

RECHERCHE DE SUCCEDANES DE PRESURE DANS UN COPRODUIT D'ABATTAGE : LES CAILLETES OVINES

Slamani R.¹, Bellal M. M.²

¹Division de Technologie Agroalimentaire, CRP Mahdi Boualem, INRAA

²Département de Technologie Alimentaire, INA

RÉSUMÉ

En fabrication fromagère, le caractère irrégulier de l'approvisionnement en présure a conduit à l'emploi de préparation enzymatique d'origines divers, et coagulant le lait de façon similaire à la présure. Parmi ces enzymes, les pepsines extraites de caillettes d'animaux adultes se sont révélées apte à coaguler le lait, mais avec des adaptations technologiques qui permettent de remédier à leurs sensibilités vis-à-vis des variations de pH.

L'utilisation des caillettes ovines comme matière première à la production d'extrait enzymatique offre d'une part la possibilité de fournir un coagulant de remplacement à l'industrie fromagère et d'autre part d'envisager la valorisation de ce coproduit d'abattage.

Dans le présent travail, nous avons étudié le procédé d'obtention de l'extrait coagulant selon quatre protocoles dans le but d'optimiser le rendement d'extraction. Les résultats obtenus montrent que des quatre méthodes d'extractions employées, la macération des broyats de caillettes dans une solution acidifiée s'avère la plus avantageuse. Elle est conduite à une température de 35°C pendant une durée de 96 heures pour un rapport de poids de caillette (g) sur un poids de solution d'acide chlorhydrique (0,2 M) égale à 8 : 10. La caractérisation de cet extrait enzymatique brut de la pepsine ovine présente une activité de 5-7 UP/ ml pour une concentration en protéines qui avoisine les 35 mg/ml.

Mots Clés : pepsine, lait, coagulation, extraction, caillette ovine, valorisation.

ملخص

أدت الطبيعة غير المنتظمة لإنتاج المروبات من نوع البريزور المستعملة عند تخثير الحليب في صناعة الأجبان إلى البحث عن بديل لهذا الأنزيم من معدة الحيوانات المجترة البالغة. من بين هذه الأنزيمات، يعتبر البيبسين أحد البدلاء الذي أظهر إمكانية ترويب الحليب بطريقة مماثلة للبريزور و لكن مع تعديلات تكنولوجية تتوافق مع pH الأمثل لعمل هذا الأنزيم. في هذه الدراسة، قمنا بمحاولة استخراج المستخلص الأنزيمي المخثر للحليب من معدة الأغنام البالغة وذلك بهدف تمييز هذه المادة من جهة و من جهة أخرى. لاستبدال المروبات المستوردة. أربع طرق مختلفة، استخدمت لاستخلاص أنزيم البيبسين من معدة الأغنام و ذلك من أجل إيجاد الظروف المثالية للاستخلاص. وقد أظهرت النتائج أن النقع في المحلول الحمضي هو الأكثر فائدة و ذلك وفقاً للمعايير التالية : وضع وزن وحدة ثمانية غرام من معدة الأغنام في وزن وحدة عشر غرام من محلول حمض الكلوريدريك ذي المولارية 0.2 عند درجة 35 م° لمدة 96 ساء. يتميز هذا المستخلص الأنزيمي الخام لبيبسين الأغنام بنشاط مخثر قدره من 5 إلى 7 وحدة بريزور من أجل تركيز البروتين بحوالي 35 مغ/مل.

الكلمات الدالة : بيبسين الأغنام، الحليب، التخثير، الاستخلاص، التمييز، التثمين.

INTRODUCTION

L'Algérie qui reste dépendante en matière d'approvisionnement en agents coagulants vis à vis des laboratoires étrangers, a recours à l'importation de ces produits en vue de leur utilisation dans la fabrication de deux types de fromages : le Camembert et l'Edam.

Pendant la période 1997-2001, l'industrie fromagère a utilisé 4.324 kg de présure et ses concentras, soit un coût de l'ordre de 16 millions de DA (Statistiques du Commerce Extérieur, 2002).

