EFFET DE LA CONSERVATION SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES EXTRAITS COAGULANTS ISSUS DE CAILLETTE DE DROMADAIRE AGES PREPAREE SANS MUQUEUSE

EFFECT OF STORAGE ON ENZYME ACTIVITY OF COAGULANTS EXTRACTS FROM OLDER CAMEL CURD PREPARED WITHOUT MUCOSA

N.MAHBOUB [1], A.TELLI [1], N.SLIMANI [2], O.SIBOUKEUR [1] et A.MATI [3]
[1] Laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi arides. Univ. K. M. de Ouargla (Algérie).
[2] Laboratoires de bioressources sahariennes préservation et valorisation. Univ. K. M. de Ouargla (Algérie).
[3] Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie ; Univ. M. M. Tizi Ouzou. (Algérie).
E-mail : bioch_nasma@yahoo.fr

RESUME
Dans le but de mieux comprendre et d'améliorer l'étape clé de coagulation enzymatique, que cette présente étude est menée en testant, d'une part, l'aptitude à la coagulation du lait camelin en utilisant des enzymes gastriques brutes issues de caillettes dépourvues de muqueuses provenant de dromadaires âgés (entre 8 et 9 ans) et d'autre part, d'essayer de déterminer le mode de conservation le plus approprié pour ces préparations d'enzyme parmi l'entreposage de ces extraits soit à température ambiante (+25°C), soit sous forme réfrigéré (à +4°C), soit sous forme congelée (à -20°C) ou enfin sous forme lyophilisée. Parmi les différents modes de conservation testés, nous avons enregistré la plus grande valeur de l'activité coagulante après 15 semaines de congélation (0,277 ± 0,000 UP), correspondant à la 2ème période de conservation (entre 8 et 18 semaines). Durant cette période, les enzymes coagulants ont une activité protéolytique la plus faible quand ils sont conservés au réfrigérateur à + 4°C avec une valeur de (0,37±0,017). Ces deux extraits ainsi choisis seraient les plus indiqués pour la transformation fromagère du lait au niveau industriel, particulièrement au niveau de la phase de coagulation.

Mots clés : *lait de dromadaire, caillette, extrait enzymatique, conservation, activité coagulante, activité protéolytique.*

ABSTRACT
In order to better understand and improve this important milestone of enzymatic coagulation, this study is conducted by testing on one hand, the coagulation properties of camel milk by using gross gastric enzymes of stomach (crud) and devoid of mucous from aged camels (between 8 and 9 years). on the other hand, trying to determine the most appropriate method of conservation for these enzyme preparations from storage of these extracts either at room temperature (25 ° C) or under refrigerated form (at +4 ° C) or in frozen form (-20 ° C) and finally lyophilised form.Among the different tested methods of conservation, we recorded the highest value of coagulation activity after 15 weeks of freezing (0.277 ± 0.000 UP), corresponding to the second retention period (between 8 and 18 weeks). During this period, the coagulant enzymes have the lowest proteolytic activity when they are stored in a refrigerator at 4 ° C with a value of (0.37 ± 0.017). These two extracts thus selected would be most suitable for cheese milk processing at the industrial level, particularly in the phase of coagulation.

Keywords: *camel milk, curd, enzyme extract, conservation, coagulant activity, proteolytic activity.*

I. INTRODUCTION

Le dromadaire (*Camelus dromedarius*) est un animal particulièrement adapté aux rudes conditions agro-climatiques qui existent dans plusieurs régions du monde, notamment dans les zones steppiques et désertiques du Sahara algérien [1].

Le lait de dromadaire possède néanmoins des aptitudes faibles à la transformation en produits dérivés (fromages, laits fermentés, beurre...etc.) [2].

La phase de coagulation a été particulièrement explorée car certaines enzymes protéolytiques ont la propriété de déstabiliser les micelles de caséines et de coaguler le lait, parmi elles figurent les enzymes d'origine animale (présure, pepsine), végétale (bromeline, ficine), microbienne produites soit par des moisissures (*Endothia parasitica, Mucor pusillus*, *Mucor miehei*) soit par des bactéries (*Bacillus*) [3].

