



UNIVERSITE DE LILLE 1

**Ecole Doctorale Science de la Matière du
Rayonnement et de l'Environnement
Laboratoire des Procédés Biologiques
Génie Enzymatique et Microbien**



UNIVERSITE DE NGAOUNDERE

**Ecole Nationale Supérieure des
Sciences Agro-Industrielles
Laboratoire de Biophysique et de
Biochimie Alimentaire et Nutrition**

**Thèse en Cotutelle présentée pour l'obtention du diplôme de:
Docteur en Sciences Ingénierie des Fonctions Biologiques de l'Université de Lille1
Docteur Ph.D en Sciences Alimentaires et Nutrition de l'Université de Ngaoundéré**

Par:

BEKA Robert Germain

DEA en Sciences Alimentaires et Nutrition

**Une alternative végétale en fromagerie:
Préparation d'un extrait coagulant à partir des fruits de *Balanites aegyptiaca*;
Etude biochimique et application technologique**

Soutenue le 21 Novembre 2011 à l'Université de Lille1

Devant le jury composé de:

Dhulster Pascal, *Professeur à l'Université de Lille1*, Président;
Gaillard Jean-Luc, *Professeur à l'Université de Caen*, Rapporteur;
Amvam Zollo Paul Henri, *Professeur à l'Université de Yaoundé 1*, Rapporteur;
Vercaigne-Marko Dominique, *Professeur à l'Université de Lille1*, Co-Directrice de thèse;
Mbofung Carl Moses, *Professeur à l'Université de Ngaoundéré*, Co-directeur de thèse;
Libouga David Gabriel, *Maître de Conférences à l'Université de Ngaoundéré*, Co-directeur de thèse;
Guillochon Didier, *Professeur Emérite à l'Université de Lille1*, Invité.

DEDICACE

A:

mon épouse IYAWA NADOCKO Alice;

ma fille BAWA BEKA Spéciose Loreнна Axelle;

mon fils SERVICI BEKA Jaebets Norris.

En mémoire des regrettés:

AOUTA Pauline Houma;

SERVICI BEKA;

SAMAKI Alain Claude.

J'exprime toute ma gratitude, mon amour et ma reconnaissance pour ce que vous représentez pour moi et pour ce que vous avez fait pour moi depuis les premiers instants de ma vie jusqu'à ce jour.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une part de la bourse de formation à la recherche de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). Celle-ci m'a permis de mener le travail en alternance entre l'Université de Ngaoundéré au Cameroun et l'Université de Lille1 en France; et d'autre part et de la bourse de l'Université de Lille1.

L'impression de ce travail me donne une occasion pour adresser tous mes remerciements:

Au Professeur Phillipe Rollet, Président de l'Université de Lille1 pour m'avoir accordé l'autorisation à m'inscrire dans son institution, pour avoir signé ma cotutelle entre l'Université de Ngaoundéré au Cameroun et l'Université de Lille1 en France et pour son soutien financier à travers le financement de la Région Nord Pas de Calais ce qui a permis de finaliser mes travaux de thèse;

Au Professeur Paul Henri Amvam Zollo, Recteur de l'Université de Ngaoundéré pour m'avoir accordé la permission d'absence et la possibilité de continuer mes études en cotutelle entre l'Université de Ngaoundéré au Cameroun et l'Université de Lille1 en France;

Au Professeur Pascal Dhulster, Directeur du Laboratoire ProBioGEM pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour la confiance placée en moi depuis deux ans;

Au Professeur Carl M. Mbofung, Directeur de Laboratoire de Biochimie et de Biophysique Alimentaire et Nutrition de l'ENSAI de Ngaoundéré pour m'avoir accepté dans son école et dans son laboratoire;

Au Professeur Didier Guillochon pour ses orientations et ses conseils, qu'il trouve ici mes respectueuses considérations;

A mes Directeurs de Thèse, les Professeurs Dominique Vercaigne-Marko, David Gabriel Libouga et Carl Moses Mbofung, vous m'avez fait confiance en acceptant d'encadrer ce travail. Recevez ma très haute considération ainsi que toute ma gratitude;

A Monsieur Jean Claude Michalski, Directeur de recherche à l'INSERM et Directeur de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'USTL pour m'avoir accueilli au sein de son unité;

Au professeur Philippe Jacques, responsable de la filière Ingénierie des Fonctions Biologiques de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement pour avoir accepté mon inscription;

A Madame Marie-Christine Slomianny pour m'avoir dirigé dans mes travaux de glycoprotéomique. Recevez mes sincères remerciements;

Aux Docteurs François Krier, Krasimir Dimitrov, Françoise Coucheney, Frédérique Gancel, Guillaume Leflem, Rozenn Ravallec et Renato Froideveaux, pour leur dévouement, leur promptitude et leur assistance particulière;

Au Professeur Naima Arroume et au Dr Patrice Mary, pour leurs différents conseils;

Au Professeur Robert Ndjouenkeu, Chef de Département des Sciences Alimentaires et Nutrition de l'ENSAI et aux enseignants de l'ENSAI qui ont contribué à mieux orienter mon travail;

A Mademoiselle Anne Delmont pour son initiation et sa contribution à la chromatographie en phase gazeuse;

Aux Messieurs Laurent Bonneau et Bertrand Fertin pour leurs conseils et leur assistance lors des différentes manipulations;

Aux demoiselles Pauline Coquel, Anne-sophie Pernak, Delphine Coinon, Valentine Paquier, Cathy Di-Marko et Camille Lanos pour avoir participé à ce travail comme stagiaires;

A Madame Cathy Oublion pour sa gentillesse et sa disponibilité à résoudre les problèmes d'accueil et administratifs au Laboratoire ProBioGEM;

A tous les étudiants doctorants et post-doctorants pour les bons moments passés ensemble. Je pense notamment à Valentin, Magali, Thomas, Richard, Emmanuel, Estelle, Faiza, Joany, Ali, Boukar, Pascal, Pascale, François, Lucie, Arthur, Omar, Aurélien, Mathieu, Layal, Sameh, Wallah, Parvin, Fatah, Hassan, Marwan, Amirouche, Cedrick, Jovana, Aleandro, Dordin, Himeida, Rommelle, Josiane;

A ma famille et à mes amis pour leur soutien et leurs encouragements. Je pense particulièrement à Madame Sadou née Bawa lady, à la famille Nganda Adamou, au colonel Bangda, à Adrienne Roseline, à Temandang Amina, à Mukamana Espérance, à Baba Elisabeth, à Duffard Ndjouga et à Marie-Félicité;

A Bitchik Ntep Dominique Ernest pour son soutien spirituel, financier et moral;

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de cette étude;

A Spéciose, Jaebets, Alice, Hamboa, Inna, Nalao, Donn, Alim, Docta, Noikila, Hamadjam, Thenn, Babou, sans vous je ne serais pas là aujourd'hui.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATION

- Publications

Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*.

Libouga D.G., Vercaigne-Marko D., Djangal S.L., Choukambou I., Ebangi A.L., Messine Ombionyo, **Beka R.G.**, Aboubakar T.M. and Guillochon D.

Tropicultura, (2006), **24**, 4, 229-238.

Glycosyl part identified within *Balanites aegyptiaca* fruit protease

Beka R. G., Guiama V. D., Delmont A., Donn P., Slomianny M.-C., Libouga D. G., Mbofung C. M., Guillochon D. and Vercaigne-Marko D.

International Journal of Biological Macromolecules (2011), **49**, 397– 401.

De plus, une publication est soumise actuellement et deux autres sont en préparation.

- Communication par affiche

Beka R. G., Pernac A.S., Coinon D., Paquier V., Libouga D., Guillochon D. et Vercaigne-Marko D.

Purification et caractérisation d'une protéase coagulant le lait et extraite des fruits d'un arbre africain: *Balanites aegyptiaca*

XVème Colloque National de la Recherche Universitaire en IUT, Villeneuve d'Ascq (France) 8-10 Juin 2009.