Par ailleurs, l'Algérie dispose d'un potentiel de coproduits d'abattage très variés. A titre indicatif, en 1999, 1.619.488 têtes du cheptel ovin ont été abattues. Cette opération d'abattage permettait ainsi, d'obtenir en plus de la carcasse, un ensemble de coproduits dont une grande partie serait utilisée directement en alimentation humaine. Néanmoins, aucune voie de valorisation en vue d'une meilleure exploitation n'a été envisagée à ce jour.

Parmi les voies de valorisation des coproduits d'abattage d'ovins, la production d'enzymes coagulants le lait à partir de la caillette constitue un exemple d'intérêt. En effet, le principal agent coagulant le lait est la présure, dont l'utilisation est confrontée à la contrainte de sacrifice des jeunes veaux. En conséquence l'industrie fromagère subit une crise dans l'approvisionnement de ce coagulant. Cette situation a donné une impulsion aux recherches sur les enzymes de remplacement de la présure (Ramet, 1997).

A l'heure actuelle, les coagulants appartenant au groupe de pepsines issus des

caillettes bovines, de muqueuses gastriques de porc, du proventricule du poulet sont largement employés en fromagerie dans de nombreux pays.

Par ailleurs, la préparation industrielle de la présure et de ses substituts est réalisée par macération des muqueuses gastriques dans des solutions salines de chlorure de sodium ou bien par autodigestion au moyen d'eau acidifiée par l'acide chlorhydrique.

Ce travail illustre les conditions optimisées d'obtention d'un extrait enzymatique coagulant à partir de caillettes ovines et discute les possibilités de sa production industrielle.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les caillettes d'ovins adultes ont été prélevées au niveau de l'abattoir d'El Harrach, puis transportées au laboratoire où elles ont été lavées, dégraissées, débarrassées de leurs parties pyloriques et broyées. Les broyats de caillettes homogénéisés ont été, ensuite, conservés au congélateur à - 18°C. L'obtention de l'extrait enzymatique coagulant est réalisée par macération des broyats de caillettes dans quatre solutions extractives préconisées par différents auteurs :

- Eau distillé (O'Leary et Fox, 1975) ;
- Solution de HCl 0,2 M (Valles et Furet, 1977).
- Saumure à 6% de NaCl + 2% de H₃BO₄ (1 : 8 v/v) (Anifantakis et Green, 1980) ;
- Saumure à 10% de NaCl + 1% de Benzoate de Na (Goursaud, 1999) ;

La macération est conduite à une température de 25 °C pendant une heure d'incubation, à raison de 100 g de caillette pour 100g de solution extractive.

A la fin de la période d'incubation, l'homogénéat macéré est filtré à travers un Buchner contenant de la gaze puis centrifugé à 2500 g pendant 15 minutes. Le surnageant récupéré est activé en ajustant le pH à 2 par une solution d'acide chlorhydrique pendant 10 min puis, il est réajusté définitivement à pH 6 par de la soude.

Les extraits coagulants ainsi obtenus ont été clarifiés selon la méthode de Valles et Furet, (1977). La caractérisation des extraits enzymatiques bruts et clarifiés a porté sur :

- La mesure de l'activité coagulante vis-à-vis du lait selon la méthode de Berridge modifiée par Collin *et al.*, (1977).
- La détermination de la concentration en protéines totales selon la méthode de Lowry *et al.*, (1951).
- L'estimation des rendements d'extraction selon Valles et Furet (1981).

La solution extractive à base d'eau acidifiée à l'HCl 0,2 M, ayant donné le meilleur rendement d'extraction de l'activité coagulante, a été préconisée pour l'optimisation des paramètres d'extraction suivants :

- Quantité de caillette mise en œuvre ;
- Concentration en HCl ;
- Température et de la durée de macération.