Plus récemment, les travaux menés par [1] ont montré que les protéases gastriques extraits de caillettes de dromadaires âgés (à dominance pepsine) possèdent une activité coagulante plus élevée que les protéases gastriques camelines à dominance chymosine.

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Echantillon de lait

Le lait est collecté à partir de chamelles des populations "Sahraoui" vivant en élevage extensif dans les parcours de la wilaya d'El-Oued.

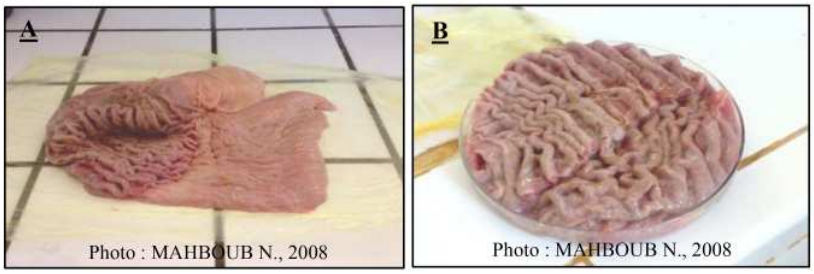
2.1.2. Caillettes de dromadaire

L'estomac du dromadaire diffère de celui des ruminants où le troisième compartiment, qui n'a pas d'équivalent chez ces derniers, est assez variable. Dans cette poche, la caillette proprement dite correspond au dernier tiers du troisième compartiment [4]. La partie de caillette est bien apparut avec une forme feuilletée et une couleur vire entre l'orange et rose.

Les caillettes qui ont servi à cette étude (figure 1), issues de dromadaires adultes âgés de 8 à 9 ans, ont été prélevées au niveau de l'abattoir communal d'Ouargla. De telle façon que les extraits coagulants issus de caillette à cet âge renferment à peu près 80% de pepsine et 20% de chymosine. Sachant que les caillettes utilisées dans ce travail ont dépourvues de sa muqueuse.

2.1.3. Poudre de lait de vache

La poudre de lait bovin utilisée type "low heat" qui est choisie pour sa bonne aptitude fromagère, provient de la firme Danone.



Figures 1 : images photographiques des caillettes issues de dromadaires adultes (âgés de 8 ans) utilisées pour extraire les enzymes coagulantes
A : vue de la partie externe de la caillette **; B :** vue de la partie interne

2.2 Méthodes de travail

Des caillettes, prélevées au niveau de l'abattoir de Ouargla, à partir des estomacs de dromadaires âgés de 8 à 9 ans, sont acheminées au laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides (LPEZASA) de l'université KASDI Merbah de Ouargla, où elles sont lavées à l'eau du robinet, dégraissées, découpées en lanières puis congelées à -18°C.

Du lait de mélange, prélevé tôt le matin, à partir de chamelles de la population "Sahraoui" vivant en élevage extensif dans les parcours de la wilaya d'El-oued a été également utilisé dans cette étude. Les échantillons de lait sont acheminés dans une glacière contenant un bloc réfrigérant au laboratoire de (LPEZASA). Une partie est aussitôt soumise au test de la réductase, aux mesures du pH, de la densité et de l'acidité titrable.

Du lait reconstitué à partir d'une poudre de lait écrémé type "Low Heat" est utilisé. Il provient de la firme "Danone". Il est utilisé comme substrat standard afin de mesurer le temps de coagulation selon la formule de BERRIDGE.

Les caséines camelines lyophilisées, sont isolées à partir du lait camelin frais selon le protocole expérimental proposé par [5]. L'extraction des enzymes est réalisée selon le protocole préconisé par [6].