SOMMAIRE

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATION.....	iv
SOMMAIRE	v
LISTE DES ABREVIATIONS	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
RESUME.....	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCTION.....	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	6
1 ^{ère} partie.....	7
<i>RAPPELS SUR LA TECHNOLOGIE FROMAGERE</i>	7
1- LE LAIT ET SA COMPOSITION.....	7
1.1- Caractères physiques du lait.....	7
1.2- Composition chimique du lait	8
1.2.1- Les glucides.....	8
1.2.2- Les lipides	9
1.2.3- Les composés azotés	9
1.2.4- Les éléments minéraux.....	11
2- LA COAGULATION DU LAIT	12
2.1- La coagulation acide	12
2.2- La coagulation enzymatique.....	12
2.2.1- Les enzymes coagulantes d'origine animale	14
2.2.2- Les enzymes coagulantes d'origine microbienne	15
2.3- La coagulation mixte	16
3- LA FABRICATION DES FROMAGES	16
3.1 Principes généraux de fabrication des fromages.....	17

3.2 Technologie de fabrication des fromages à pâtes fraîches	19
3.3- Valeur nutritive des fromages	20
2 ^{ème} partie.....	21
<i>PERSPECTIVES DE LA COAGULATION VEGETALE</i>	21
1- RAPPELS SUR LES ENZYMES COAGULANTS D'ORIGINE VEGETALE.....	21
1.1- généralités sur les extraits coagulants végétaux	21
1.2- Principales classes des protéases coagulantes	22
2- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LE <i>BALANITES AEGYPTIACA</i>	25
2.1- Systématique et dénomination.....	25
2.2- Aire de répartition et écologie	25
2.3- Description et biologie.....	25
2.4- Le fruit.	26
2.5- Quelques utilisations de <i>B. aegyptiaca</i>	27
MATERIEL ET METHODES	30
1- METHODES DE PREPARATION.....	31
1.1-Préparation de l'extrait pour la purification	31
1.2-Saturation et précipitation au sulfate d'ammonium.....	31
1.3-Dialyse..	31
1.4-Ultrafiltration frontale et tangentielle	32
1.5-Décoloration au charbon végétal actif	32
1.6-Purification.....	32
1.6.1-purification par chromatographie d'échange d'ions	32
1.6.2-Purification par chromatographie d'exclusion moléculaire.....	33
1.6.3-Purification par chromatographie d'affinité sur gel de concanavaline A.....	33
2-TECHNIQUES D'ANALYSES.....	34
2.1-Analyses.....	34
2.2-Electrophorèse en <i>SDS-PAGE</i>	35
2.3-Préparation du gel de gélatine	35

2.4-Détermination des pI par électrophorèse bidimensionnelle	35
2.5-Détection et différenciation des glycanes des extraits brut et purifié	37
2.6-Détermination des peptides par spectrométrie de masse.....	38
3-CARACTERISATION ENZYMATIQUE	40
3.1- Mesure de l'activité enzymatique avec l'azocaséine	40
3.2- Mesure de l'activité enzymatique avec l'hémoglobine.....	41
3.3-Dosage des fonctions –NH ₂ par la méthode à l'Ortho-PhtalaldiAldéhyde (OPA).....	41
3.4 - Digestion des caséines	42
3.5 -Détermination du pH optimum.....	42
3.6-Détermination de la température optimale	42
3.7-Détermination de la stabilité thermique	43
3.8- Détermination de la spécificité de la protéase sur des substrats synthétiques	43
3.9-Utilisation d'inhibiteurs de protéases.....	44
4-FABRICATION DES FROMAGES	45
4.1- Etude microbiologique et assainissement de l'extrait	45
4.2-Fabrication des fromages et mesures texturales	46
4.3-Aromatisation des fromages par les huiles essentielles	49
4.4-Analyse sensorielle	50
4.5-Analyses statistiques	51
RESULTATS ET DISCUSSION	52
1 ^{ère} partie.....	53
<i>BIOCHIMIE DE L'EXTRAIT COAGULANT</i>	53
1- DETERMINATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION: PREPARATION D'UN EXTRAIT BRUT	53
1.1- Effet du NaCl	53
1.2- Effet du pH.....	55
1.3- Décoloration de l'extrait brut au NaCl.....	57
2-MISE EN EVIDENCE DE PLUSIEURS ACTIVITES COAGULANTES DANS L'EXTRAIT BRUT	59
2.1-Effet de la concentration de l'enzyme	59

2.2 –Effet de la température	60
2.3-Détermination de la stabilité thermique	62
2.4- Effet du pH.....	63
2.5-Effet des inhibiteurs sur les enzymes des extraits	64
3-PURIFICATION ET CARACTERISATION D'UNE PROTEASE ACIDE	65
3-1 Purification par chromatographie d'échange d'ions	65
3-2 -Purification par chromatographie d'affinité.....	67
3-3 Détermination du pH optimum.....	68
4-PURIFICATION ET CARACTERISATION D'UNE PROTEASE A SERINE.....	69
4 1- Chromatographie d'échange d'ions	69
4.2 Purification par chromatographie d'exclusion.....	74
4.3 Détermination du pH optimum de la protéase	75
5- ACTIVITES ENZYMATIQUES DES DEUX PROTEASES	76
5-1 Révélation de l'activité protéolytique des fractions.....	76
5-2 Activité sur les caséines	77
5-3 Activité sur des substrats synthétiques	80
5-4 Action d'inhibiteurs spécifiques	82
6 – CARACTERISTIQUES STRUCTURALES	83
6-1 Détermination des points isoélectriques	83
6-2 Séquences peptidiques partielles	84
6-3 Structures glycosidiques	88
6-3-1 structures glycaniques.....	88
6-3-2 Détermination de la composition en monosaccharides.....	91
2 ^{ème} partie	101
<i>APPLICATION EN FROMAGERIE</i>	101
1-CARACTERISATION MICROBIOLOGIQUE ET ASSAINISSEMENT DE L'EXTRAIT	102
1.1-Caractérisation microbiologique de l'extrait.....	102
1.2 - Assainissement de l'extrait.....	103

2 - FABRICATION DES FROMAGES	106
3- PROPRIETES TEXTURALES DES FROMAGES.....	107
4- AROMATISATION, DEGUSTATION ET ANALYSE SENSORIELLE	110
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	113
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	116

LISTE DES ABREVIATIONS

B. aegyptiaca: *Balanites aegyptiaca*

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

E. coli: *Escherichia coli*

ENSAI: Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro-Industrielles

GC/FID: Chromatographie en phase gazeuse par détecteur à ionisation de flamme

GC/MS-EI: chromatographie en phase gazeuse par impact d'électrons

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique (France)

IRAD: Institut de la Recherche Agronomique pour le Développement (Cameroun)

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight

MINEPIA: Ministère de l'Élevage des Pêches et des Industries Animales

NCBI: National Center for Biotechnology Information

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

UniProtKB: Universal Protein Knowledge Base

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques de constituants majeurs de caséines	10
Tableau 2: Caractéristiques des protéines solubles du lait	11
Tableau 3: Utilisations de <i>B. aegyptiaca</i> en pharmacopée traditionnelle	28
Tableau 4: Composition des tampons de reprise et de réhydratation.....	36
Tableau 5: Programme d'électrophorèse Biorad IPG	36
Tableau 6: Composition des Tampons d'équilibration	37
Tableau 7: Inhibiteurs et classes de protéases	44
Tableau 8: Conditions expérimentales du test TPA.....	48
Tableau 9: Fiche d'analyse sensorielle	51
Tableau 10: Comparaison des effets des extractions par l'eau et NaCl sur l'activité coagulante	54
Tableau 11: Activité coagulante de l'extrait après diafiltration à pH variable	55
Tableau 12: purification partielle de l'extrait au NaCl par décoloration au charbon actif.....	58
Tableau 13: Effet des inhibiteurs sur l'extrait brut.....	64
Tableau 14: Récapitulatif extraction-purification à pH 7,6.....	70
Tableau 15: Purification à pH 8,1.....	72
Tableau 16: Vitesse initiale d'hydrolyse de Suc-Ala ₂ -Pro-Phe-pNA	82
Tableau 17: Effet des inhibiteurs spécifiques.....	82
Tableau 18: Séquences peptidiques et identification des types de protéases	87
Tableau 19: Détection des glycanes par des lectines spécifiques	91
Tableau 20: Ions caractéristiques des principaux monosaccharides de l'extrait par dérivation	94
Tableau 21: Récapitulatif des caractéristiques des protéases	100
Tableau 22: Caractéristiques microbiologiques de l'extrait de <i>B. aegyptiaca</i>	102
Tableau 23: Effet du métabisulfite de sodium et de l'eau de javel sur <i>E. coli</i>	104
Tableau 24: Effet de l'eau de javel sur les graines contaminées	105
Tableau 25: Caractéristiques des fromages	107
Tableau 26: Propriétés rhéologiques et texturales des fromages	109
Tableau 27: Acceptabilité des fromages	111