RÉSULTATS

1 - Influence de la nature de la solution d'extraction, effet de la clarification

Le taux d'extraction de l'enzyme varie en fonction du milieu de macération. Cette variation relativement faible lorsque la macération est conduite dans de l'eau ou dans la saumure, elle est notable dans le cas de la macération dans la solution 0,2 M de HCl (Tableau I).

Tableau 1 : Variation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction en fonction du milieu de macération. Effet de la clarification.

Solutions extractives Paramètres	HCl 0,2 M	H ₂ O + 1 % de Benzoate de Na	10 % de NaCl + 1% Benzoate de Na	6 % de NaCl + 2% H ₃ BO ₄
pH du milieu	0,91	6,03	5,86	5,43
AC (UP) avant activation	/	0,29	0,41	0,35
AC (UP) après activation	2,27	0,81	0,89	0,84
Rt (UP /g de caillette)	0,96	0,68	0,51	0,65
AC (UP) (après clarification)	1,72	0,69	0,19	0,24
Rt (UP /g de caillette)	0,73	0,53	0,10	0,18

Conditions de macération : Poids de broyat de caillette = 100g ; poids de la solution extractive = 100 g ; Température d'incubation = 25°C ; Temps de macération = 60 minutes.

L'ajout de NaCl à l'eau facilite l'extraction et permet d'avoir des extraits plus actifs mais des rendements d'extraction plus faible à cause de la viscosité qui gêne la filtration.

Une clarification s'avère indispensable pour les jus de macération obtenus avec l'eau et la saumure. Cette étape permet de corriger la couleur de l'extrait du brun rougeâtre au jaune d'or (fig. 2 et 3). Cependant, cette opération entraîne une perte d'activité particulièrement notable avec les jus de macération saumure.

2 - Influence de la quantité de caillette mise en œuvre

L'activité coagulante et le rendement d'extraction varient relativement, de manière proportionnelle avec la quantité de caillette

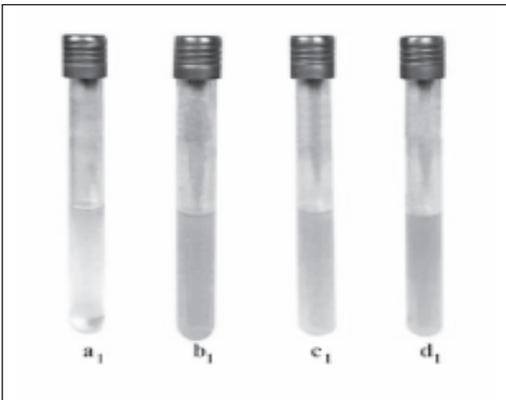


Figure 2 : Extraits obtenus après macération dans : a₁ : HCl 0,2 M, b₁ : H₂O
c₁ : NaCl 6%, d₁ : NaCl 10%.

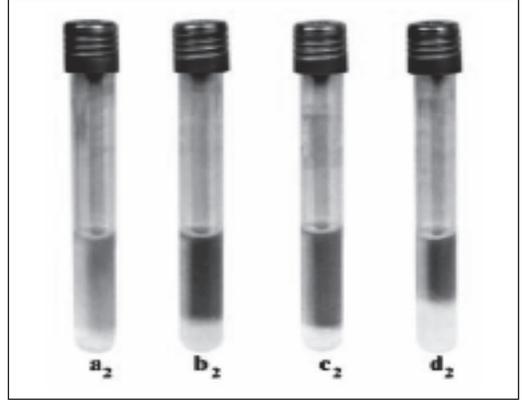


Figure 3 : Extraits clarifiés :
a₂ : HCl 0,2 M, b₂ : H₂O
c₁ : NaCl 6%, d₁ : NaCl 10%

mise en œuvre (fig. 4). En effet, une augmentation du poids de caillette entraîne une augmentation de l'activité coagulante, et une diminution du rendement d'extraction. Cependant, au-delà de 80 g de caillette mise en œuvre, la variation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction est relativement faible.