La conservation se fait selon quatre modes de conservation : la température ambiante (à+20°C), la réfrigération (à+4°C), la congélation (à-20°C) et la lyophilisation. La détermination du taux de protéines totales des ECD est réalisée par la méthode de LOWRY.

L'activité coagulante des ECD peut être également exprimée en "force coagulante de SOXHLET" (F), selon la relation suivante : F= UP/ 0,0045 [7].

Un substrat caséinique à 2 % (P/V) est préparé en utilisant les caséines camelines lyophilisées additionnées de l'eau distillée.

Par ailleurs, la mesure de l'activité protéolytique des ECD est fondée sur l'intensité de la protéolyse des caséines camelines en solution sous l'action enzymatique de ces extraits [8]. Le résultat de cette protéolyse est la libération de peptides de faible poids moléculaire. Ces derniers restent solubles après l'ajout de l'acide trichloracétique (TCA) à 12 % qui est utilisé afin de bloquer la réaction enzymatique ; la quantité de ces peptides est mesurée par leur absorbance à 280 nm en utilisant le spectrophotomètre UV-visible. La concentration en peptides du filtrat obtenu est proportionnelle à l'activité protéolytique des extraits coagulants de dromadaire (ECD).

Analyses statistiques

L'analyse de la variance est réalisée avec le logiciel STATI_TCF et l'Analyse en Composantes Principales (ACP) sont réalisées avec le logiciel xl- stat.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Le pH du lait est de l'ordre de 6,65 ± 0,132. Ce lait est légèrement acide en comparaison avec le lait bovin (pH=6,6 ; [12]) et plus acide que le lait humain (pH=7,0 ; [13]).

Le pH est du en grande partie aux groupements basiques ionisables et acides dissociables des protéines, aux groupements esters phosphoriques des caséines et aux acides phosphorique et citrique [14].

Par ailleurs selon [15], l'acidité pourrait être expliquée par une grande richesse en vitamine C du lait camelin, de l'ordre de 50 mg/l [16]. En parallèle, [17] trouvent que la teneur de vitamine C du lait camelin représente trois fois d'environ plus grande que ceux du lait bovin avec une valeur de 37,4 mg/l, par contre est deux fois pour [18].

La densité des échantillons de lait est égale à 1,027 ± 0,006. En comparaison avec le lait de vache, de bufflesse et de mouton, le lait de chamelle possède une faible densité [19].

Le lait de dromadaire est en effet, pauvre en matière sèche totale, en matière protéique et surtout en caséines [20].

L'acidité titrable du lait camelin collecté à partir de la traite de matin est égale à 21,3 ± 1,44 D°. L'acidité d'un lait frais immédiatement après la traite varie de 1,5 à 1,7g d'acide lactique par litre (de 15 à 17 D°). Cette acidité provient des protéines, des phosphates et du CO_2 dissous essentiellement [21]. Le lait camelin caractérisé par un effet tampon plus élevé par rapport au lait bovin, permet d'expliquer l'absence de relation directe entre le pH et l'acidité titrable [22]. **3.1. Caractérisation des extraits coagulants**

La mesure de la teneur en protéines de ces extraits va donner une valeur égale à 807,5 µg/ ml.

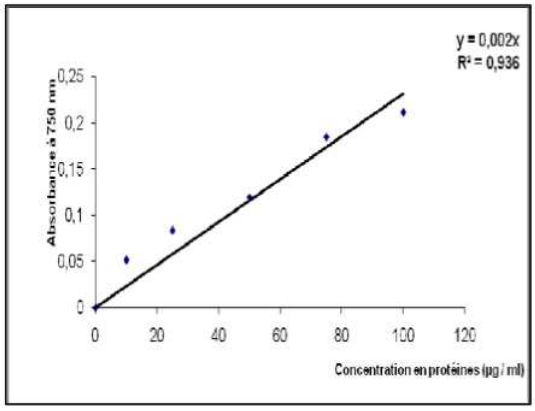


Figure 2 : Courbe d'étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine étalon ;
R : coefficient de corrélation

Paramètres	Caillette A (caillette sans muqueuse)
Poids de caillette (g)	215,2
Poids de précipité humide (g)	3,94
Rendement (%)	1,8

Tableau I : Quelques paramètres concernant les caillettes de dromadaires : sans muqueuse (caillette A) et avec muqueuse (caillette B)

Activité coagulante

L'analyse de variance (tableau II), montre que le mode de conservation influe d'une façon très hautement significative (THS) et la période de conservation d'une façon hautement significative (HS) sur l'activité coagulante des lots d'ECD.

