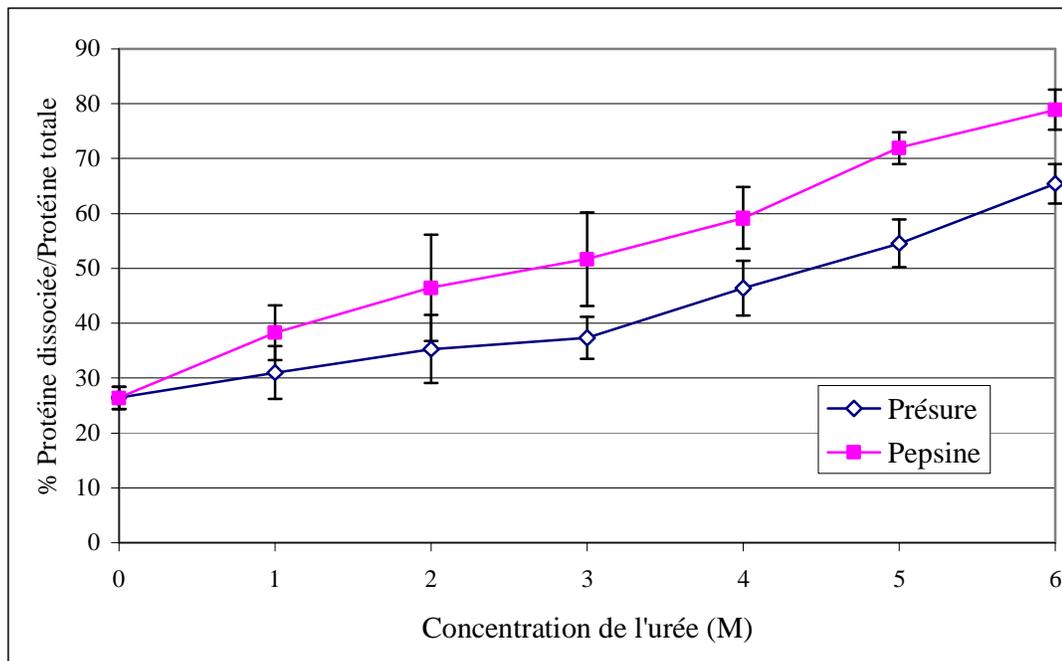
L'urée également, joue un rôle dissociant important sur le gel pepsine (Tableau II-5). Les résultats obtenus montrent que pour une concentration de l'urée de 1M le taux de dissociation est de 38%, ce taux augmente pour atteindre 52% à une concentration de 3M, et enfin pour une concentration de 6M, le taux de dissociation atteint 79%.

Nous constatons une faible dissociation du gel présure pour la même concentration de l'urée par rapport au gel pepsine. A une concentration de 1M, 31% des protéines du gel présure sont dissociées, à 3M, 37% sont dissociées et enfin à 6M, seulement 65% sont dissociées.

**Tableau II-5 : Taux de dissociation des protéines des gels pepsine et présure par l'urée (protéines dissociées/protéines totalesX100)**

Concentration d'urée (M)	Gel pepsine (Moy ± écart type)	Gel présure (Moy ± écart type)
0	26.41± 2.07	26.41± 2.07
1	38.29± 5.02	31.04± 4.77
2	46.45± 9.72	35.35± 6. ± 22
3	51.69± 8.49	37.35± 3.82
4	59.13± 5.63	46.40± 4.95
5	71.93± 2.90	54.56± 4.35
6	78.88± 3.62	65.42± 3.54

La dissociation par l'urée du gel pepsine semble différente de celle du gel présure (Figure II-4)



**Figure II-4 : Dissociation des protéines en fonction de la concentration de l'urée**

Les taux de dissociation du gel présure sont comparables à ceux rapportés par Lefebvre-cases *et al.*, 1998 où à une concentration de l'urée de 2M, 35% de protéines sont dissociées, et 64% pour une concentration de 6M.

La contribution des liaisons hydrogène dans le gel présure est confirmée par différents auteurs, notamment Keim et Hinrich, (2003) et Lucey (2003).

Le taux de dissociation des protéines sous l'effet de l'urée semble différent entre le gel pepsine et le gel présure, l'analyse de la variance montre une différence significative entre les deux types de gel (P=0.001).

Le taux de protéines dissociées du gel pepsine est nettement supérieur à celui du gel présure (78% contre 65% pour une concentration de l'urée de 6M), cette différence montre un taux de liaisons hydrogène plus important pour le gel pepsine, ce qui laisse supposer qu'il est beaucoup plus ferme que le gel présure.

#### **II-4-3 Dissociation par l'EDTA et approche des liaisons calciques**

Les essais réalisés avec des concentrations de l'EDTA de 2, 4 et 6mM, pour déterminer les ponts calciques impliqués dans les deux gels n'ont donné aucun résultat. La dissociation des deux gels pepsine et présure a donné respectivement 26% 25.90%. Ce taux est le même obtenu pour les solutions témoins sans agent dissociant. Aucune différence significative n'est remarquée lors de l'augmentation de la concentration de l'EDTA de 4 mM à 6mM (Tableau II-6).

**Tableau II-6 : Taux de dissociation des protéines par l'EDTA (%protéines dissociées/protéines totales)**

Concentration de l'EDTA (mM)	<b>Pepsine</b> (Moy ± écart type)	<b>Présure</b> (Moy ± écart type)
2	26.28±0.61	25.90±2.31
4	26.78±1.54	26.03±1.28
6	27.5±1.16	26.90±1.08

Selon Lefebvre-Cases et *al.*, (1998) une concentration de l'EDTA de 2mM provoque une dissociation de 76% des protéines alors que nos résultats ne donnent qu'un taux de 26%. Cette différence est probablement due à une concentration insuffisante en EDTA, et que le nombre de liaisons calciques est très important dans le gel. Une étude avec des concentrations beaucoup plus élevées est nécessaire pour confirmer la présence de ce type de liaisons.

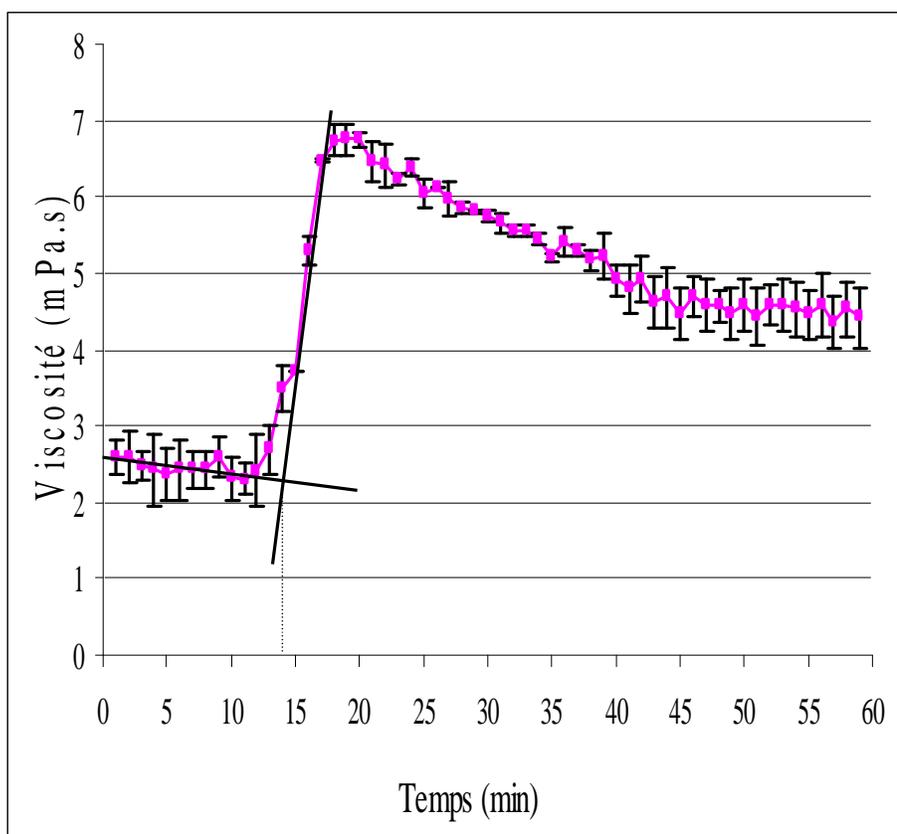
En conclusion, les résultats obtenus ont montré que les liaisons hydrophobe et hydrogène jouent un rôle important dans la formation et le maintien des gels pepsine et présure. Les interactions hydrophobes contribuent avec le même taux pour les deux types de gels, alors que la présence et le nombre de liaisons hydrogènes est plus importants dans le gel pepsine que le gel présure. Pour les liaisons calciques nos résultats nous ne permettent aucune conclusion.