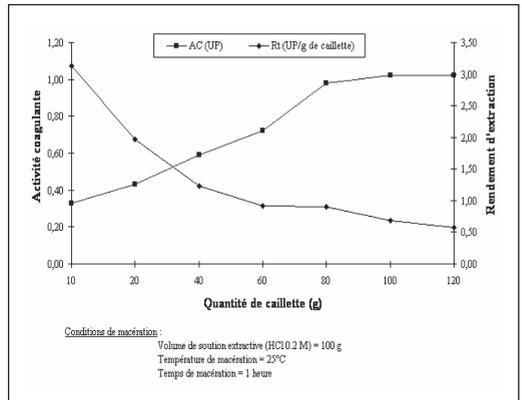


Figure 4 : Variations de l'activité coagulante et du rendement d'extraction en fonction de la quantité de caillette mise en œuvre.

3 - Influence de la concentration en HCl

L'augmentation de la concentration en HCl entraîne une augmentation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction jusqu'à une certaine limite (0,2 M) au delà de laquelle l'activité et le rendement diminuent (fig. 5).

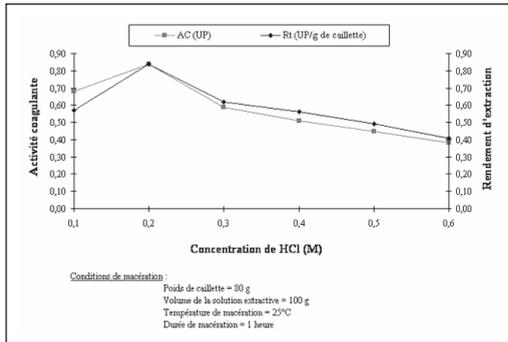


Figure 5 : Variations de l'activité coagulante et du rendement d'extraction en fonction de la concentration en HCl des solutions extractives.

4 - Influence de la température et de la durée de macération

La variation de la température et de la durée de macération montre que l'extraction est d'autant plus rapide que la température est élevée. (fig. 6 et 7).

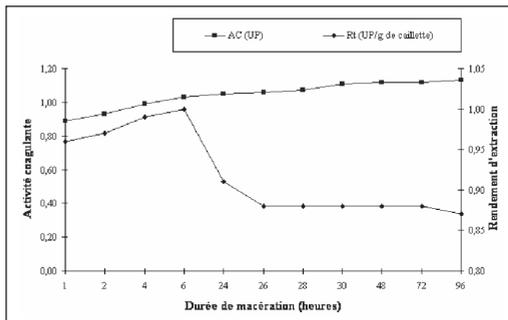


Figure 6 : Influence de la durée de macération à 25 °C sur l'activité coagulante et le rendement d'extraction.

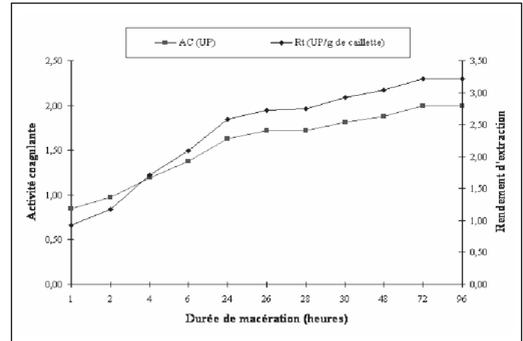


Figure 7 : Influence de la durée de macération à 30 °C sur l'activité coagulante et le rendement d'extraction.

Par ailleurs, l'élévation de la température au-delà de 25°C améliore le rendement d'extraction. En effet, la figure 6 fait apparaître une chute très importante du rendement à 25°C, au-delà de 6 heures de macération ce qui n'est pas observé pour des températures supérieures. La température de 35°C avec une durée de macération de l'ordre de 96 heures, conduit aux activités enzymatiques (coagulantes) les plus élevées avec de meilleurs rendements (fig. 8). Cependant, lorsque la macération est conduite à 40°C, l'activité coagulante et le rendement d'extraction chutent (fig. 9).