Concernant l'évolution de l'activité coagulante des lots d'ECD, trois périodes d'activité semblent se dégager en fonction de la température de l'air au moment de l'analyse (figures 3, 4, 5 et 6).

- la première période s'étalant entre S_1 et S_8 où la température était de 15 à 20°C environ, sachant que S_1 c'est la semaine de l'extraction enzymatique;
- la deuxième période s'étalant entre S_9 et S_{18} où la température avoisinait les 30 °C ;
- la troisième période s'étalant entre S_{19}et S_{24} où la température se situait entre 35 et 40°C environ.

Les résultats semblent indiquer que la première période, correspond à une période de latence, puisque l'activité coagulante des ECD y est globalement faible.

La congélation semble donner les meilleurs résultats sur le plan de l'activation enzymatique des ECD puisque celle-ci atteint une valeur de 0,277 UP à S_{15} contre 0,0165 UP à S_{16} pour le mode de lyophilisation.

Ce résultat va dans le même sens que celui de [23] qui ont trouvé une très bonne conservation de la solution de pepsine A bovine et d'une solution de présure commerciale bovine à -28° C avec des valeurs d'UP (0,333 UP à 370 jours) ; (0,298 UP à 410 jours) respectivement.

En conclusion, les résultats obtenus sont de nature à suggérer que la méthode de congélation est plus intéressante sur le plan de l'activité coagulante des ECD issus de caillette dépourvue de muqueuse par rapport aux autres modes de conservation.

Tableau II: Analyse de variance multifactorielle sur l'activité coagulante (UP)

	Probabilité	DDL (K1)	Variable résiduel (K2)	F observé	F théorique (α = 5 %)	F théorique (α = 1%)	F théorique (α = 0,1 %)	Signification
Temps de conservation (période)	0,0078	2	23	6,04	3,42	5,66	9,47	HS
Type de préparation d'enzyme	0,0048	1	23	9,75	4,28	7,88	14,2	HS
Mode de conservation	0 ,0000	3	23	222,89	3,03	4,77	7 ,67	THS

HS : hautement significative ; THS : très hautement significative

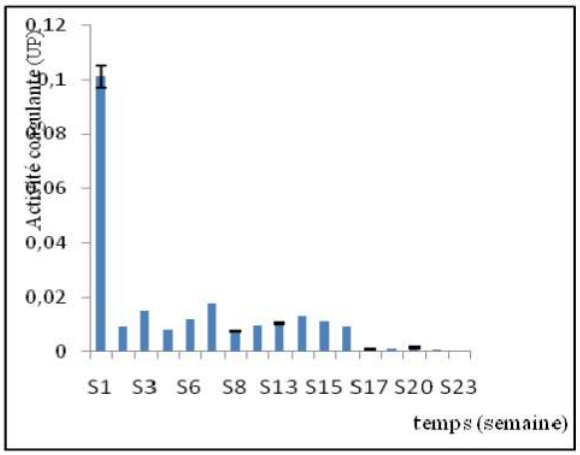


Figure 3 : Evolution de l'activité coagulante (UP) des ECD en fonction du temps d'entreposage à température ambiante