## **II-5 Comparaison du comportement rhéologique**

### **II-5-1 Evolution de la viscosité au cours de la coagulation**

L'évolution des propriétés rhéologiques du lait a été suivie après addition de l'enzyme par la mesure de la viscosité apparente du lait ( $\eta$ ) en fonction du temps.

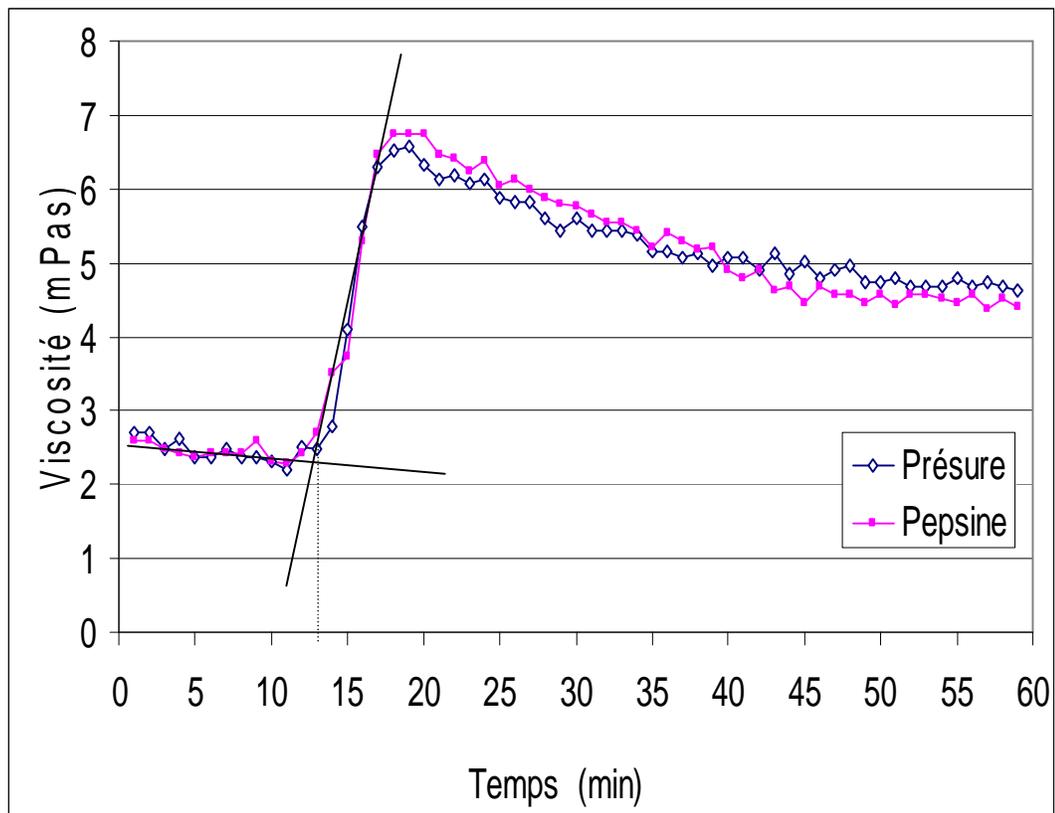
La figure II-5 représente l'évolution de la viscosité apparente du lait en fonction du temps au cours du processus de la coagulation par la pepsine de poulet pour une vitesse de cisaillement de  $380 \text{ sec}^{-1}$ .



**Figure II-5 : Evolution de la viscosité au cours de la coagulation pepsine**

La courbe obtenue fait apparaître trois phases distinctes, une première phase où nous pouvons remarquer une légère diminution de la viscosité de 2.58 mPa.s à 2.31 mPa.s à la douzième minute. La deuxième phase se distingue par une augmentation rapide de la viscosité jusqu'à la 18<sup>ème</sup> min où on enregistre la viscosité maximale d'environ 6.74 mPa.s. Ensuite, la courbe montre une diminution progressive de la viscosité pour atteindre 4.42mPa.s à la dernière minute.

La courbe de la coagulation présure a la même allure que la courbe de la coagulation pepsine et présente les mêmes phases, une phase de diminution de la viscosité de 2.62 à 2.21 mPa.s à la douzième minute, suivi d'une phase d'augmentation rapide de la viscosité jusqu'à 6.57 mPa.s, et enfin une phase de diminution jusqu'à 4.42mPa.s à la 60<sup>ème</sup> min (figure II-6).



**Figure II-6 : Comparaison de l'évolution de la viscosité au cours de la coagulation pepsine et présure**

La comparaison des deux courbes nous permet de signaler qu'à la première phase, nous remarquons une diminution comparable de la viscosité des gels pepsine et présure. Cependant, après 18min, la viscosité maximale du gel pepsine est supérieure à celle du gel présure (6.74 contre 6.57mPa.s). Nous pouvons noter également, qu'après 40min, la viscosité du gel pepsine devient inférieure à celle du gel présure.

Il faut noter qu'à partir de la 40<sup>ème</sup> minute nous remarquons une viscosité presque constante pour les deux gel à environ 4.6 mPa.s pour le gel présure et 4.4mPa.s pour le gel pepsine.

La courbe de l'évolution de la viscosité en fonction du temps nous permet de déterminer les paramètres principaux pour caractériser la coagulation. Ces paramètres sont d'une part, le temps de floculation ou le temps de transition solution-gel déterminé habituellement par la méthode de Berridge, et qui correspond ; selon O'Callaghan *et al.*,

(2000), au point où se croisent la droite de la diminution et celle l'augmentation de la viscosité correspondant à 14min (figure II-6). D'autre part ; le temps de prise correspondant au temps nécessaire pour atteindre la viscosité maximale ou la rigidité maximale du gel, et qui présente une grande importance pour déterminer le temps de coupe du gel en fromagerie.

La comparaison des deux courbes nous permet de conclure que pour le même temps de floculation qui est de 13 à 14 minutes, le gel pepsine et le gel présure ont le même comportement rhéologique. La viscosité diminue légèrement, puis augmente en fonction linéaire avec le temps jusqu'au temps de prise, et enfin, diminue progressivement lors de la dernière phase correspondant au début de la synérèse.

Nous pouvons également remarquer que le gel pepsine présente une viscosité maximale, pour un temps de 18min, légèrement supérieure à celle du gel présure indiquant une fermeté plus grande (différence significative au seuil de 5%).

L'allure générale de la courbe obtenue est en accord avec les résultats de Korolczuk et Maubois (1987). Ces auteurs ont observé les mêmes phases pour la coagulation présure. Ces auteurs précisent que lors de l'utilisation de méthodes destructives, l'augmentation maximale de la viscosité pour la coagulation présure est de 2.5 à 3fois la viscosité initiale, ce qui se rapproche de nos résultats (2.6 fois pour la pepsine et 2.4 fois pour la présure).

La légère diminution de la viscosité au début de la coagulation, est notée par toutes les études soit par méthode destructive ou en rhéologie dynamique oscillatoire non destructive. Cette diminution est expliquée par Tuinier et Kruif, (2002) par le degré de protéolyse lors de la phase enzymatique. En effet la viscosité diminue progressivement en fonction de l'hydrolyse de la  $\kappa$  caséine jusqu'à atteindre un minimum correspondant à 80% d'hydrolyse, au delà de ce taux, la viscosité tend à augmenter rapidement, cette même diminution a été obtenue lors de l'étude de la viscosité en fonction du rayon des micelles de caséine (Horne et Davidson, 1993).

Lors de la coagulation, le taux d'agrégation des micelles de caséine augmente rapidement, ce qui conduit à une augmentation rapide de la viscosité et de la rigidité du gel. Après un certain temps, la viscosité atteint son maximum, puis diminue progressivement.