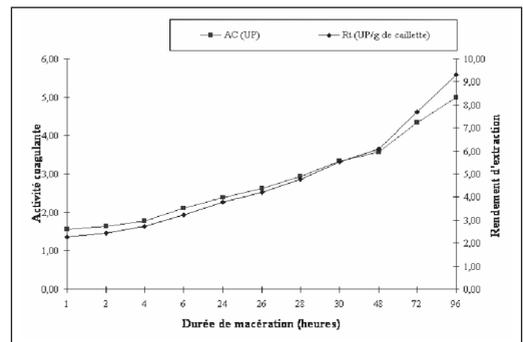


Figure 8 : Influence de la durée de macération à 35 °C sur l'activité coagulante et le rendement d'extraction.

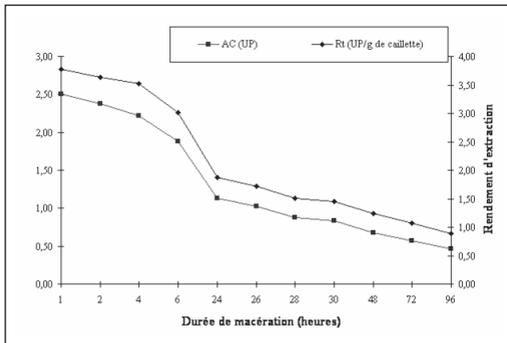


Figure 9 : Influence de la durée de macération à 40 °C sur l'activité coagulante et le rendement d'extraction.

Ces essais préliminaires ont permis d'adopter des conditions optimales d'extraction. La préparation des extraits est alors, réalisée selon le protocole suivant :

A un poids de caillette (PU), on ajoute un poids égal à 1,25 x PU d'une solution de HCl 0,2 M. Le mélange est incubé à 35°C pendant 96 heures.

Dans ces conditions expérimentales, 1g de caillette donne une activité coagulante de 9 UP. Pour produire 1 litre d'extrait enzymatique de force 1/10.000 (qui correspond la présure commerciale), il faut préconiser environ 9 caillettes ovines d'un poids moyen de 120 g.

DISCUSSION

La méthode adoptée permet d'une part l'extraction de la pepsine et du pepsinogène et d'autre part l'activation de ce pepsinogène. Cette extraction est conditionnée par différents paramètres : le pH de la solution extractrice, la température et la durée de macération (Cuvellier, 1999).

L'utilisation d'une solution d'acide chlorhydrique 0,2 M montre qu'une force ionique minimum est nécessaire pour une meilleure extraction. En effet, selon Tsouli (1974), le taux de NaCl n'a pas d'influence sur celui de l'extraction enzymatique, mais il reste qu'avec l'eau seule, on obtient des solutions moins actives. Valles et Furet (1977), en comparant les rendements d'extraction obtenus par les macérations acides et dans l'eau, rapportent qu'une seule macération acide permettait d'obtenir autant de pepsine que trois macérations consécutives effectuées dans l'eau. Contrairement à ces auteurs, Abd-El-Rahman *et al.*, (1990), indiquent que l'emploi de l'eau seule est plus favorable à l'extraction de la pepsine du lapin.

D'autre part, cette enzyme montre une grande stabilité à ces valeurs de pH. Ceci est en accord avec les résultats de Fox *et al.*, (1977), qui rapportent que la pepsine ovine ne présente pas de perte significative d'activité dans la marge de pH 1,0 - 4,5 pendant 24 h à 20°C.

Par ailleurs, lorsque la macération est réalisée à 25°C et 30°C un caractère collant et glaireux de la solution extractive est observé. En fin de macération subsistait une quantité de résidu qui par leur nature gluante retenait une quantité importante de liquide, ce qui explique le faible rendement d'extraction obtenu comme le montre la figure 6.