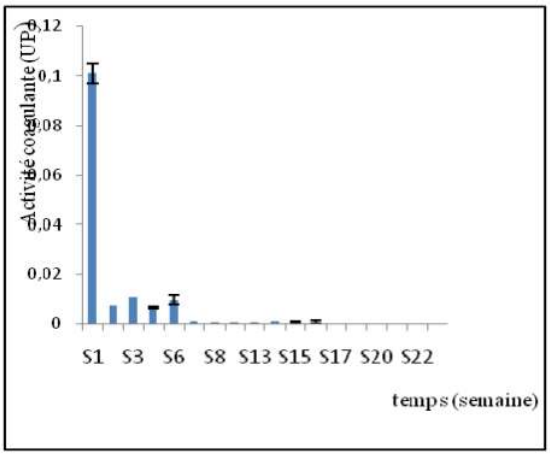


Figure 4: Evolution de l'activité coagulante (UP) ECD en fonction du temps d'entreposage au réfrigérateur

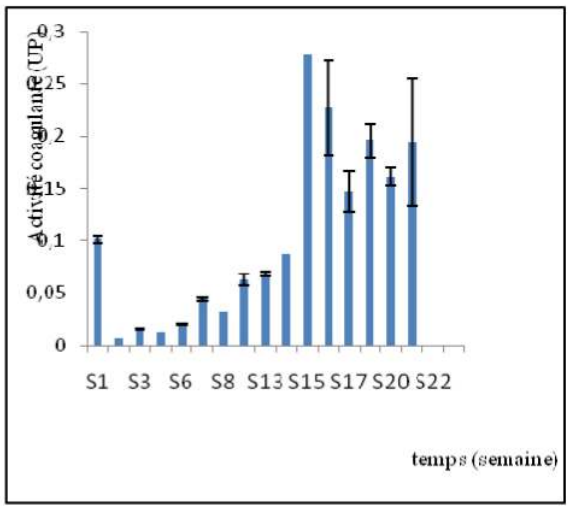


Figure 6 : Evolution de l'activité coagulante (UP) des ECD en fonction du temps de conservation à l'état lyophilisé

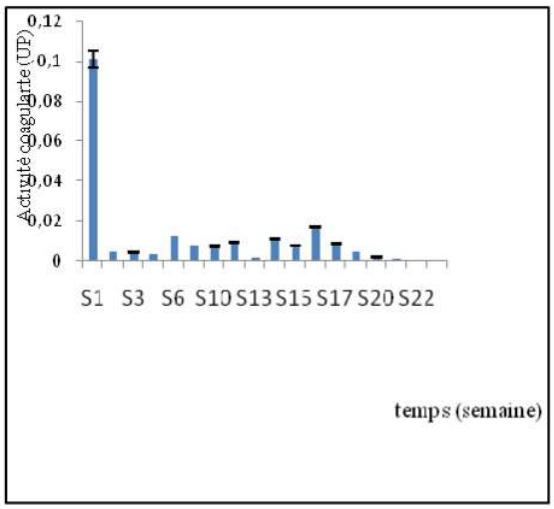


Figure 5 : Evolution de l'activité coagulante (UP) des ECD en fonction du temps de conservation au congélateur

Activité protéolytique

D'après les figures (7, 8, 9 et 10) et l'analyse de variance **(**tableau III**)**, on peut dire que le mode et la période de conservation influent d'une façon très hautement significative (THS) sur l'activité protéolytique des lots d'ECD.

Les ECD conservés dans le réfrigérateur semblent donner les meilleurs résultats sur le plan de l'activité protéolytique puisque celle-ci atteint une valeur de (0,37) à S_{14} (deuxième période) contre (0,423) à S_{15} pour les ECD lyophilisés et 0,478 à S_{14} pour les ECD conservés dans le congélateur.

En conclusion, les résultats obtenus sont de nature à suggérer que la méthode de réfrigération est la plus intéressante sur le plan de l'activité protéolytique des ECD.

On peut considérer sur le plan activité protéolytique, la valeur de 0,478 à S_{14} représentés par les ECD congelés puisque selon les analyses de variance, on trouve que les ECD réfrigérés et les ECD congelés de deuxième période appartiennent au même groupe (tableau IV) sur le plan Activité protéolytique, donc on peut prendre l'un à la place de l'autre sans effets néfastes.