Selon Korolczuk et Maubois (1987), durant la phase de l'augmentation de la viscosité, le taux de formation de nouvelles interactions est plus élevé que le taux de destruction par cisaillement. Quand le taux de formation des liaisons diminue, et devient plus faible que le taux de destruction, la viscosité apparente diminue. Il faut noter que le taux de destruction des liaisons est fonction de la vitesse de cisaillement.

Par ailleurs, il est important de noter que la méthode utilisée est une méthode destructive. Tant qu'il se trouve à l'état liquide, le lait a un comportement rhéologique du type Newtonien et le système n'est pas perturbé par la déformation qui lui est appliquée, par contre, dès que les propriétés viscoélastiques du gel apparaissent, le cisaillement provoque des modifications irréversibles et les interactions créées lors de la coagulation sont partiellement détruites par le cisaillement des cylindres coaxiaux.

L'utilisation de méthodes non destructives (rhéomètre oscillatoire), montre l'augmentation rapide de la viscosité jusqu'à un maximum et reste constante sans la phase de diminution qu'on note par la méthode destructive au delà de 60min (Schultz *et al.*, 1997 ; De Kruif, 1999 ; Lehner *et al.*, 1999 ; O'Callaghan *et al.*, 2000).

La différence de la viscosité maximale du gel pepsine est en accord avec la différence notée des interactions hydrogènes. L'étude des interactions impliquées dans la formation des deux gels a montré le même taux de liaisons hydrophobes et un taux supérieur de liaisons hydrogènes, ce qui peut conduire à conclure que le gel pepsine est légèrement plus ferme que le gel présure.

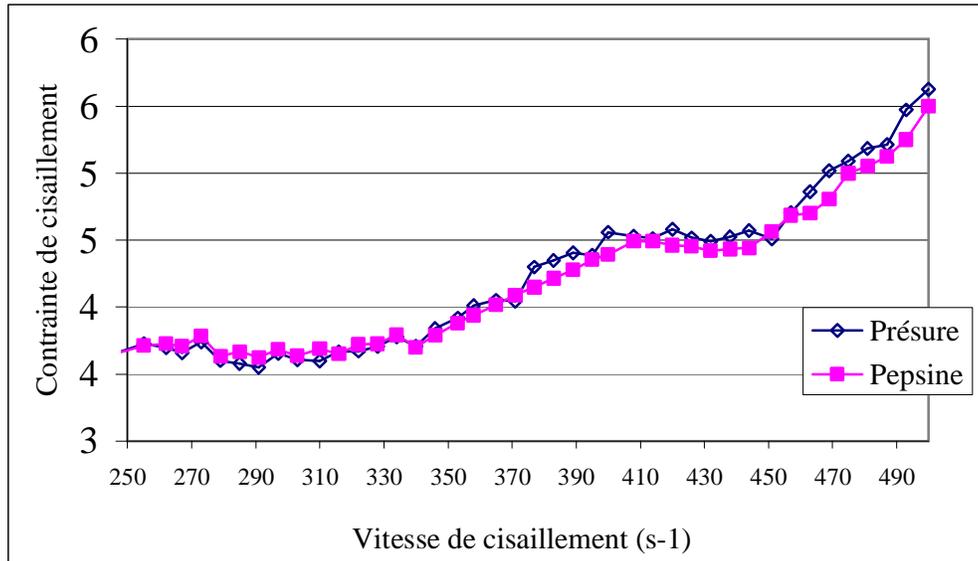
Cette étude doit être suivie et vérifiée par l'étude du caractère viscoélastique et la détermination de la fermeté des deux gels par des méthodes rhéologiques non destructives, afin de faire ressortir les caractères visqueux et élastique, et distinguer les différences entre le gel pepsine et le gel présure.

## II-5-2 Courbes d'écoulement et de viscosité du gel

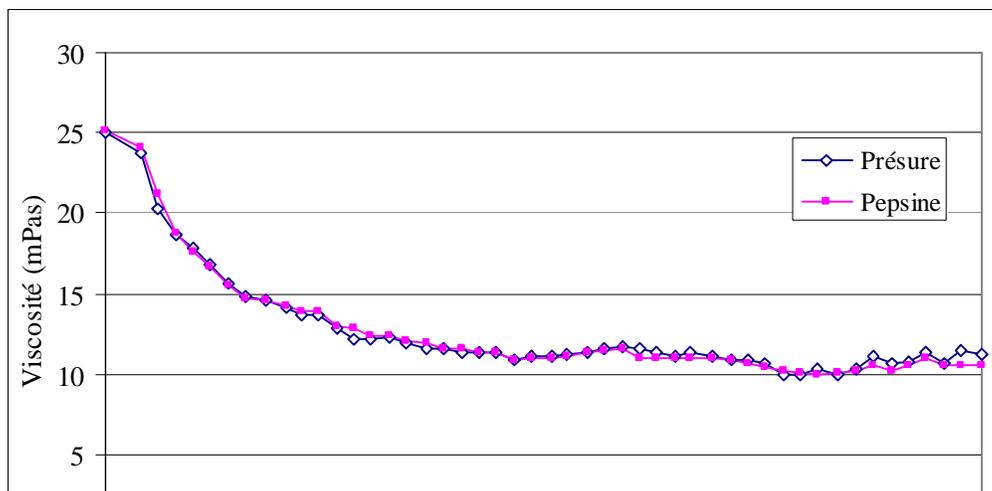
La corrélation entre le gradient de cisaillement ( $\gamma$ ) et la contrainte ( $\tau$ ) définit la courbe d'écoulement. La détermination de la courbe d'écoulement et celle de viscosité permet de connaître le type du gel.

Les courbes d'écoulement des gels pepsine et présure sont représentées dans la figure II-7, les courbes de viscosité sont représentées dans la figure II-8.

Les courbes d'écoulement et de viscosité du gel pepsine montrent un comportement non newtonien de type rhéofluidisant, à caractère pseudoplastique.



*Figure II-7 : Courbes d'écoulements des gels pepsine et présure*



**gure III-10 : Courbe de viscosité des gels pepsine et présure**

**Figure II-8 : Courbe de viscosité des gels pepsine et présure**

Le modèle rhéologique qui caractérise ces écoulements est de type Ostwald-de-Waels dont l'équation est de  $\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$ . où k est l'indice de consistance, et n l'indice de comportement de l'écoulement. Les paramètres de chaque écoulement sont donnés dans le tableau II-7.

**Tableau II-7 : Paramètres rhéologiques des écoulements du gel pepsine et présure**

	K	n	R
Gel pepsine	0.0814	0.6648	0.91
Gel présure	0.0838	0.6625	0.92

R : coefficient de corrélation

Le gel présure montre le même caractère viscoélastique rhéofluidisant caractéristique des gels en général, ce même comportement est rencontré pour les gels acides (Beal *et al*, 1999). Les fluides rhéofluidisants sont caractérisés par la diminution de la viscosité lorsque la vitesse de cisaillement croit (Couarraze et Grossiord, 1991). Ce phénomène est expliqué par le fait qu'au repos ces gels présentent un ordre interne caractérisé par la présence d'un certain type et de nombre d'interactions (principalement hydrophobes et hydrogènes) qui maintiennent la structure tridimensionnelle du réseau gélifié et donc une viscosité élevée. Lors de l'augmentation du gradient de vitesse, les interactions sont rompues, le réseau détruit et par conséquent la viscosité diminue (Rohm et Jarros, 2002 ; Scher, 2006).