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Femelle et veaux de Zébu (<i>Bos indicus</i>) dans la localité de Ngaoundéré	7
Figure 2: Schéma de la structure secondaire de la caséine κ	13
Figure 3: Les phases de la coagulation enzymatique du lait	14
Figure 4: Un pied de <i>Balanites aegyptiaca</i>	26
Figure 5: Fruit de <i>B. aegyptiaca</i>	26
Figure 6: Schéma du fruit de <i>B. aegyptiaca</i> (Tubiana, 1993).....	27
Figure 7: Principe du MALDI	39
Figure 8: Schéma du composé sulfanilamide-azocaséine	40
Figure 9: Schéma de l'hydrolyse du N-Suc-Ala ₂ -Pro-Phe-pNa	44
Figure 10: Diagramme de fabrication des fromages	47
Figure 11: Rhizome de <i>Z. officinalis</i>	49
Figure 12: Feuilles d' <i>O. gratissimum</i>	49
Figure 13: Electrophorèse de l'extrait avec et sans NaCl	54
Figure 14: Electrophorèse de l'extrait brut avec et sans NaCl comparée avec les extraits diafiltrés et concentrés à différents pH.....	56
Figure 15: Effet de la concentration de l'extrait brut sur la coagulation du lait	59
Figure 16: Température optimale de l'extrait brut.....	60
Figure 17: Influence de la température du lait sur le temps de coagulation	61
Figure 18: Courbe de stabilité thermique de l'extrait brut	62
Figure 19: pH optimum de l'extrait brut. (A) l'hémoglobine bovine, (B) azocaséine.....	63
Figure 20: Chromatogramme de la purification à pH acide sur Q-Sepharose pH 6	65
Figure 21: Electrophorèse du Pic 2 du chromatogramme (Q-Sepharose pH 6)	66
Figure 22: Electrophorèse de la purification sur SP-sepharose	66
Figure 23: Electrophorèse de la purification sur gel de Concanavaline A Sepharose	67
Figure 24: Etude du pH optimal de la protéase avec l'azocaséine comme substrat.	68
Figure 25: Chromatogramme obtenu sur Q-Sepharose.....	69
Figure 26: Electrophorèse de la purification à pH 7,6	71

Figure 27: Chromatogramme de la purification à pH 8,1 sur Q-Sepharose	72
Figure 28: Electrophorèse de la purification à pH 8,1	73
Figure 29: Chromatogramme de la purification à pH 8,1 sur Superdex 75.....	74
Figure 30: Electrophorèse de la purification à pH 8,1 sur Superdex 75	74
Figure 31: pH optimum de l'extrait brut (pH 8,1)	75
Figure 32: pH optimum du Pic2 (Q-Sepharose)	75
Figure 33: Gel à la gélatine à pH 5 et à pH 7	77
Figure 34: Digestion des caséines α et β par les fractions brutes et purifiées de l'extrait de <i>B. aegyptiaca</i>	78
Figure 35: Digestion de la caséine κ par les fractions brutes et purifiées de l'extrait de <i>B. aegyptiaca</i>	79
Figure 36: Cinétique d'hydrolyse du H-Pro-Thr-Glu-Phe-p(NO ₂)-Phe-Arg-Leu-OH.....	80
Figure 37: Cinétique d'hydrolyse du N-Suc-Ala ₂ -Pro-Phe-pNA par la protéase à sérine de l'extrait de <i>B. aegyptiaca</i> en fonction du pH	81
Figure 38: Electrophorèse bidimensionnelle du Pic 2 Q-Sepharose pH 7,6	83
Figure 39: Spectre de masse MALDI-TOF de la bande de 28 kDa	85
Figure 40: Spectre de masse MALDI-TOF de la bande de 38 kDa.....	85
Figure 41: Spectre de masse MALDI-TOF de la bande de 70 kDa	86
Figure 42: Spectre de masse MALDI-TOF de la bande de 85 kDa	86
Figure 43: Immunodétection par la ConA sur PVDF	88
Figure 44: Immunodétection par le GNA sur nitrocellulose	89
Figure 45: Immunodétection par Aleuria sur PVDF.....	90
Figure 46: Chromatogrammes GC/FID de l'extrait brut avant et après précipitation des protéines	92
Figure 47: Chromatogramme GC/FID de l'extrait purifié après précipitation à l'acétone	92
Figure 48: Chromatogrammes GC/MS-EI des extraits bruts et purifiés	93
Figure 49: Profils chromatographiques d'extraction des ions caractéristiques en fonction des temps de rétention.....	94
Figure 50: Profil d'extraction des hexoses (Gal et Man) en combinant les temps de rétention et les ions spécifiques.....	95

Figure 51: Profil d'extraction des pentoses (Ara et Xyl) en fonction des temps de rétention et des ions spécifiques.....	95
Figure 52: Profil d'extraction des deoxyhexoses (Rham) en fonction des temps de rétention et des ions spécifiques.....	96
Figure 53: Profil d'extraction des acides uroniques (GluA) en fonction des temps de rétention et des ions spécifiques.....	96
Figure 54: Spectre MS-EI des hexoses. a: spectre du Gal, b: spectre du Man	96
Figure 55: Spectre MS-EI du pentose. a: spectre de l'Ara b: spectre du Xyl.....	97
Figure 56: Spectre MS-EI des acides uroniques.....	97
Figure 57: Comparaison des Spectres MS-EI de l'extrait et des standards ManNAc et GlcNAc	98
Figure 58: Coagulum obtenus avec la présure et l'extrait végétal	106
Figure 59: Profils obtenus lors du test TPA sur des fromages	108
Figure 60: Préférence générale des fromages.....	111

RESUME

Dans le cadre de la recherche d'un succédané à la présure, la pulpe des fruits de *B. aegyptiaca* a été utilisée comme source d'enzyme coagulant. Les fruits ont été assainis par lavage et traitement à l'eau de javel. Une solution de NaCl 5 % a été utilisée comme milieu d'extraction. Le processus de purification est constitué des étapes suivantes: clarification au charbon actif et par diafiltration, chromatographies d'exclusion et d'échanges d'ions. Des études rhéologiques physico-chimiques et sensorielles ont été effectuées sur des fromages obtenus avec cet extrait. Les résultats de cette étude montrent qu'une protéase de 38 kDa a été isolée en milieu acide et trois protéases de 28, 70 et 85 kDa en milieu basique. Les tests sur les inhibiteurs, les analyses en MALDI-TOF couplée à la LC-MS et la digestion du gel de gélatine montrent que la protéase isolée en milieu acide est une protéase à acide aspartique tandis que celles isolées en milieu basique sont des protéases à sérine. Les protéases isolées sont capables d'hydrolyser les caséines α , β et κ . Le galactose, l'arabinose, le rhamnose, le xylose, le mannose, l'acide glucuronique et les hexosamines ont été détectés sur la partie glycosylée de ces protéases par GC/FID et GC/MS-EI. Cependant, la détection aux lectines a montré la présence du mannose et du fucose. Les paramètres physico-chimiques et organoleptiques montrent que le fromage obtenu avec l'extrait est comparable au fromage présure. Cette étude a montré que les protéases de l'extrait de la pulpe de *Balanites aegyptiaca* sont capables de remplacer la présure dans la fabrication des fromages locaux. Ce travail peut contribuer significativement au développement économique des localités agro-pastorales du Cameroun.

Mots clés: *Balanites aegyptiaca*, enzyme coagulant, fromages, aspartique protéase, sérine protéase, glycoprotéine.