Quand la macération est réalisée à 35°C et 40°C, le caractère collant disparaît, mais un autre phénomène est observé ; la désinté-

gration des broyat de caillettes. Un volume d'extrait brut très important est obtenu, aboutissant à un rendement d'extraction élevé. Ces résultats sont en accord avec l'ensemble des observations de Valles et Furet (1977). D'après ces auteurs, ces observations peuvent être attribués en partie à l'abondance du collagène présent dans le tissu musculaire des caillettes.

Il est à noter, qu'après 6 heures de macération à 40°C, un phénomène de destruction de l'enzyme intervient se traduisant par une diminution de l'activité coagulante et du rendement. Ce phénomène de destruction des protéases gastriques a déjà été décrit en 1972, par Valles et Mocquot dans une étude similaire. Ils ont montré une perte d'activité après 24 heures de macération à 50°C. Enfin l'application de cette méthode selon les conditions optimales obtenues pour la préparation de la pepsine ovine présente plusieurs avantages qui méritent d'être cités :

- C'est une méthode qui ne comporte aucun gaspillage de caillettes, puisque la macération conduite selon la méthode adoptée entraîne la désintégration totale des tissus et par conséquent, il n'y a pas lieu de procéder à des extractions successives en vue de l'épuisement des caillettes comme c'est le cas pour les macérations dans la saumure ;
- C'est une méthode qui ne nécessite aucun traitement comportant l'addition d'antiseptique ni de clarification.

Toute fois, la variation des concentrations enzymatiques entre les différents lots n'a

pas été prise en considération, la provenance de ces caillettes n'ayant pas au départ, été définie. Des travaux anciens ont montré l'influence des facteurs tel que la race, l'âge, et l'alimentation sur le contenu enzymatique des caillettes (Garnot *et al.*, 1974 ; 1977 ; Valles et Furet, 1981).

Les conditions de nettoyage des caillettes au niveau des abattoirs sont un autre facteur qui semble, conditionner le contenu enzymatique des caillettes avant l'extraction.

En effet, la préparation des caillettes doit être limitée à un lavage à l'eau courante sous une légère pression. Selon Mann (1963), il faut éviter l'utilisation de l'eau chaude et le nettoyage à l'aide d'une brosse, qui entraîne une dissolution rapide de la pepsine et une perte d'activité et de rendement d'extraction.

Par ailleurs, la caractérisation de l'extrait enzymatique montre une activité coagulante qui varie de 5-7 UP/ ml pour une concentration en protéines qui avoisine les 35 mg/ml. Ces résultats semblent en accord avec les résultats de Fox *et al.*, (1977), et Virto *et al.*, (2003) ayant étudié l'extrait enzymatique de pepsine ovine obtenu traditionnellement.

CONCLUSION

La valorisation des caillettes d'ovins adultes en vue de la préparation de la pepsine ovine et la caractérisation de son activité coagulante sont les objectifs principaux recherchés lors de cette étude.

La méthode d'extraction mise au point consiste en la macération d'un poids de caillette broyées dans une solution acidifiée 0,2 M de HCl selon le rapport 8/10 (w/w). Le mélange est porté à une température de 35°C pendant une durée de 96 heures.

Cette méthode d'extraction a permis d'obtenir des rendements d'extraction plus intéressants par rapport aux autres méthodes testées et présente certains avantages en l'occurrence, le maintien du jus de macération dans des conditions ($\text{pH} \leq 2$) qui limitent les risques de contamination microbienne pendant toute la durée d'incubation, et ce contrairement aux macérations conduites dans des saumures à des températures moyennes avec lesquelles, il est très difficile d'obtenir des extraits exempts de contaminations microbiennes en absence de conservateurs.

A ce stade de notre étude, et sans préjuger des résultats obtenus, nous pouvons affirmer que les caillettes d'ovins constituent une source potentielle de pepsine qui peut substituer, en partie, la présure classique. La méthode d'extraction adoptée peut être employée à plus grande échelle, néanmoins l'utilisation des caillettes ovines pose le problème de leur collecte. Enfin, l'utilisation de la pepsine ovine en tant que substitut de la présure est conditionnée par la possibilité de la préparation de cette protéase de manière stable et continue d'une part, et d'autre part des propriétés technologiques qui caractérise cette enzyme.