## II-6 Etude de la synérèse

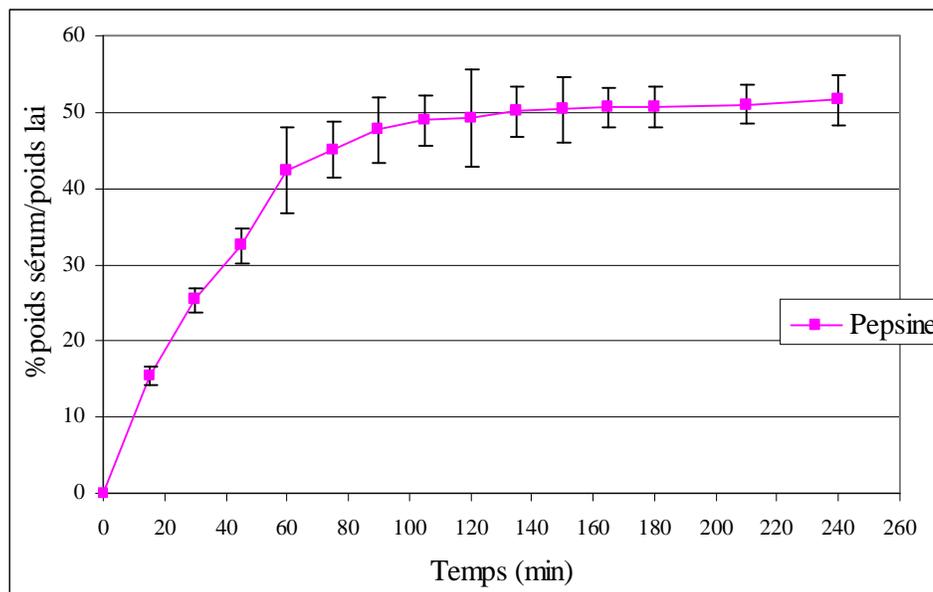
La synérèse est l'expulsion spontanée du lactosérum sous l'effet des forces internes de contraction du gel.

Nous avons essayé de déterminer la cinétique de la synérèse pour la coagulation pepsine et la comparer à celle de la présure pour un temps de floculation (TF) de 15min.

Afin de déterminer l'effet de la concentration de la pepsine et par conséquent le temps de floculation, nous avons étudié la cinétique de la synérèse pour la coagulation pepsine à un temps de floculation (TF) de 8, 15 et 30min.

### II-6-1 Cinétique de la synérèse

La cinétique de la synérèse de la coagulation pepsine est représentée dans la figure II-9. Les résultats sont présentés en poids du sérum/poids initial du lait en fonction du temps.

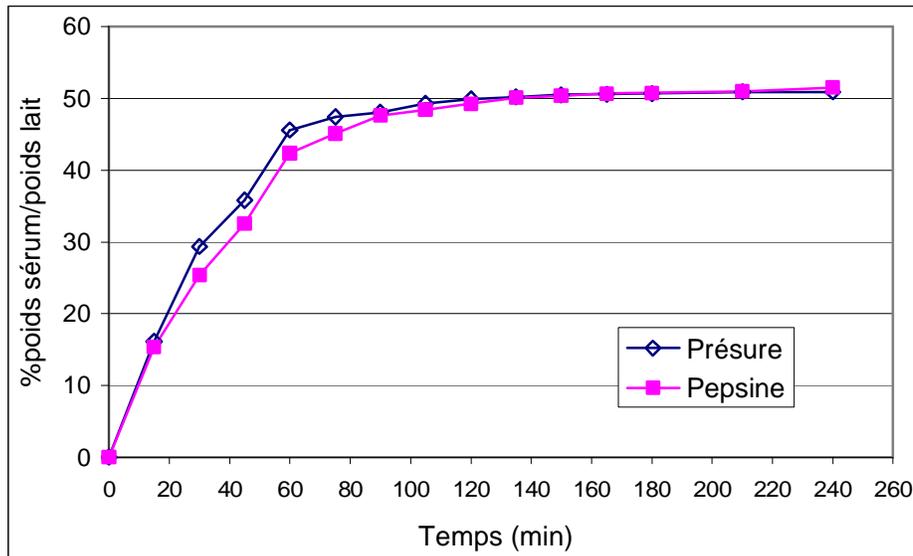


**Figure II-9 : Cinétique de la synérèse (Coagulation pepsine, TF 15min)**

La cinétique d'exsudation pour la coagulation pepsine présente deux phases distinctes, la première phase correspond à une phase d'expulsion rapide du lactosérum, avec un taux d'exsudation de 49%, cette phase dure environ 120 min. La deuxième phase est très lente et peut être considérée comme un pallier, l'analyse de la variance

nous permet de conclure qu'il n'existe pas de différence significative à partir de la 120<sup>ème</sup> min ( $P=0.78$ ). Le taux final de l'exsudation atteint 51%.

La comparaison de la cinétique entre la coagulation pepsine et la coagulation présure pour un temps de floculation de 15 min est représentée dans la figure II-10.



**Figure II-10 : Comparaison de la cinétique de la synérèse pour la coagulation pepsine et présure (TF 15min).**

L'allure de la courbe de présure est identique à celle de la coagulation pepsine, et présente les mêmes phases, avec les mêmes taux d'exsudation. La différence notée entre les deux courbes pour les temps entre 20 et 80 min est non significative.

Le profil des courbes de variation de l'exsudation en fonction du temps est le même pour les deux enzymes. La cinétique présente deux phases : la première correspond à une phase rapide dont la durée est d'environ 1 heure ; la deuxième, beaucoup plus lente, lui succède montrant un pallier à partir de la deuxième heure jusqu'au-delà de 3 heures.

L'allure générale de la cinétique de synérèse du gel présure est comparable à celle obtenue par différents auteurs dont Lucey, 2001 ; Daviau *et al.*, 2000 ; Calvo et Balcones, 2000 ; Walstra *et al.*, 1985 cités par Renault, 1996.

## II-6-2 Effet de la concentration de l'enzyme sur la cinétique de synérèse

La comparaison de la cinétique de la synérèse pour la coagulation pepsine, pour des temps de floculation différents est présentée dans la figure II-11.

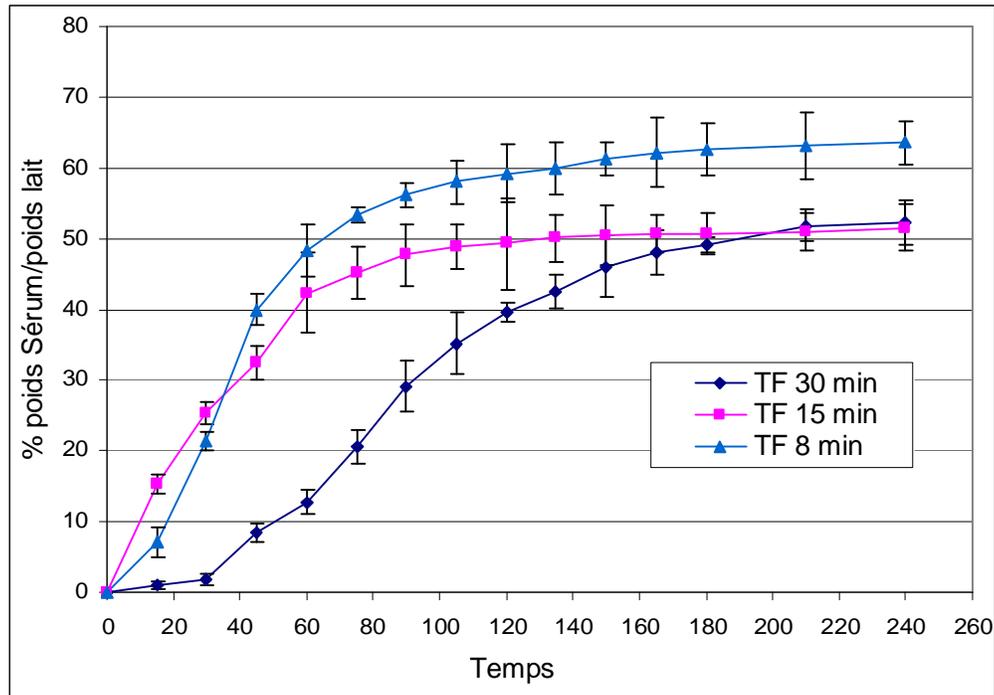
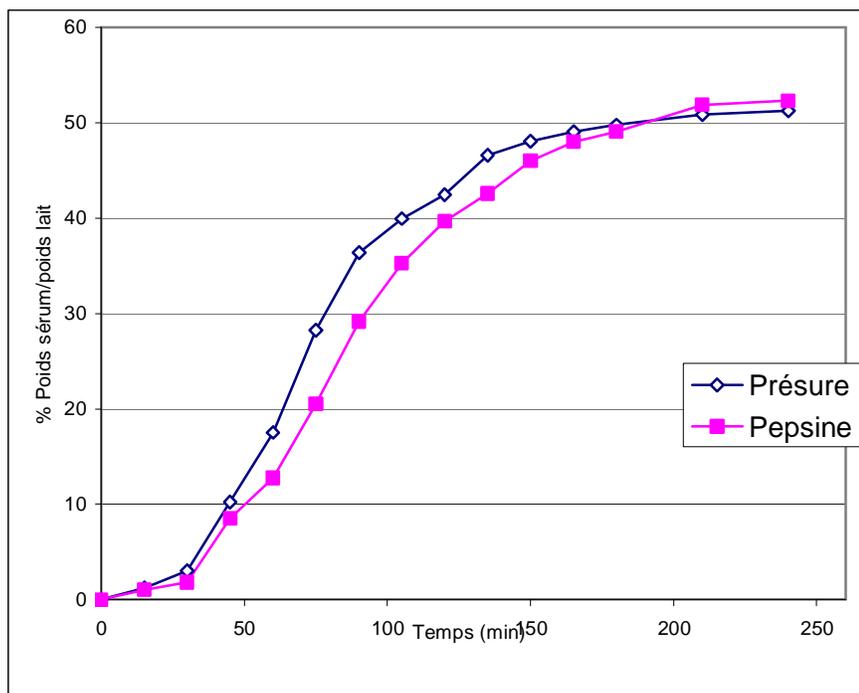