ABSTRACT

In the framework of the search for a substitute to calf rennet, the pulp of the *B.aegyptiaca* fruits was used as source of milk-clotting enzyme. The fruits were cleaned by washing and treatment with sodium hypochlorite. The NaCl 5 % solution was used as medium of extraction. The purification process was made up of the following stages: clarification with activated charcoal and diafiltration, exclusion and ion exchange chromatographies. Physicochemical, rheological and sensory properties of cheese obtained with this vegetable rennet were studied. The results of this study showed that a protease of 38 kDa was extracted in acid medium and three proteases of 28, 70 and 85 kDa in basic medium. The inhibition test, MALDI-TOF analysis coupled with LC-MS and gelatin digestion by protease showed that the protease extracted in acid medium is aspartic while those isolated in basic medium are serine proteases. The isolated proteases are able to hydrolyze α , β and κ caseins. Galactose, arabinose, rhamnose, xylose, mannose, glucuronic acid and hexosamines were detected on the glycosyl part of these proteases by GC/FID and GC/MS-EI. However, detection with the lectins showed in more the presence of mannose and fucose. The physicochemical and organoleptic parameters showed that the cheese obtained with the extract is comparable with the standard cheese. This study showed that the proteases of the extract of the pulp of *Balanites aegyptiaca* are able to replace calf rennet in the manufacture of local cheeses. This work can contribute significantly to the economic development of the agro-pastoral localities of Cameroon.

Key words: *Balanites aegyptiaca*, milk-clotting enzyme, cheeses, aspartic protease, serine protease, glycoprotein.

INTRODUCTION

Le secteur de l'élevage s'impose aujourd'hui comme une valeur sûre et considérable de l'économie camerounaise. Il participe ainsi à près de 165 milliards de francs CFA (communauté financière africaine) à la formation du PIB (produit intérieur brut). Il procure des revenus à environ 30 % de la population rurale et est dominé par un système traditionnel de production laitière. L'élevage représente ainsi une activité identitaire pour les éleveurs traditionnels et reste dominé par le mode extensif de conduite des troupeaux en fonction de la disponibilité des fourrages (Ndambi *et coll.*, 2007).

Au Cameroun la transformation laitière est essentiellement basée sur le lait de zébu (*Bos indicus*). Selon les estimations du ministère de l'élevage des pêches et des industries animales du Cameroun (MINEPIA) en 2008, le cheptel national bovin représente environ 6 millions de têtes parmi lesquelles on retrouve environ 1 200 000 vaches en lactation pour une production annuelle avoisinant 189 300 tonnes de lait. Cependant, cette production est fortement dépendante de la race, des conditions d'élevage et de l'alimentation.

Les races de bovin rencontrées sont essentiellement les zébus (*Bos indicus*); les bœufs (*Bos taurus*) en nombre très restreint sont beaucoup plus utilisés comme animaux de labours. Parmi les zébus, on distingue le *Goudhali*, le *Bororo* et le zébu métis. Les femelles *Goudhali* communément appelées zébus Peulh camerounaises sont d'assez bonnes laitières avec 5 à 7 kg de lait en moyenne par lactation. Chez ce zébu, on distingue la variété *Ngaoundéré* remarquable par une corpulence plus musclée, une bosse très développée tombante et flasque, et possédant une robe généralement rouge et blanche d'une part, ou rouge continue sur le dos ou tachetée sur les flancs d'autres part; la variété *Banyo* généralement plus grande, avec une silhouette plus fine et des cornes plus longues et présentant des grandes tâches blanches sur la face le ventre et les flancs. Le *Bororo* ou *Bororodji* sous son appellation locale est un animal de grande taille ayant de grandes cornes en lyre haute qui produit en moyenne 2 kg de lait par jour. Il présente 2 variétés: la variété *Mbodeeji* des *Djafoun* ou *Djafondji* encore appelé "zébu bororo rouge" ou "*Red Longhorn*" et la variété *Akoudji* ou *Bororo* des *Akouen* aussi appelé "zébu bororo blanc" qui a une production journalière de lait supérieure ou égale à 4 kg. Parmi les zébus métis, on distingue ceux qui sont issus des croisements entre races locales notamment les *Mbakalledji* issus du croisement entre *Mbodeedji* et *Goudhali* et les *Suwakeedji* résultant du croisement entre les variétés *Akoudji* et *Goudhali*. La production laitière journalière de ces dernières se situe à 3,6 kg. Dans le souci d'améliorer les performances laitières, les pouvoirs publics ont introduit des races exotiques. C'est ainsi que le "*Wakwa*" qui est issu du croisement entre le *Goudhali* et le zébu Brahman importé des Etats-Unis d'Amérique est une

excellente race laitière dont la production journalière moyenne est de 15,75 kg, même si l'on observe de très grandes variations individuelles.

Les conditions d'élevage sont surtout favorables à la production de la viande et du cuir; le lait reste marginal dans l'ensemble et n'est utilisé qu'à l'échelon familial, car l'élevage est principalement exercé par les Foulbés (*Peuhls*) qui pratiquent un élevage de type sédentaire et transhumant, et par les *Bororos* éleveurs nomades qui vivent exclusivement des ressources d'élevage et déambulent sur des grandes distances. Dans l'Adamaoua, l'élevage demeure dans une large mesure un élevage traditionnel. On parle même dans certains cas "d'élevage sentimental".

La production laitière dépend aussi de l'alimentation des vaches, qui dépend elle-même des saisons. En effet, les facteurs climatiques défavorables, ont des conséquences directes sur la végétation naturelle qui est leur principal et bien souvent unique aliment.

Deux grandes régions sont favorables à l'élevage bovin au Cameroun. Il s'agit notamment de l'Adamaoua et du Nord-Ouest qui possèdent respectivement 30 % et 21 % du cheptel bovin national. Les régions de l'Extrême-Nord, du Nord et de l'Est totalisent environ 40 % de ce cheptel. Dans l'Adamaoua, l'élevage bovin est la principale activité du monde rural et occupe 20 % de la population (MINEPIA, 2006).

La consommation moyenne nationale de lait se chiffre à 26,25 kg de lait/habitant/an contre 34 kg en moyenne pour les pays en développement et 50 kg recommandé par l'OMS. Pour approcher ce seuil de consommation, il faudrait accroître la production nationale du simple au double. Une consommation de 260000 tonnes de litre est prévue d'ici 2015 pour l'ensemble de la population selon l'Association Citoyenne de Défense des Intérêts Collectifs (ACDIC, 2006).

Dans la région de l'Adamaoua, le lait subit trois types de transformation: en laits fermentés (*Kindirmou* et *Pendidam*) abondamment produits, en beurre (*lebol*) et en fromages (de type pâtes pressées cuites) qui sont produits en quantité négligeable. Cependant, les laits fermentés nécessitent obligatoirement une chaîne de froid, malgré cela leur durée de conservation reste relativement courte. Le fromage est un aliment qui permet de conserver les éléments essentiels du lait notamment le calcium et les protéines, sa faible teneur en eau facilite sa conservation et son transport.

Dans certaines régions d'Afrique, les fromages sont fabriqués à l'échelle artisanale ou fermière. Ces fromages sont fabriqués pour la plupart à partir de lait frais et d'extraits végétaux notamment le *Warangashi* au Bénin, le *Wara wara* au Nigeria, le *Wagasi* au Togo avec *Calotropis procera* (Kèkè, 2005; Elolo et Courdjo, 2005; Adetunji *et coll.*, 2008) et le *Jibna beida* au Soudan avec *Solanum dubium* (Yousif *et coll.*, 1996). Cependant, ils contribuent de manière significative au développement socio-économique et agropastoral de la localité, de la région et voire même du pays.

La fabrication des fromages fermiers tout comme celle des fromages industriels passe par des étapes communes dont la principale reste la coagulation du lait. La fabrication des fromages utilise des enzymes qui peuvent être d'origines diverses. L'extrait coagulant principalement utilisé dans la fabrication des fromages est la présure. D'autres sources d'enzymes ont été développées notamment à partir des moisissures. En Afrique du nord, en Amérique latine et en Europe des extraits coagulants ont été élaborés à partir des plantes notamment des feuilles de *Cynara* (Sidrach *et coll.*, 2005), des fleurs de *Centaurea calcitrapa* (Raposo et Domingos, 2008), de la sève de *Calotropis procera* (Adetunji *et coll.*, 2008) et des écorces d'*Ongokea gore* (Libouga, 2004). L'utilisation des feuilles, des écorces, des fleurs et de la sève pose un problème en ce qu'il contribue à la dégradation de l'écosystème déjà très fragilisé par les feux de brousse et le surpâturage; ce qui peut induire des changements climatiques (Hurault, 1975). Par ailleurs, l'utilisation de la présure par les fermiers présente des inconvénients: elle est très onéreuse et n'est pas à la portée du paysan. Il est possible de l'importer mais ses conditions d'approvisionnement restent difficiles et le produit est très souvent défectueux à l'arrivée; il est également impossible de la fabriquer localement à partir de la caillette des veaux car, selon le décret n°66/22/cor du 09 mars 1962 du ministère de l'agriculture et de l'élevage, l'abattage des jeunes ruminants est proscrit par la législation camerounaise afin de préserver le cheptel. Cependant, l'Institut de Recherche Agronomique pour le Développement (IRAD) a développé des techniques de fistulation des veaux pour extraire le jus de caillette; mais cette technique est trop lourde et le manque d'équipement microbiologique ne permet pas ainsi de produire une présure saine sans risque de contamination.