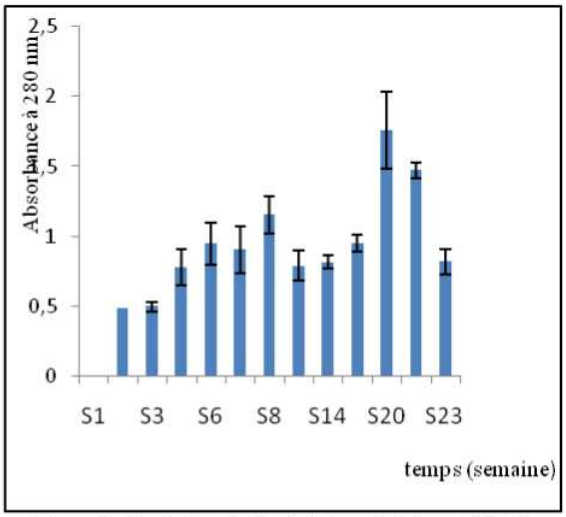


Figure 7 : Evolution de l'activité protéolytique (AP) des ECD en fonction du temps d'entreposage à température ambiante

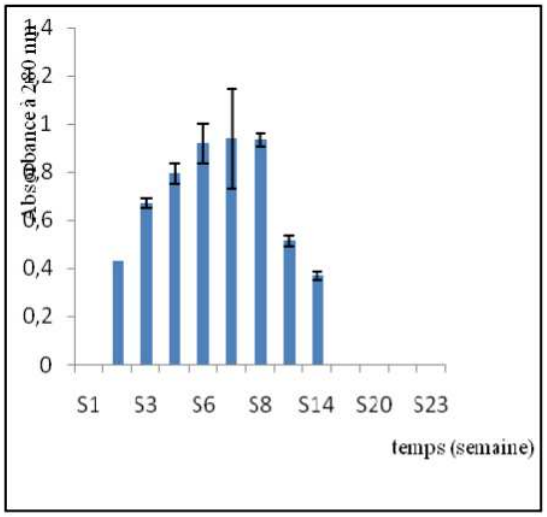


Figure 8 : Evolution de l'activité protéolytique (AP) des ECD en fonction du temps d'entreposage au réfrigérateur

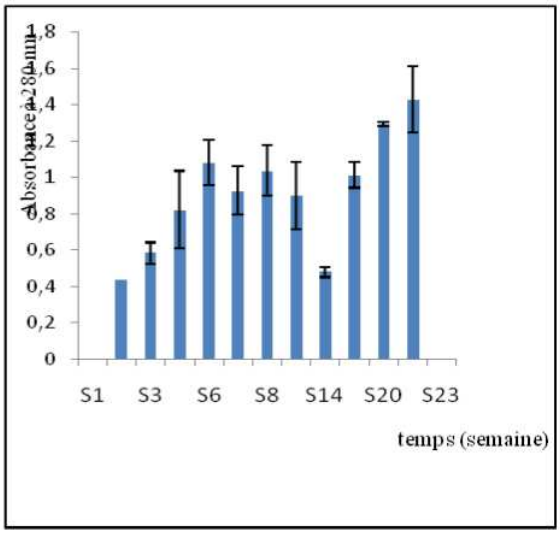


Figure 9 : Evolution de l'activité protéolytique (AP) des ECD en fonction du temps de conservation au congélateur