Figure II-11 : Cinétique de la synérèse (Coagulation pepsine)

La concentration enzymatique et par conséquent le temps de floculation, joue un rôle très important lors de la synérèse. Nous pouvons remarquer que la cinétique de la synérèse diffère sensiblement avec le temps de floculation.

Pour le temps de floculation de 30min soit une concentration de pepsine de 1.2% (v/v), le taux d'exsudation est très faible lors de la première heure et ne dépasse pas le taux de 12.75%, alors qu'il atteint 42% pour le temps de floculation de 15 min. L'augmentation reste faible et n'atteint que 39% après deux heures contre 49% pour le gel de 15min de temps de floculation. Le palier est atteint après 165 min à un taux de

51%. Le taux final de la synérèse est de 51% pour les deux temps de floculation.



**Figure II-12 : Cinétique de synérèse pour la coagulation pepsine et présure (TF 30 min)**

La figure II-12 montre la cinétique de synérèse des deux types de gel pour un temps de floculation de 30min. On peut remarquer que les deux courbes montrent la même allure, cependant nous constatons une différence significative ( $P=0.044$ ) entre les deux cinétiques à partir de la première heure jusqu'à la 150<sup>ème</sup> minute. Au-delà les deux courbes ne présentent plus aucune différence. Il faut signaler que le taux de synérèse final est de 51% pour les deux enzymes.

Pour le temps de floculation de 8 min, soit une concentration de pepsine de 2.5% (v/v), nous avons constaté que le taux d'exsudation était inférieur à celui du temps de 15 min lors des 30 premières minutes de synérèse. Au-delà des 30 min, la vitesse devient supérieure, et le taux atteint 48% à la première heure et 59% à la deuxième heure. Le pallier est atteint à partir de 160min à un taux de 63%.

Le taux final de synérèse de 63% après 160min, est comparable à celui rapporté par Calvo et Balcones, (2000), qui était de 65% atteint après 160min, pour la coagulation présure et dans les mêmes conditions de pH et de température et de temps de floculation.

Selon Fox et MacSweeney, (2004), le taux final de la synérèse dépend de plusieurs facteurs dont la température, le pH et la nature et la concentration de l'enzyme utilisée.

Selon Lucey, (2002)<sup>b</sup> la tendance des gels à expulser le lactosérum est reliée au réarrangement des liaisons internes du réseau gélifié, qui provoque une forte pression interne et expulse les gouttelettes du lactosérum à l'extérieur du réseau, donc la forte tendance à la synérèse du gel préparé avec un temps de floculation de 8min, doit avoir un plus grand nombre d'interaction et par conséquent plus de fermeté que les autres types de gel.

En conclusion, nous pouvons dire que pour le même pH du lait ; la même température, il existe des différences significatives entre la cinétique de la synérèse pour des concentrations d'enzymes différentes.

Une étude des interactions impliquées dans le maintien des gels est nécessaire pour les différents temps de floculations, cela permettra de confirmer l'importance de chaque type d'interaction et son influence sur le comportement rhéologique et l'évolution de la synérèse des différents gels.

## **II-7 Capacité de rétention d'eau**

La capacité de rétention d'eau correspond à la quantité d'eau retenue dans la matrice du gel après centrifugation.

Nous avons déterminé la capacité de rétention d'eau pour le gel pepsine et le gel présure, les résultats sont donnés dans le tableau II-8.

**Tableau II-8 : Capacité de rétention d'eau pour le gel pepsine et présure**

Enzyme	WHC (%)
Pepsine	50.34±1.34
Présure	48.833±2.90

L'analyse de la variance n'a montré aucune différence significative ( $P=0.46$ ) entre la capacité de rétention d'eau de la pepsine et celle de la présure.

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Pandey *et al.*, 2000, où ils donnent des capacités de rétention d'eau pour la coagulation présure de 50%. Ces résultats sont caractéristiques des gels très hydratés.

La capacité de rétention d'eau d'un gel protéique est dépendante des interactions existant dans le réseau et des réarrangement qui modifient la structure du gel au cours de sa formation (Banon et Hardy, 2002 ; Blond et Le Meste, 1988). Ces interactions sont également responsables du taux d'expulsion du lactosérum lors de la synérèse. Le taux d'hydratation final d'un gel est donc, directement lié aux différentes interactions impliquées dans la formation et le maintien de ce type de gel.

# *Conclusion générale*

## Conclusion Générale

Cette étude a été entreprise dans le but de contribuer à la possibilité de substitution de la présure par la pepsine de poulet lors de la coagulation du lait.

Pour atteindre cet objectif, nous avons été emmené à réaliser l'extraction de la pepsine de poulet à partir du proventricule et de caractériser l'extrait enzymatique obtenu.

En deuxième étape, nous avons tenté d'approcher la phase primaire de la coagulation, en déterminant la cinétique de protéolyse par la pepsine de poulet. L'estimation du type d'interactions impliquées dans la formation et le maintien du gel, et l'étude du comportement rhéologique lors de la coagulation nous ont permis de caractériser le gel préparé par la pepsine de poulet et de le comparer à celui préparé par la présure.

En troisième étape, nous avons essayé de comparer la cinétique de la synérèse et la capacité de rétention d'eau du gel pepsine et présure.

L'extraction de la pepsine de poulet a permis de donner à partir de 100g de proventricule 250ml d'extrait enzymatique, donnant un temps de floculation de 41 sec et une activité coagulante de 2.42 U.A.C./ml. Pour obtenir un temps de floculation compris entre 12 et 15 min l'extrait doit être dilué à raison de 1.65%.

La cinétique de la protéolyse suivie par la libération d'azote non protéique, a permis de montrer une augmentation du taux d'NPN/NPN0 jusqu'à la floculation à 16.10% (contre 20.7% pour la présure), et une stabilisation après 20min à un taux de 17.38% (contre 23.93% pour la présure).

Pour la durée étudiée (55min), la protéolyse engendrée par la pepsine, et exprimée par le NPN libéré, semble plus faible que celle de la présure pour des forces de coagulation équivalentes.

L'étude des interactions approchée par l'utilisation d'agents dissociants, a permis de montrer l'importance des interactions hydrophobes et hydrogènes dans la

formation et le maintien du gel pepsine. Les interactions hydrophobes, dissociées par le SDS, semble d'un même niveau dans le gel pepsine et le gel présure. Par contre, les liaisons hydrogènes, dissociées par l'urée, semblent contribuer d'une façon plus importante dans le gel pepsine. L'approche des ponts calciques par l'EDTA, n'a pas permis, dans nos conditions de travail, de distinguer les deux gels.

L'étude rhéologique, menée avec le système destructif des cylindres coaxiaux, a permis de montrer l'évolution du caractère visqueux lors de la coagulation. Nous avons remarqué, une légère diminution de la viscosité avant la floculation visible à l'oeil nu, due essentiellement à la destruction de la  $\kappa$  caséine, suivie d'une phase caractérisée par l'augmentation rapide de la viscosité due à la formation de nouvelles liaisons dans le réseau protéique lors de la gélification. Après formation du gel, la viscosité atteint un maximum puis tend à diminuer à cause de la destruction du gel. Le gel présure présente le même comportement rhéologique que le gel pepsine.