Beaucoup de chercheurs ont utilisé les fruits pour coaguler le lait: *Cucurbita pepo* (Barbosa, 1983), *Cucumis melo* (Yamagata *et Coll.*, 1989), *Centaurea calcitrapa* (Tavaria *et Coll.*, 1997), *Solanum dobium* (Yousif *et Coll.*, 1996) et des solanums de la flore camerounaise. L'utilisation des fruits pour fabriquer les fromages participe de la préservation de l'écosystème. Ainsi, nous nous sommes tournés vers les fruits de *Balanites aegyptiaca* (Libouga *et coll.*, 2006).

Le *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile (Balantiaceae, *alt*-Zygophyllaceae) est un arbre des zones sahéliennes, soudano-sahéliennes et répandu dans la partie septentrionale du Cameroun. Localement, l'extrait des fruits de *Balanites aegyptiaca* est utilisé pour épaissir les bouillies faites à base de lait. Les travaux précédemment effectués sur ce fruit ont montré que son mésocarpe contient des substances susceptibles de coaguler le lait (Libouga *et coll.*, 2006). L'extrait de ses fruits n'est pas toxique, ne contient pas de germes sulfito-réducteurs. Toutefois, les fromages obtenus avec cet extrait bien qu'acceptables, présentent un arrière goût amer.

Ce fruit peut ainsi jouer un rôle important dans la transformation laitière locale en raison de sa disponibilité dans leur environnement. De plus, il pourrait être d'un intérêt économique

important sur le marché local où il est surtout vendu pour être consommé comme "bonbon". La fabrication des fromages avec l'extrait des fruits de *Balanites aegyptiaca* peut ouvrir la voie pour sa valorisation en fromagerie tout en contribuant à réduire la pauvreté, en ajoutant une plus value au revenu des paysans. Par ailleurs, les fromages obtenus pourront intégrer les habitudes alimentaires paysannes et participer au développement de la filière fromagère encore très embryonnaire au Cameroun.

L'objectif principal de cette thèse est de purifier l'extrait du mésocarpe pour connaître les caractéristiques biochimiques du ou des principes actifs puis de préparer un extrait coagulant utilisable en fromagerie. Ces travaux devraient montrer l'intérêt de l'utilisation de l'extrait du mésocarpe des fruits de *Balanites aegyptiaca* comme succédané de la présure dans la fabrication des fromages et de déterminer les caractéristiques enzymologiques et physico-chimiques de la ou des protéase(s) coagulante(s).

Dans un premier temps, des rappels bibliographique présentent le lait dans sa généralité, la technologie de fabrication des fromages, les extraits coagulants, la classification des protéases selon leur mécanisme d'action et l'analyse ethnobotanique du *Balanites aegyptiaca*.

Une partie « Matériel et Méthodes » décrit ensuite toutes les techniques ayant permis la mise en œuvre de cette étude.

Le premier chapitre des Résultats est consacré à l'étude biochimique de l'extrait du mésocarpe de ces fruits.

La stratégie adoptée a été de chromatographier l'extrait de la pulpe du fruit de *Balanites aegyptiaca*. L'extrait brut aqueux des plantes a une composition complexe constituée d'un mélange de tanins, sucres, protéines et autres substances. Par ailleurs, le fruit de *Balanites aegyptiaca* possède un goût sucré et amer et les fromages obtenus à partir de l'extrait de ce fruit ont présenté un arrière goût amer. Au regard de ce constat, la purification de cet extrait coagulant est nécessaire afin de séparer des tanins, des polyphénols et d'autres substances pouvant interférer dans l'activité coagulante. Cette étape a permis d'isoler et d'identifier deux protéases responsables de l'activité coagulante, une protéase de type aspartique et une protéase à sérine. Quelques unes de leurs caractéristiques physico-chimiques ont été mises en évidence, telles que la masse moléculaire, la composition en sucre et la séquence primaire partielle. Certaines de leurs propriétés enzymatiques ont également été déterminées telles que le pH optimum d'activité, la température optimale et la spécificité.

Le deuxième chapitre des Résultats présente la possibilité d'utilisation de cet extrait de *Balanites aegyptiaca* pour la fabrication des fromages.

Généralement, les extraits coagulants issus des plantes ne sont pas toujours exempts de contamination microbienne vues les conditions de transport et de conservation de fruits après la récolte. La qualité microbiologique d'un fromage dépend de la charge microbienne contenue dans l'extrait coagulant; en effet l'utilisation d'un extrait sain contribue à l'obtention d'un fromage de qualité microbiologique acceptable. La mise au point d'une méthode d'assainissement de l'extrait avant son utilisation pour éviter tout risque de contamination est donc tout à fait justifiée.

La coagulation du lait à partir d'extraits issus des plantes ne donne pas toujours un fromage ayant les mêmes caractéristiques que ceux obtenus après coagulation à l'aide de la présure. Une étude du comportement rhéologique a été menée afin de prouver l'aptitude de l'extrait à produire des fromages respectant les critères de texture caractéristique.

Enfin, l'appréciation des fromages par leurs consommateurs est un critère important de l'étude. Ainsi, la présence d'arômes peut être un facteur très important pour l'acceptabilité des fromages obtenus avec les extraits végétaux car ceux-ci présentent des arômes pas toujours appréciés. L'aromatisation des fromages par des huiles essentielles issues d'épices locales a été réalisée pour améliorer le goût des fromages. Une analyse sensorielle a été menée pour tester l'efficacité de l'aromatisation sur l'acceptabilité des fromages.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1^{ère} partie

RAPPELS SUR LA TECHNOLOGIE FROMAGERE

1- LE LAIT ET SA COMPOSITION

Le lait est un liquide blanc sécrété par les glandes mammaires des femelles des mammifères (Encyclopédie Encarta, 2009). Le premier Congrès International pour la répression des fraudes alimentaires tenu à Genève en 1908 avait défini le lait comme un liquide biologique issu de la traite normale, totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum. La dénomination «lait» est acceptée pour les laits autres que celui de vaches (*Bos taurus*) seulement si la mention de l'espèce animale est précisée (Alais et Linden, 1997; Robert Jenness, 1999). C'est ainsi qu'au Cameroun, on retrouve essentiellement le lait de zébu. La figure 1 présente une femelle et des veaux de zébu (*Bos indicus*) qui constituent l'essentiel du cheptel bovin de la région de l'Adamaoua.



Figure 1: Femelle et veaux de Zébu (*Bos indicus*) dans la localité de Ngaoundéré

1.1- Caractères physiques du lait

Le lait est une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse contenant de nombreux éléments soit à l'état dissous, soit sous forme colloïdale. Le lait comporte quatre phases physiques (Arnold, 1983):

- la phase aqueuse qui renferme le lactose, les protéines du lactosérum, les vitamines hydrosolubles et les sels minéraux en solution;
- la phase colloïdale constituée principalement des micelles de caséines;

- la phase grasse composée des globules gras qui contiennent les triglycérides, les matières insaponifiables, les vitamines liposolubles;
- la phase gazeuse qui renferme du gaz carbonique et de l'oxygène dissous.

Le pH du lait n'est pas une valeur constante; il peut varier au cours du cycle de lactation et sous l'influence de l'alimentation. Le pH représente l'acidité actuelle du lait, c'est de celle-ci que dépendent des propriétés importantes comme la stabilité de la caséine. Le pH permet de déterminer le vieillissement du lait (Vétier *et coll.*, 2000). En général, le pH du lait est voisin de la neutralité (6,6 et 6,8), c'est la conséquence de la présence de la caséine et des anions phosphoriques et citrique (Alais, 1975).