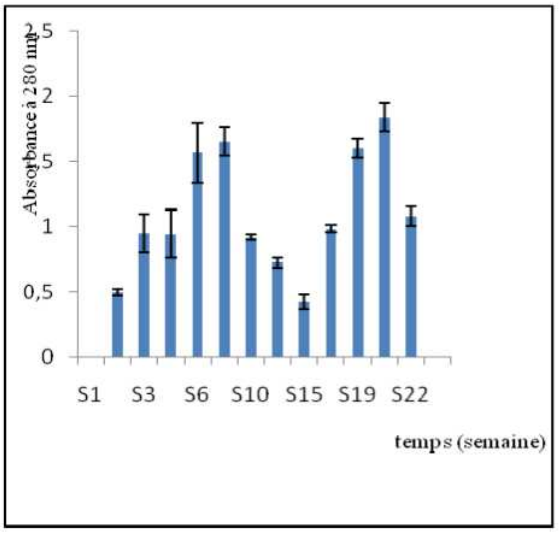


Figure10 :Evolution de l'activité protéolytique (AP) des ECD en fonction du temps de conservation à l'état lyophilisé

Tableau III: Analyse de variance multi factorielle sur l'activité protéolytique (AP)

	Probabilité	DDL (K1)	Variable résiduel (K2)	F observé	F théorique (α = 5%)	F théorique (α = 1%)	F théorique (α = 0,1%)	Signification
Temps de conservation (période)	0,0000	2	23	307,68	3,42	5,66	9,47	THS
Type de préparation d'enzyme	0,0094	1	23	7,97	4,28	7,88	14,2	HS
Mode de conservation	0 ,0000	3	23	20,80	3,03	4,77	7,67	THS

HS : hautement significative ; THS : très hautement significative

Tableau IV : Interaction entre le temps, préparation d'enzyme et le mode de conservation sur le plan Activité protéolytique (AP)

Individu	moyennes	Groupes homogènes							
p3 -SM -Con	1292.50	A							
p3 -SM –Lyo	1080.50		B						
p3 -SM – Tam	817.00			C	D				
p2 -SM – Tam	786.00			C	D				
p1 -SM –Lyo	505.00					E	F	G	
p1 -SM – Tam	480.00					E	F	G	H
p2 -SM –Con	475.00					E	F	G	H
p1 -SM –Con	440.00						F	G	H
p2 -SM –Lyo	439.00						F	G	H
p1 -SM –Réf	430.00							G	H
p2 -SM –Réf	370.50							G	H
p3 -SM –Réf	271.00								H

P1 : première période de conservation SM : préparation d'enzyme sans muqueuse Con : congelé
P2 : deuxième période de conservation Tam : température ambiante Lyo : lyophilisé
P3 : troisième période de conservation Réf : réfrigérateur