L'étude du comportement rhéologique par des méthodes non destructives permettant la détermination du caractère viscoélastique du gel est indispensable pour la caractérisation de l'évolution du comportement rhéologique du gel.

La détermination de la courbe d'écoulement et de viscosité a permis de spécifier la nature du gel. Le gel pepsine semble être un gel de type rhéofluidisant à caractère pseudoplastique, où la viscosité diminue lorsque la vitesse de cisaillement croît ; ce phénomène est expliqué par le fait, qu'au repos, le gel présente un ordre interne caractérisé par la présence d'un certain type et de nombre d'interactions (hydrophobes et hydrogènes) et une viscosité élevée, l'augmentation du gradient de vitesse, perturbe et rompt ces interactions et le réseau est détruit, ce qui se traduit par la diminution de la viscosité. Le gel présure montre le même comportement que le gel pepsine.

L'étude de la synérèse pour des coagulations pepsine et présure ayant le même temps de floculation, a permis de montrer que la cinétique d'exsudation présente deux phases distinctes, la première correspond à une phase rapide et atteint après 1 heure, pour la coagulation pepsine et présure, un taux de 49% ; la deuxième phase est très lente et présente un plateau à partir de la troisième heure. Le taux final de l'exsudation, pour les deux enzymes, est de 51%.

La concentration enzymatique de la pepsine de poulet, et donc le temps de floculation, affectent considérablement la cinétique de synérèse. Un temps de floculation de 30 min, présente une cinétique avec une vitesse très réduite lors de la première phase qui dure deux heures, le pallier est atteint à partir de la troisième heure. Le taux final est de 51%.

Un Temps de floculation de 8 min, présente une cinétique assez différente avec une première phase très rapide, avec un taux d'exsudation qui atteint après une heure 49%. Le pallier est atteint à partir de la troisième heure avec un taux final de 63%.

La capacité de rétention, étudiée pour un temps de floculation des deux enzymes de 15min à 30°C ; est de 48% pour le gel pepsine, contre 50% pour le gel présure. Cette capacité de rétention d'eau montre un taux d'hydratation assez élevé des deux gels.

Enfin, nos résultats ne décèlent aucun inconvénient à substituer la présure par la pepsine de poulet lors de la phase de coagulation. Au contraire, nous avons remarqué certains avantages tels que la protéolyse réduite lors de la première heure de la coagulation, et un nombre d'interactions hydrogènes plus important indiquant une fermeté supérieure du gel. Cependant, il est nécessaire de signaler que la phase de coagulation n'est que la première étape de la fromagerie. Des problèmes causés par l'utilisation de la pepsine de poulet peuvent survenir lors des étapes ultérieures, et notamment lors de l'affinage et la conservation des fromages (Gordin et Rosenthal, 1978 ; Green 1984).

L'ensemble des résultats auxquels a abouti notre étude constitue une première évaluation de la caractérisation de la phase de coagulation lors de la substitution de la présure par la pepsine de poulet. En perspective, il est intéressant de poursuivre cette étude, notamment les points suivants :

- Détermination du rendement et du coût de l'extraction de la pepsine de poulet
- Détermination des produits de la protéolyse par électrophorèse lors de la phase de coagulation et la phase d'affinage des fromages

- Détermination du comportement rhéologique du gel par des méthodes non destructives permettant la détermination des caractères visqueux et élastique
- Confirmation des différences constatées au niveau des interactions hydrogènes pour le gel pepsine et cela par la détermination de la fermeté du gel
- Détermination de la contribution des liaisons calciques pour les deux types de gels
- Détermination des conditions optimales, de pH, de température pour obtenir les meilleures caractéristiques du gel (fermeté, taux de synérèse...etc.)
- Détermination du type de fromage où la pepsine de poulet pourrait substituer la présure sans modifications des caractères organoleptiques
- Détermination du rendement fromager.

# *Liste Bibliographique*

## Liste bibliographique

- **Alamareot J. (1982)**  
Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaire, édition du point vétérinaire-Alfort 1982  
289p.
- **Alais C. (1974)**  
Science du lait principes des techniques laitières. 3<sup>ème</sup> édition 807P
- **Alais C. et linden G. (1997)**  
Abrégé de biochimie alimentaire. 4<sup>ème</sup> édition. Sepaic Paris 248P
- **Amiot J., Fournier S., Leboeuf Y., Paquin P. et Simpson R. (2002)**  
Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait pp , in Science et technologie du lait transformation du lait coordonnateur Vignola C.C, Fondation de technologie laitière du Québec 395P
- **Andren A. (2002)**  
Rennets and coagulants pp281-286 in Encyclopedia of Dairy Science. Roginski H., Fuquay J. Fox P. Elsevier
- **Andren A. and de Koning P.-J. (1982)**  
Changes in immunologically and enzymatically active centres of some milk clotting enzymes, in Utilisation des enzymes en technologies alimentaires, Dupy P., Tech et Doc 1982 p 275-280
- **Anifantakis E. (1976)**  
Influence d'une présure d'agneau sur la qualité du fromage Kefalotyri, Le lait Jan-Fév 1976 N° 551-552 p76-83
- **Ay C. and GunasekaranS. (1994)**  
Ultrasonic attenuation measurement for estimating milk coagulation time, American society of agricultural engineers Vol. 37(3): 857-862
- **Banon S. Hardy J. (2002)**  
L'eau dans les produits laitiers in L'eau dans les aliments Coord. Le Meste M., Lorient D., Simatos D., pp235-258, Edition Tec. et Doc. Lavoisier 674P
- **Barbano D.M. and Rasmussen R.R., (1992)**  
Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. J Dairy Sci. 75 : 1-12
- **Beal C., Skokanova J., Latrille E., Martin N. and Corrieu G. (1999)**  
Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. J Dairy Sci. 82 673-681
- **Berridge N.J. (1955)**

Purification and assay of rennin. Methods in enzymologie volume 2 pp 69-77 Ed., Perlmann G.E. and Lorand L , Acad.Press Inc., New York

**- Blond G. et Le Meste M., (1988)**

Propriétés d'hydratation des macromolécules. Relation avec leurs propriétés fonctionnelles pp 11-31 *in* Propriétés fonctionnelles des macromolécules alimentaires. Coord. Lorient D., Colas B. et Le Meste B., Les cahiers de l'ENS.BANA N°6 268P.

**- Bernahrd S.A. (1969)**

Structure et fonction des enzymes. Ediscience université d'Oregon PP 456

**- Bohak Z. (1970)**

Chicken pepsinogen and chicken pepsin *in* Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes. Ed., Perlmann G.E. and Lorand L , Acad.Press Inc., New York Volume 19, pp347-358, 1042 P.

**- Bohak Z. (1969)**

Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin, The journal of Biological chemistry Vol. 244, N° 17 Sept 1969 PP 4638-4648

**- Bolmstedt U. (2000)**

Viscosity and Rheology, theoretical and practice considerations in liquid food processing. NewFood Volume 3 Issue 2, 127-132.

**- Brulé G. et Lenoir J. (1987)**

La coagulation du lait *in* Le Fromage A. Eck 2<sup>ème</sup> édition Tech. et Doc.

**- Calvo M.M. Balcones E. (2000)**

Some factors influencing the syneresis of bovine, ovine and caprine milks. J Dairy Sci 83: 1733-1739

**- Cayot P.H. et Lorient D. (1998)**

Structures et technofonctions des protéines du lait. ARILAIT Recherches. Tec et Doc Lavoisier

**- Cheftel J.-C., Cuq J. L. et Lorient D. (1985)**

Protéines alimentaires : Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle et modifications chimiques. Tec et Doc. Lavoisier

**- Collin J.-C., Muset de Retta G., Martin P. (1982)**

Analyse qualitative des enzymes coagulantes utilisées en fromagerie, *in* Utilisation des enzymes en technologie alimentaire, Dupy P. Tech et Doc 1982 p159-163

**- Couarraze G. et Grossiord J.L. (1991)**

Initiation à la rhéologie. 2<sup>ème</sup> édition Tec et Doc Lavoisier 272P

- **Creamer L.K., Plowman J.E., Liddel M.J., Smith M.H. and Hill J.P. (1998)**  
Micelle stability :  $\kappa$ -casein Structure and function. J Dairy Sci 81 : 3004-3012
  
- **Cuvellier G.F. (1993)**  
Production des enzymes *in* Biotechnologie. Coord Scriban R. 4<sup>ème</sup> édition Tec. et Doc. Lavoisier PP948
  
- **Dalgleish D.G. Spagnuolo P.A. Goff H.D. (2004)**  
A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. International dairy journal 14 (2004) 1025-1031
  
- **Dalgleish D.G. (1998)**  
Casein micelles as colloids : Surface, structure and stabilities. J Dairy Sci. 81: 3013-3018
  
- **Dalgleish D.G. (1997)**  
The Enzymatic coagulation of milk. in Advanced Dairy Chemistry VI Proteins. P.F. Fox Blackie and son Ltd. P579-619.
  