La teneur en extrait sec total représente l'ensemble des substances à l'exclusion de l'eau. Celle du lait se situe entre les valeurs extrêmes très éloignées: de 100 à 600 g.L⁻¹ selon les espèces (Remeuf *et coll.*, 1991). Ces différences sont dues essentiellement à la teneur en matières grasses. En faisant abstraction de cette matière grasse, les écarts sont beaucoup moins importants: de 80 à 170 g.L⁻¹ (Alais et Linden, 1997). Le lait de vache présente un extrait sec total moyen de 125 à 130 g.L⁻¹ alors que le lait de zébu présente un extrait sec total qui varie de 140 à 160 g.L⁻¹ (Libouga *et coll.*, 2001).

1.2- Composition chimique du lait

1.2.1- Les glucides

Parmi les glucides du lait, on distingue les glucides libres et dialysables, d'un petit nombre de résidus d'hexoses ou de leurs dérivés et des glucides combinés aux glycoprotéines et non dialysables. Du point de vue chimique, on distingue les glucides neutres qui peuvent se trouver sous forme libre ou combinée, les glucides azotés toujours liés aux glucides neutres et les glucides acides toujours liés à des glucides neutres ou azotés (Desmazeand et Spinnler, 1998).

Le lactose est le seul glucide libre du lait existant en quantité importante dans presque tous les laits. C'est le constituant majeur de la matière sèche du lait. Dans le lait de vache, le lactose varie peu avec une teneur de 48 à 50 g.L⁻¹ (Alais, 1975) et pour les zébus, sa teneur moyenne est de 50 g.L⁻¹ de lait (Libouga *et coll.*, 2001). Sucre réducteur formé de l'association du glucose et du galactose, le lactose est le constituant du lait le plus rapidement attaqué par action microbienne. De nombreuses bactéries transforment le lactose en acide lactique. Cette réaction s'accompagne de la production de composés secondaires qui jouent un rôle dans la formation de l'arôme des produits laitiers: acétylméthylcarbinol et diacéthyle. L'acide lactique peut être transformé en acide propionique et en

gaz carbonique par les bactéries propioniques. Cette réaction se produit lors de l'affinage de certains fromages (Tavaria *et Coll.* 2004). Les germes aérobies du genre *Clostridium* provoquent la transformation de l'acide lactique en acide butyrique. L'hydrogène qui se dégage au cours de cette réaction provoque le gonflement des fromages (Anastasiou *et Coll.*, 2009).

Les autres sucres du lait sont à l'état de traces. Il s'agit notamment des polysides, des glucides azotés et des glucides acides (Arnold, 1983).

1.2.2- Les lipides

Les lipides du lait se présentent sous forme de globules gras émulsionnés dont la taille varie généralement entre 1 et 5 μm . On trouve une importante fraction lipidique dans le lait soit en moyenne 35 g.L^{-1} pour le lait de vache et 50 g.L^{-1} pour le lait de zébu (Libouga *et coll.*, 2001). Dans la phase lipidique du lait, on trouve trois sortes de substances associées: les lipides neutres, les lipides polaires et les lipides insaponifiables (Mather et Keenan, 1998).

1.2.3- Les composés azotés

La fraction azotée forme la partie la plus complexe du lait. Elle est probablement moins bien connue dans sa constitution et dans les transformations qu'elle peut subir (Vétier *et coll.*, 2000). Cette fraction est constituée des protéines 30 g.L^{-1} pour le lait de vache. Pour le lait de zébus, sa teneur varie de 34 à 36 g.L^{-1} (Bonfoh *et coll.*, 2005). On y retrouve également des substances non protéiques.

Parmi les protéines on distingue essentiellement les caséines, les protéines du lactosérum et les protéoses peptones (Vétier *et coll.*, 2000).

- Les protéines

- **Les caséines**

On distingue essentiellement trois types de caséines: la caséine α_s , la caséine β et la caséine κ (tableau 1). Ces caséines représentent environ 78 % des composés azotés du lait. La caséine précipite seule lorsqu'on acidifie le lait à pH 4,6 ou lorsqu'on fait réagir un enzyme spécifique comme la chymosine (Alais, 1975; Cheftel *et coll.*, 1985). Selon le procédé d'obtention, on distingue plusieurs formes de caséines qui se différencient par leur composition: la caséine entière ou caséine native obtenue par ultracentrifugation du lait et constituée d'une grande proportion de caséine κ et β ; la caséine isoélectrique ou acide qui précipite à pH 4,6; la caséine présure ou phospho-paracaseinate de calcium qui résulte de l'action de la présure sur la caséine.

Tableau 1: Caractéristiques de constituants majeurs de caséines

	Caséine α 1	Caséine α 2	Caséine β	Caséine κ
Proportion (%)	36	10	34	13
Concentration (g.L ⁻¹)	9,6	6,7	9	3,5
Masse moléculaire (Da)	23600	25250	24000	19000
Nombre de résidus d'acides aminés	199	207	209	169
Phosphore (%)	1,1	1,3	0,56	0,2
Glucide (%)	0	0	0	5
Proline (%)	17	10	35	20
Résidus Cystéine/mol	0	2	0	2
pHi	4,4	-	4,9	3,7
Sensibilité à la chymosine	+	-	+	+++
Fixation du calcium	++	+++	+	0
Solubilité en présence du calcium				
0,03 M (0-4 °C)	Insoluble	Insoluble	Soluble	Soluble
0,03M (20-25 °C)	Insoluble	Insoluble	Insoluble	Soluble

Légende: - : insensible; + : peu sensible; ++ : sensible; +++ très sensible.

(Cayot et Lorient, 1998)

- **Les protéines du lactosérum**

Elles représentent 17 % de la matière azotée. Elles se retrouvent dans le lactosérum et sont qualifiées de solubles parce qu'elles ne précipitent pas au pHi de la caséine entière. Les deux principales protéines du lactosérum sont l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline (Tableau 2), elles sont les plus immunogènes et leur composition en acides aminés est très différente de celle des caséines en ce qu'elles contiennent moins d'acide glutamique et de proline mais sont plus riches en acides aminés soufrés (Ramet et Weber, 1980). Le lactosérum renferme également des protéoses-peptones qui sont des substances glycoprotéiques peu abondantes dans le lait (Vetier *et coll.*, 1997). Les protéines mineures regroupent principalement la lacto-transferrine, la lactolline et les protéines membranaires.

Tableau 2: Caractéristiques des protéines solubles du lait

Nature	Composition (g.L ⁻¹)	Poids moléculaire et nombre de résidus	pH	Caractéristiques
β-Lactoglobuline	2,7	18000 (162)	5,2	2 ponts disulfure
α-Lactalbumine	1,5	16300 (132)	5,1	4 ponts disulfure/ groupement thiol libre
Sérumalbumine	0,5	65000 (582)	4,7	17 ponts disulfure
Immunoglobuline	0,7	150000 à 180000	7,5	Majorité anticorps
Protéose-peptone	0,5	-	-	Protéine très hétérogène
Protéines mineures	0,30	43000 à 86000	-	Composition complexe et hétérogène (Cayot et Lorient, 1998)

- Les substances azotées non protéiques

Elles constituent 5 % de la matière azotée. Ce sont des substances de faible poids moléculaire telles que l'urée et les acides aminés libres. Ces substances sont dialysables et restent en solution dans les conditions qui amènent la précipitation des protéines. Cependant certains esters comme la phospho-glycéroéthanol-amine est particulièrement abondante dans le lait avec une teneur de 50 mg.L⁻¹ (Alais, 1975). Pour le lait de zébu, l'azote non protéique a une teneur qui varie de 15 ppm à 200 ppm. Cette teneur varie selon les localités, les périodes de l'année, l'alimentation et surtout le stade de lactation. Cet azote joue un rôle important dans la nutrition des bactéries (Libouga *et coll.*, 2001)

1.2.4- Les éléments minéraux

Tous les éléments minéraux ne se retrouvent pas à l'état dissous. Une partie se trouve à l'état colloïdal, une autre est dissoute dans la phase aqueuse et une dernière se retrouve sur des protéines diverses et à la périphérie des globules gras (Adrian, 1973). Le phosphore et le calcium sont les deux éléments qui forment l'essentiel de la partie minérale-colloïdale. Les 2/3 du calcium et plus de la moitié du phosphore font principalement partie du complexe phospho-caséinate de calcium. La teneur en cendre du lait de zébu se situe aux environs de 1,5 g/100 mL tandis que celle des chlorures est de 0,76 g /100 mL (Libouga *et coll.*, 2001).