En conséquence, il ya lieu d'envisager une étude sur les propriétés physico-chimique

de cet extrait coagulant et de son aptitude fromagère afin de pouvoir répondre à la question de son emploi en fromagerie.

Références bibliographiques

- Abd-El-Rahman A.M., Madkor S.A., Shalabi S.I. et Metwali N.H., 1990 : Rabbit pepsin as a rennet substitute. I- Extraction, Purification and characterization of the enzyme. *Minia. J. Agric. Res. Dev.* Vol. 12. n° 3, 1685-1702.
- Anifantakis E. et Green M., 1980: Preparation and properties of rennet from Lamb's and Kid's abomasums. *J. Dairy. Res.* 47, pp : 221 - 230.
- Collin, J ; C., Grappin, R., et Legraet, Y., (1977). Etude de la méthode de mesure selon Berridge du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique . *Rev . Lait . Fr.* n° 335, 389 394.
- Cuvellier G.F., 1999 : Production des enzymes. In. *Biotechnology.* 5 Ed. C. Scriban; pp : 351-364.
- Fox, P.E., Whitaker, J.R., O'leary, P.A., 1977 : Isolation and characterization of sheep pepsin. *Biochem. J.* 161, pp : 389-398.
- Garnot P., Toullec P., Thapon J. L., Martin P., Minh-Thu-Hoang, Matheu, C. M., et Ribadeau-Dumas B., 1977 : Influence of age dietary protein and weaning on calf abomasa enzymic secretion. *J. Dairy Res.* n° 44, pp : 9-23.

Garnot P., Valles E., Thapon J.L., Toullec R., Tomasone R., et Ribadeau-Dumas B., 1974: Influence of dietary proteins on rennin and pepsin content of préruminant calf veil. *J. Dairy. Res.* 41, pp : 19-23.

Goursaud J., 1999 : Réacteurs enzymatiques à enzymes libres et à enzymes immobilisées. In. *Biotechnology.* 5 Ed. R. Scriban, pp : 376-390.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N. J., Farr, A.I., Randall, R. J., (1951). Protein measurement with the Follin phenol reagent. *J. Biol. chem.*, 193, 265-275.

Mann I., 1963 : Les glandes. In. *Traitements et utilisation des sous-produits.* Col FAO.

O'leary P.A. et Fox P.F., 1975 : A Procedure for the isolation of gastric enzymes. *J. Dairy. Res.*, n°42, pp : 445-451.

Ramet J. P., 1997 : Les agents de la transformation du lait. In. *Le Fromage de la science à l'assurance - qualité.* 3 Ed. A. Eck et J.C. Gillis. TEC et DOC. Lavoisier. *Statistiques du Commerce Extérieur.*, 2002 : Importations de présures et ses concentras.

Tsouli J., 1974 : Etude comparée de l'activité enzymatique de trois variétés d'artichauts du genre *Cynara cardunculus* L. sur la coagulation du lait. *Lait.* Juillet - Août. n° 537.

Valles E. et Furet U.P., 1977 : Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine. I. Méthodes d'extraction. *Lait.* Nov-Dec. n° 569-570.

Valles E. et Furet J.P., 1981 : Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine. II - Influence de la race, de l'âge et du sexe sur leur contenu enzymatique. *Lait.* n° 61, pp : 590 - 618.

Valles E. et Mocquot G., 1972 : Etude sur la technique de préparation de la présure utilisée dans les fabrications traditionnelles d'emmental. *Lait.* Mai- juin, pp : 515-516.

Virto M., Chavarria F., Bustamantea M.A., Barronb L.J.R., Aramburuc Vicented M.S., Perez-Elortondoc F.J., Albisuc M., and M. de Renobalesa, 2003. Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and favour. *International Dairy Journal*, 13, 391-399.