- **Dalgleish D.G. and Holt C. (1988)**  
A Geometrical model to describe the initial aggregation of partly renneted casein micelles. Journal of colloid and interface science, vol 123, N° 1, May 1988.
  
- **Dalgleish D.G. (1982)**  
The Enzymatic coagulation of milk in Developpements in Dairy Chemistry-1 Proteins. P.F. Fox Applied Science Publishers p157-186
  
- **Daviau C., Famelart M.-H., Pierre A., Goudédranche H. and Maubois J.-L. (2000)** Characterisation of whey drainage kinetics during soft cheese manufacture in relation with the physicochemical and technological factors, pH at renneting, casein concentration and ionic strength of milk. Lait 80 (200) 417-432
  
- **Daviau C., Famelart M.-H., Pierre A., Goudédranche H. and Maubois J.-L. (2000)** Rennet coagulation of skim milk and curd drainage : Effect of PH, casein concentration, ionic strength and heat traitement. Lait 80(2000) 397-415
  
- **De Kruif C.G. (1999)**  
Casein micelles interactions. International Dairy Journal 9 (1999) 183-188
  
- **De kruif C.G. (1998)**  
Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation j Dairy Sci. 81: 3019-3028
  
- **De Kruif C.G. and May R.P. (1991)**  
 $\kappa$ -Casein micelles: structure, interaction and gelling studied by small-angle neutron scattering. Eur. J. Biochem. 200, 431-436 (1991)

- Desmazeaud M. (1997)**  
Les enzymes utilisées en industrie laitières PP582-602 in Lait et produits laitiers coord. Luquet F.M. Tech et Doc Lavoisier
- Dickinson E., Eliot C. (2003)**  
Aggregated casein gels : interactions, rheology and microstructure. 3<sup>rd</sup> International Symposium on food rheology and structure.
- Donta S.T. and Van Vunakis H. (1970)**  
Chicken pepsinogens *in* Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes. Ed., Perlmann G.E. and Lorand L , Acad.Press Inc., New York Volume 19, pp 358-363, 1042 P.
- Drohse H.B, Foltmann B. (1989)**  
Specificity of milk clotting enzymes towards bovine k-casein. Biochimica et Biophysica acta, 995 (1989) 221-224
- Emmon D.B., Dubé C. and Modler H.W. (2003)**  
ADSA, Transfer of protein from milk to cheese. J. Dairy Sci. 86: 469-485
- Emmon D.B. and Beckett D.C. (1990)**  
Milk clotting enzymes. 1. Proteolysis during chese making in rela4ion to losses of yield. J Dairy Sci. 73: 2007-2015
- Emmon D.B. and Binns M. (1990)**  
Cheese yield experiments and proteolysis by milk clotting enzymes. J Dairy sci 73: 20228-2043
- Ernstrom C.A. (1983)**  
Milk clotting enzymes and their action in fundamentals of dairy chemistry. Webb B.H., AH. Johnson and J.A. Alford . The Avi Publishing company Inc. 2<sup>nd</sup> Edition. PP 663-718
- Federici F. (1982)**  
Comparative study of some properties of a new milk-coagulating enzyme and two commercial rennets, in Utilisation des enzymes en technologie alimentaire, Dupy P., Tech et Doc 1982 p 281-285 ; 555P
- Fox P.F. and McSweeney P.L.H. (2004)**  
Cheese : An Overview *in* Cheese : Chemistry, physics and microbiology. Third edition- Volume 1 : General aspects p1-18 Elsevier.
- Fox P.-F. (1989)**  
The milk protein system in Developpements in dairy chemistry Functional milk proteins pp1-53 Elsevier science publishers

**- Fox P.-F. (1982)**

Exogenous enzymes in dairy technology, in Utilisation des enzymes en technologie alimentaire, Dupy P. Tech et Doc 1982 p135-157

**- Gastaldi E. (1994)**

Etude de l'évolution des micelles de caséine au cours de l'acidification : mise en évidence d'un état de transition entre pH 5.5 et pH 5.0. Thèse de Docteur Université Montpellier II .

**- Gordin S. and Rosenthal I. (1978)**

Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. Journal of food protection September Vol. 41 N° 9 (684-688).

**- Gourseaud J. (1999)**

Réacteurs enzymatiques à enzymes libres et à enzymes immobilisées, cas de l'industrie laitière : coagulation enzymatique du lait in Biotechnologie Scriban R. 1999, 5<sup>ème</sup> édition Tech et Doc 1999.

**- Green M.L. Valler M.J. Kay J. (1984)**

Assesment of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparations. Journal of dairy research (1984), 51, 331-340.

**- Guthy K.L. et Novak G. (1977)**

Observations on the primary phase of milk coagulation by rennet under standardized conditions, Journal of dairy research Vol 44 N°2 June 1977 p363-366

**- Horne D.S. (2002)<sup>a</sup>**

Caseins, micellar structure pp1902-1909 in Encyclopedia of Dairy Science. Roginski H., Fuquay J. Fox P. Elsevier

**- Horne D.S (2002)<sup>b</sup>**

Casein structure, self- assembly and gelation. Current Opinion in Colloids and Interface Science 7(2002) 456-461

**- Horne D.S. (1998)**

Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. Int. Dairy journal 8 (1998) 171-177.

**Horne D.S. and Davidson C. M. (1993)**

Direct observation of decrease in size of casein micelles during the initial stages of renneting of skim milk. Int. Dairy Journal 3 (1993) 61-71

**- Hardy J. (1987)**

Les propriétés organoleptiques du fromage in Le Fromage A. Eck 2<sup>ème</sup> édition Tech. et Doc.