2- LA COAGULATION DU LAIT

Le lait est consommé généralement à l'état frais mais il est aussi transformé. Les produits laitiers comprennent les laits fermentés (yaourt, *Pendidam* et *Kindirmou*) par les microorganismes et qui sont consommés tels quels ou comme ingrédients dans les aliments comme les bouillies au Cameroun. Le lait est aussi transformé en fromage par coagulation. La coagulation peut être acide, enzymatique ou mixte.

2.1- La coagulation acide

Elle consiste à coaguler le lait en baissant son pH jusqu'à 4,6. L'acidification du lait provoque la destruction des micelles (larges agrégats colloïdaux du lait dont la taille varie de 10^6 à 10^9) sans fractionner la caséine. Les micelles sont déminéralisées par migration vers l'extérieur des éléments minéraux qu'elles contiennent (solubilisation du phosphate de calcium micellaire). Au pH isoélectrique de la caséine entière (pH 4,6), la solubilisation du phosphate de calcium est totale, les ions H^+ provenant de la dissociation de l'acide neutralisent les charges des micelles et la caséine déminéralisée précipite sous forme de caséine isoélectrique (Banon et Hardy, 1991).

En fromagerie, la coagulation est réalisée soit par voie fermentaire à l'aide de bactéries lactiques (en effet sous l'action de bactéries lactiques, le lait s'acidifie progressivement). La coagulation acide est obtenue par ensemencement du lait avec des bactéries lactiques mésophiles à la dose de 1 à 3 % à la température de 18 à 25 °C. Cette acidification entraîne une neutralisation des charges négatives portées par les caséines. Il se produit une déminéralisation progressive des micelles qui se désintègrent en sous-unités. Au point isoélectrique de la caséine, la neutralisation des charges devient complète, les micelles de caséine flocculent et se soudent formant au repos un gel homogène qui emprisonne le lactosérum et occupe entièrement le volume du lait. Au cours de la déminéralisation du complexe phospho-caséinate de calcium, le calcium colloïdal migre dans le sérum (Cheftel *et coll.*, 1985; Ramet, 1997). L'acidification du lait accélère plus rapidement la coagulation en présence de la présure (Green et Grandison, 1993).

2.2- La coagulation enzymatique

Au cours de la coagulation enzymatique, la caséine est hydrolysée. Elle a pour conséquence la coagulation sans modification du pH (Parry, 1983; Brulé *et coll.*, 1997). La destruction des micelles n'est que progressive. Seule la caséine κ est hydrolysée (action sur la liaison phénylalanine₁₀₅ - méthionine₁₀₆). Deux phases successives de la coagulation ont été caractérisées (Cayot et Lorient, 1998):

➤ une réaction primaire ou phase enzymatique au cours de laquelle la chymosine hydrolyse la caséine κ et en solubilise une petite partie (caséino-glycopeptide). Elle n'exige pas la présence de calcium ionisé. La figure 2 présente la structure secondaire de la caséine κ .

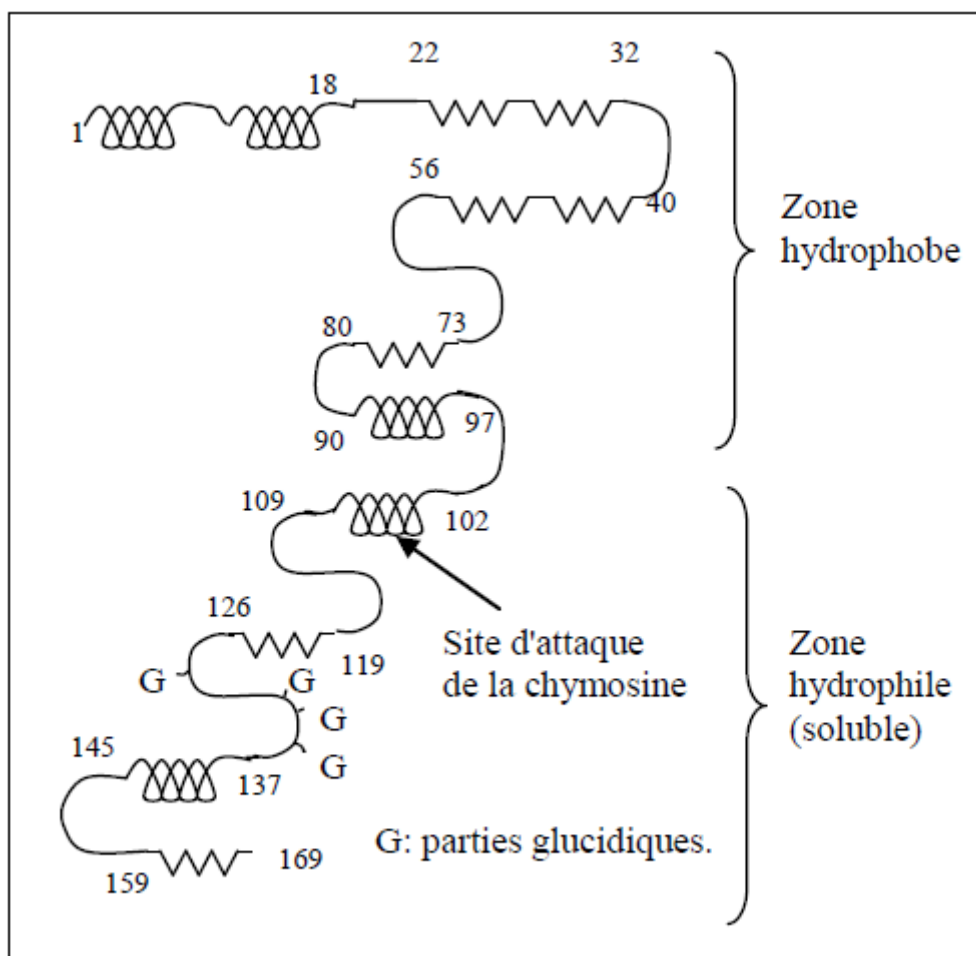


Figure 2: Schéma de la structure secondaire de la caséine κ

La caséine κ est formée essentiellement de deux parties: une partie hydrophobe et une partie hydrophile qui présentent un site d'attaque de la chymosine, de la présure et de la majorité des enzymes protéolytiques coupant entre les acides aminés phénylalanine-méthionine. L'hydrolyse de cette liaison par la chymosine produit un fragment N-terminal, la paracaséine qui est constituée du résidu (1-105) et un fragment C-terminal le caséinomacropeptide qui est constitué du résidu 106-169 (Boutrou *et coll.*, 2003). Après cette hydrolyse le caséinomacropeptide se retrouve dans le lactosérum alors que la paracaséine reste attachée aux micelles. Il a été démontré que la caséine κ est relativement résistante à l'action de la chymosine aux pH 6,6; 5,5 et 4,6 (Reid *et coll.*, 1997).

➤ une phase secondaire ou phase de coagulation qui touche une grande partie des substances provenant de la réaction primaire. Elle exige la présence de calcium ionisé et se fait à une température supérieure à 4 °C.

La figure 3 présente de façon spécifique les différentes phases de la coagulation enzymatique du lait selon Cayot et Lorient (1998).