CONCLUSION

Le dromadaire occupe une place de choix dans les zones arides et semi arides, en raison de son excellente adaptation aux mauvaises conditions de vie tel que le manque d'eau et le manque de pâturages et de plus il est apte à produire un lait de bonne valeur nutritionnelle.
Le lait de dromadaire est réputé pour son inaptitude à la coagulation. A travers cette étude, nous avons tenté d'apporter une contribution à l'amélioration de l'aptitude à la coagulation de ce lait en utilisant des enzymes gastriques brutes issues de caillettes de dromadaires adultes (entre 8 et 9 ans).
L'étude visait à rechercher des conditions optimales de conservation des ECD. Pour se faire, différentes conditions de stockage ont été étudiées : à la température ambiante, dans un réfrigérateur, dans un congélateur et lyophilisés. Il s'agissait de déterminer le type de conservation permettant de maintenir une bonne activité coagulante, une activité protéolytique faible et une durée de conservation la plus longue possible.
Les résultats obtenus montrent que la congélation est la méthode la plus intéressante puisque les lots ainsi conservés présentent l'activité coagulante la plus élevée (0,277 UP) à S_{15} et l'activité protéolytique la plus faible (0,478) à S_{14}. La durée optimale de conservation de ces protéases gastriques est donc égale à environ trois mois et demi.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SIBOUKEUR O., MATI A. et HESSAS B. (2005). Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait cameline (camelus dromedarius) : utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. Cahiers agricultures vol. 14, n° 5, septembre-octobre. 5(14), 473-478.
2. RAMET J.P. (1994). Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication de fromage au lait de dromadaire. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie. pp 241-255.
3. LENOIR J., LAMBERET G., SCHMIDT J. L. et TOURNEUR COLETTE (1985). La maîtrise du bioréacteur fromage. BIOFUTUR-Décembre 1985. pp 23-50.
4. JOUANY J. P. et KAYOULI C. (1989). La digestion microbienne chez les camélidés. Options méditerranéennes, série Séminaires numéro 2. pp. 89-96.
5. SHAMET K.M., BROWN R. J. and Mc MAHON D.J. (1992). Proteolytic activity of some milk clotting enzyms on caseins. J. Dairy Sci. 75(6); 1373-1379.
6. VALLES E. et FURET J. P. (1977). Étude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine. Méthode d'extraction. In le lait : 601-17.
7. BOUDIER J. F., LUQUET F. M. (1981). Dictionnaire laitier. Paris : tec & doc-Lavoisier.
8. BERGERE J. L. et LENOIR J. (1997). Les accidents de fromagerie et les défauts des fromages. In « Le fromage» ECK A. et GILLIS J.C. Tec & Doc-Lavoisier. Troisième édition. Paris.
9. GUIRAUD J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod édition. p652.
10. [10] LARPENT J. P. (1970). Microbiologie du lait et des produits laitiers. Edition Tec et Doc., première édition, Lavoisier. Paris. 584 p.
11. SAIDI M. , SIBOUKEUR O. , OULED BELKHEIR A. et GUERRADI (1999). Caractéristiques physico-chimiques, composition et qualité bactériologique du lait de chamelle population sahraoui (wilayates de Ouargla et Ghardaïa). Aptitudes technologiques. Premières journées sur la recherche cameline-Ouargla 1999. pp 129-133.

12. YAGIL R., SARAN A. and ETZION Z. (1984). Camel milk for drinking only. Comp. Biochem. Physiol., 78, 263-266.
13. KAMOUN M. (1994). Evolution de la composition du lait de dromadaire Durant la lactation : conséquences technologiques. In Bonnet P, éd. (1998). Dromadaires et chameaux, animaux laitiers. Actes du colloque, 24-26 Octobre 1994, Nouakchott, Mauritanie. Montpellier, France : cirad.
14. MATHIEU J. (1998). Initiation à la physicochimie du lait. Tec & doc-Lavoisier. p 221.
15. YAGIL R., ZAGORSKI O. and VAN CREVELD C. (1994). Science and Camel's Milk Production. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
16. RIAD F., 1995. La chamelle allaitante face au stress calcique : une fonction endocrine adaptée aux conditions désertiques. Science et changements planétaires. Sécheresse volume 16, numéro 4, octobre-novembre-décembre 2005. pp 261-267.
17. FARAH Z., RETTENMAIER R. and ATKINS D. (1992). Vitamin content of camel milk. Internat. J. Vitam. Nutr. Res., 62, 30-33.
18. MEHAIA M. A. (1994). Vitamin C and riboflavin content in camels milk : effects of heat treatments. *Food Chemistry* 50, 153-155.
19. MOHAMED M.A., MURSAL A.I. and MARTHA LARSSON-RAZNIKIEWICZ (1989). Separation of a camel milk casein fraction and its relation to the coagulation properties of fresh milk. Milchwissenschaft 44(5).
20. KAMOUN M. (1989). Un essai de production et de transformation de lait de dromadaire en Tunisie. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Tropicaux, 42, 113-115.
21. ANONYME (1980). Analyses mesures préparations. Le laboratoire ITMA. Centre national pédagogique agricole. pp 23.
22. ABU-TARBOUSH H. M. (1996). Comparision of associative growth and proteolytic activity of yogourt starters in whole milk from camels and cows. J. Dairy Sci., 79, 366-371.
23. VALLES E. et FURET J.P. (1981). Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulantsà base de pepsine bovine. Influence de la race, de l'âge et du sexe sur leur contenu enzymatique. In Le Lait, (1981), 61, 590-618.