- **Keim S., Hinrichs J. (2003)**  
Rheological characteristics of milk protein gels – influence of stabilising bonds. 3<sup>rd</sup> International Symposium on food rheology and structure.
- **Korolczuk J. and Maubois J.-L. (1987)**  
Computerized vicometric method for studying rennet coagulation of milk. Journal of texture studies 18 (1987) 157-172
- **Lablee J. (1987)**  
Les erreurs de techniques de coagulation et égouttage in Le Fromage A. Eck 2<sup>ème</sup> édition Tech. et Doc 539 P.
- **Larbier M et Leclerc B. (1992)**  
Nutrition et alimentation des volailles : physiologie digestive. INRA Paris 1992.
- **Lefebvre-Cases E., Gastaldi E., Vidal V., Marchesseau S., Lagarde A., Cuq J.-L. and Tarodo de la Fuente B. (1998)**  
Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. J. Dairy Sci 81: 932-938
- **Lehner D., Worning P., Fritz G., Ogendal L., Bauer R. and Glatter O. (1999)**  
Characterization of enzymatically induced aggregation of casein micelles in natural concentration by in situ static light scattering and ultra low shear viscosimetry. Journal of Colloids and Interface Science 213, 445-456(1999)
- **Le Meste M., Colas B. (1990)**  
Interactions entre l'eau et les constituants alimentaires : incidences sur les propriétés structurales in L'eau dans les procédés de transformations et de conservations des aliments Coord. Le Meste M. et Colas B. Les cahiers de l'ENS.BANA N°7 Tec. Et Doc. Lavoisier 277P
- **Lenoir J., Schneid N. (1987)**  
L'aptitude du lait à la coagulation par la présure in Le Fromage A. Eck 2<sup>ème</sup> édition Tech. et Doc.
- **Lenoir J.N., Veisseyere R. (1987)**  
Coagulation du lait par la présure et correction des laits de fromagerie in La lait matière première de l'industrie laitière CEPIL, INRA.
- **Lodaite K., Ostergren K., Paulson M. and Dejmek P. (2000)**  
One dimensional syneresis of rennet-induced gels. International Dairy Journal 10 (2000) 829-834
- **Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., (1951)**  
Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- **Lucey J.A. (2004)**  
Cheese : An Overview. Cheese chemistry, physics and microbiology, 3rd edition, Vol 1 General aspects Elsevier.
- **Lucey J.A., Johnson M.E. Horne D.S. (2003)**  
ADSA invited review : perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. J. Dairy Sci. 86 : 2725-2743
- **Lucey J.A. (2002)<sup>a</sup>**  
Rennet coagulation of milk pp286-293 *in* Encyclopedia of Dairy Science. Roginski H., Fuquay J. Fox P. Elsevier
- **Lucey J.A. (2002)<sup>b</sup>**  
ADSA Foundation Scholar Award, Formation and physical properties of milk protein gels. J. Dairy Sci. 85, 281-294
- **Lucey J.A. (2001)**  
The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. Food Hydrocolloids 15 (2001) 603-608
- **Lucey J.A. Singh H. (1998)**  
Formation and physical properties of acid milk gels : a review. Food research international, Vol 30 N° 7 pp529-542
- **Lucey J.L. Fox P.F. (1993)**  
Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. J. Dairy Sci 76: 1714-1724
- **MacKinlay A.G. and Wake R.G. (1971)**  
 $\kappa$ -Casein and its attack by rennin (chymosin) pp175-212 *in* Milk proteins chemistry and molecular biology. Edited by H.A McKenzie. Volume II Academic press
- **McKenzie H.A. and Murphy J. (1971)**  
Chemical methods in the characterization of milk protein pp125-178 *in* Milk proteins chemistry and molecular biology. Edited by H.A McKenzie. Volume II Academic press
- **McMahon D.J. and McManus W.R. (1998)**  
Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. J dairy Sci. 81: 2985-2993
- **McMahon D.J. and Brown R.J. (1990)**  
Developpement of surface functionality of casein particles as the controlling parameter of enzymic milk coagulation. Colloids and surfaces, 44(1990) 263-279
- **Marchesseau S. Gastaldi E., Lagaude A. Cuq J.L. (1997)**

Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. J. Dairy Sci. 80: 1483-1489

- **Mathieu J. (1998)**

Initiation à la physicochimie du lait. Tech et Doc

- **Mellema M., walstra p., Van Opheusden J.H.J. and Van Vliet T. (2002)**

Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. Advances in Colloid and Interface Science 98(2002) 25-50

- **Michael Eskin N.A. (1990)**

Biochemistry of food 2<sup>nd</sup> edition Academic press, Inc.

- **Najera A.I. De Renoblas M. Barron L.J.R. (2003)**

Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. Food chemistry 80 (2003) 345-352

- **O'Callaghan D.J., O'Donnell C.P. and Payne F.A. (2000)**

On-line sensing techniques for coagulum setting in renneted milks. Journal of Food Engineering 43(2000) 155-165

- **Ozer B. (2004)**

Destructive effects of classical viscosimeters on the microstructure of yoghurt gel Turk. J Agric. For. 28(2004) 19-23

- **Pandy P.K. Ramaswamy H.S. and St-Gelais D. (2000)**

Water-holding capacity and gel strength of rennet curd as affected by high-pressure treatment of milk. Food Research International 33 (2000) 655-663

- **Pitchova I. Kostka V. (1990)**

Molecular characteristics of pepsinogen and pepsin from duck g, andular stomach. Comp. Biochem. Physiol. Vol 97B N° 1 pp89-94

- **Ramet J.P. (1987)**

La préparation du caillé in Le Fromage A. Eck 2<sup>ème</sup> édition Tech. et Doc.

- **Ramet J.P. (1987)**

Propriétés physiques du coagulum in Le Fromage A. Eck 2<sup>ème</sup> édition Tech. et Doc.

- **Reid J.R. Coolbear T. Ayers J.S. and Coolbear K.P. (1997)**

The action of chymosin on  $\kappa$ -casein and its macropeptide : Effect of pH and analysis of products of secondary hydrolysis. Int. Dairy Journal 7(1997) 559-569.

- **Renault C. (1996)**

Evaluation de la synérèse d'un coagulum de type présure. Diplôme d'études approfondies. Formation doctorale : Science des aliments. Université Montpellier II. Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier.

- **Ribadeau-Dumas B. (1991)**  
Physicochimie et biochimie des protéines du lait. Données récentes. Lait (1991)71, 133-139
- **Ribadeau-Dumas B. Grappin, (1989)**  
Les protéines *in* Le lait matière première de l'industrie laitière. CEPIL INRA
- **Richardson G.H. (1975)**  
Dairy industry p 362-391 *in* Enzymes in food Processing. G. Reed 2<sup>nd</sup> edition. Academic press 573 pp.
- **Roefs S.P.F.M. and van Vliet T. (1990)**  
Structure of acid casein gels 2. Dynamic measurements and type of interaction forces. Colloids and Surfaces, 50 (1990) 161-175
- **Rohm H., Jaros D. (2002)**  
Rheology of milk and dairy products/ Instrumentation *in* Encyclopedia of Dairy Science. Roginski H., Fuquay J. Fox P. Elsevier.
- Rollema 1992
- **Roudot A.C. (2002)**  
Rhéologie et analyse de texture des aliments. Tech et Doc 2002
- **Scher J. (2006)**  
Rheologie, texture et texturation des produits alimentaires p F3 300 1-11. Technique de l'ingénieur Genie des procédés.
- **Schmidt D.G. (1977)**  
Association of casein and casein micelles structure. *in* Developpements in Dairy Chemistry-1 Proteins. P.F. Fox applied Science Publishers.
- **Schultz D., Senge B. and Krenkel K. (1998)**  
Structure formatin processes of milk during renneting, acidification or combined renneting and acidification. Departement of food science and biotechnology, Food rheology.
- **St-Gelais D. et Tirard-Collet P. (2002)**  
Fromage, *in* Science et technologie du lait transformation du lait coordonnateur Vignola C.C, Fondation de technologie laitière du Québec *in* 2002
- **Tanford C. (1968)**  
Protein denaturation *in* Advances in protein chemistry. Edited by Anfinsen J.R *et al* Volume 23 Academic press.
- **Tuinier R. and De Kruif C.G. (2002)**  
Stability of casein micelles in milk. Journal of chemical physics Vol. 117, Number 3

- **Tunick M.H. (2000)**  
Symposium: Dairy product rheology, rheology of dairy foods that gel, stretch and fracture. J. Dairy Science 83: 1892-1898
  
- **Van Vliet T. and Walstra P. (1994)**  
Water in casein gels; how to get it out or keep it in. Journal of Food Engineering 22(1994) 75-88
  
- Vidal V., Marchesseau S., Lagaude A. and Cuq J.-L. (1998)**  
Influence of chemical agents on casein interactions in dairy products: chemical modification of milk proteins. Colloids and surfaces B : Biointerfaces 12(1998) 7-14
  
- **Visser S. (1993)**  
Symposium : proteolytic enzymes and cheese ripening. J Dairy Sci. 76: 329-350
  
- **Walstra P. (1999)**  
Casein submicelles : do they exist. International Dairy Journal 9 (1999) 189-192
  
- **Walsta P. (1990)**  
On the stability of casein micelles, J Dairy Sci. 73: 1965-1979
  
- Walstra P., Bloomfield V.A., Wei G.J. and Jenness R (1981)**  
Effect of chymosine on the hydrodynamic diameter of casein micelles. Biochimica et Biophysica Acta, 669 (1981) 258-259
  
- **Waugh D.F (1971)**  
Formation and structure of casein micelles in Milk proteins chemistry and molecular biology. Volume II H.A MacKenzie. Applied Publishers Academic press
  
- **Weber F. (1987)**  
L'égouttage du coagulum in Le Fromage A. Eck 2<sup>ème</sup> édition Tech. et Doc.
  
- **Wongt. N.P. (1983)**  
Cheese chemistry in fundamentals of dairy chemistry. Webb B.H., AH. Johnson and J.A. Alford . The Avi Publishing company Inc. 2<sup>nd</sup> Edition. PP 719-771
  
- **Yamamoto A. (1975)**  
Proteolytic enzymes in Enzymes in food processing 2<sup>nd</sup> Edition, Reed G. Academic press.