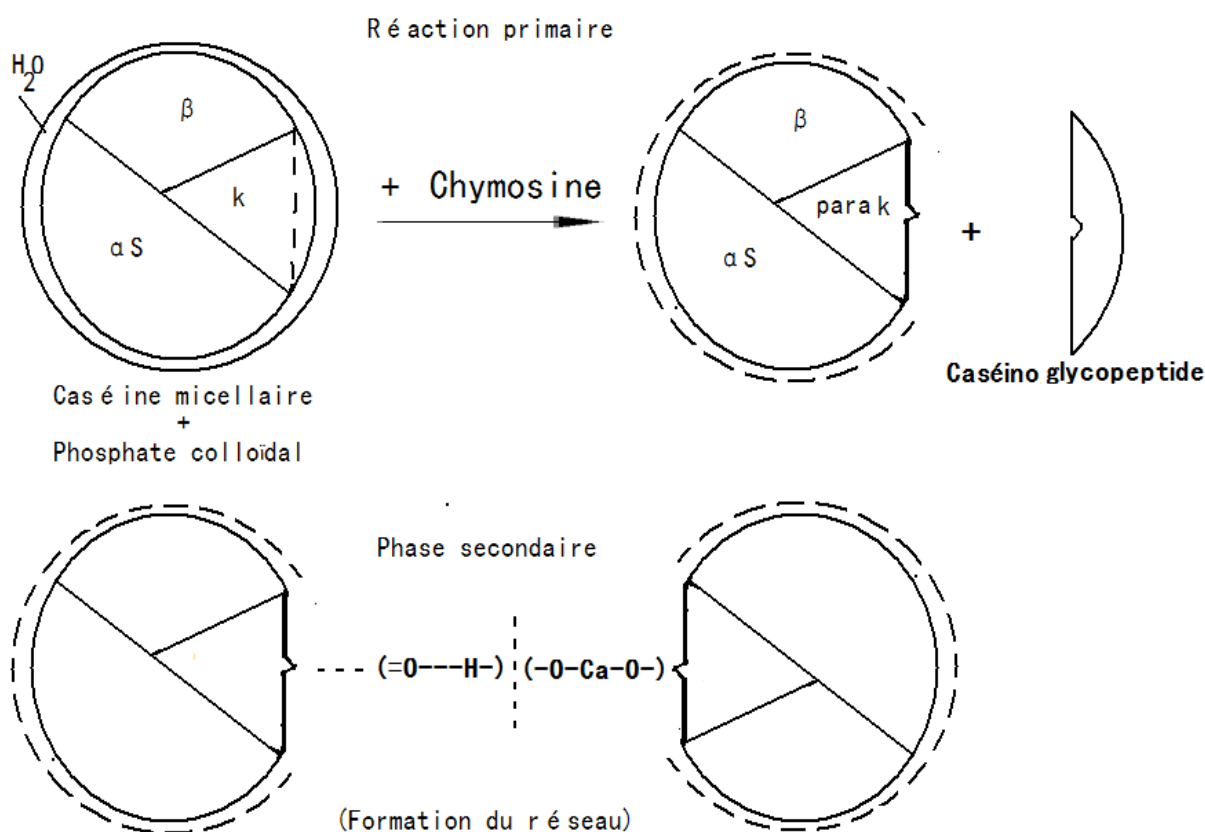


Figure 3: Les phases de la coagulation enzymatique du lait

A ces deux phases essentielles de la coagulation, s'ajoutent: une réaction tertiaire au cours de laquelle la protéolyse est générale, suivie de la synérèse du coagulum qui est une phase physico-chimique s'accompagnant de la rétraction et de l'expulsion du lactosérum (Brulé *et coll.*, 1997).

Diverses enzymes protéolytiques ont la propriété de coaguler le lait. Elles sont d'origine animale, végétale ou microbienne (Alais, 1975). Outre leur activité coagulante, spécifique sur la caséine, ces enzymes ont une activité de protéolyse générale pouvant se manifester sur toutes les protéines.

2.2.1- Les enzymes coagulantes d'origine animale

- **La présure**

Le terme présure est réservé à la préparation enzymatique extraite des caillettes de jeunes ruminants abattus avant le sevrage. La présure est un mélange constitué essentiellement de

chymosine (80 %) et de pepsine (20 %). La présure est une préparation thermolabile, sa dénaturation est rapide au dessus de 55 °C (Dalglish, 1993).

La composition enzymatique de la présure de veau et de bovin adulte présente une hétérogénéité au niveau de la mobilité électrophorétique due à la différence des séquences en acides aminés (chymosine) ou des degrés de phosphorylation différents (pepsine) qui dépendent de la différence de charge nette des différents sous-composés.

- **La chymosine**

Elle est sécrétée par la caillette des jeunes ruminants non sevrés. La forme inactive de la chymosine est la prochymosine. Elle est transformée en enzyme active par un processus autocatalytique accéléré par les ions H⁺ (Otani *et coll.*, 1991a et b).

La chymosine (EC 3.4.23.4) appartient à la classe des protéases à acides aspartiques et est utilisée pour coaguler le lait dans la production des fromages. Son mécanisme d'action est basé sur la rupture de la liaison Phe₁₀₅–Met₁₀₆ de la caséine κ bovine (Drohse et Foltmann, 1989; Roseiro *et coll.*, 2003). Elle cause la déstabilisation des micelles de caséines (Daviau *et coll.*, 2000). Il en résulte la coagulation du lait et la formation d'un coagulum notamment le fromage comme cité précédemment.

- **La pepsine**

Cette enzyme est sécrétée par la caillette des ruminants. Après le sevrage, la caillette secrète beaucoup de pepsine et très peu de chymosine. La pepsine (EC 3.4.23.1) est une protéase très acide. L'optimum pour l'activité protéolytique est voisin de 2,0. Elle est inhibée à des valeurs de pH supérieur à 6,6. Elle coupe de préférence entre 2 acides aminés hydrophobes et aromatiques (Oner et Akar, 1993).

Elle coagule le lait frais et ne doit pas être utilisé à des doses excessives car cela pourrait apporter des défauts de goût. L'emploi rationnel de la pepsine exige un abaissement de pH du lait vers 6,3. L'activité catalytique de la pepsine et des endopeptidases à acides aspartiques dépend de la taille du peptide d'une part, et de la nature de résidus acides aminés relativement éloignés de la liaison peptidique d'autres part (Blum *et coll.*, 1985).

2.2.2- Les enzymes coagulantes d'origine microbienne

Plusieurs bactéries et moisissures sont utilisées pour produire des enzymes coagulantes. Leur aptitude à la fromagerie est meilleure que celles des enzymes d'origine végétale ou bactérienne. Les bactéries les plus utilisées sont *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus*

sphaericus (El- Bendary *et coll.*, 2007). Elles secrètent des protéases, des amylases et des saccharases. Le *Carnobacterium maltaromaticum* possède des aptitudes en technologie fromagère (Edima, 2007).

Les enzymes fongiques les plus connues sont celles issues de *Cryphonectria parasitica* (Trujillo *et coll.*, 2000; Kim *et coll.*, 2004), *Endothia parasitica* ou moisissure parasite du châtaignier, *Mucor miehei* ou moisissure banale thermophile du sol ou *Rhizomucor miehei* (Trujillo *et coll.*, 2000; Reys *et coll.*, 2006), *Mucor pusillus* ou moisissure banale mésophile du sol. Les caillés obtenus par ces enzymes d'origine microbienne manquent de cohésion (Desmazeand et Spinnler, 1998).

2.3- La coagulation mixte

La coagulation est réalisée par action conjointe des enzymes coagulantes et de l'acide lactique. Cependant la formation du coagulum se fait généralement sous l'action dominante des enzymes. Cette coagulation nécessite des températures variant de 28 à 32 °C. Les coagulums obtenus ont une teneur en matière sèche comprise entre 42 et 55 %, un degré de minéralisation limité (0,2 à 0,3 % de Ca), un pH bas entre 4,2 et 4,5 (Vetier, 1998).

3- LA FABRICATION DES FROMAGES

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 (normes FAO/OMS, 1990). La norme FAO/OMS modifiée en 2002 définit le fromage comme un produit frais ou affiné, solide ou semi solide, obtenu par coagulation du lait grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage.

La définition administrative française définit le terme «fromage» comme étant réservé au «produit fermenté ou non, obtenu par coagulation du lait, de la crème ou de leur mélange, suivi d'égouttage» (décret administratif du 27 avril 2007).

Les fromages sont obtenus après coagulation suivie de l'égouttage au cours duquel le lactosérum se sépare du caillé. Le caillé est essentiellement constitué d'un gel de caséine retenant les globules gras. Le lactosérum entraîne la plus grande partie de l'eau et les constituants solubles du lait; une petite partie restante est emprisonnée dans le caillé.

3.1 Principes généraux de fabrication des fromages

La fabrication du fromage comprend six étapes: la préparation du lait, sa maturation, sa coagulation, l'égouttage du gel aboutissant à un caillé, le salage et l'affinage du caillé. Cette dernière étape n'existe pas dans le cas des fromages frais consommés après égouttage.

➤ La préparation du lait est une étape nécessaire à la production des fromages de composition régulière, de qualité hygiénique et organoleptique bonne et constante. Elle comprend plusieurs opérations successives, certaines pouvant être facultatives ou obligatoires selon la technologie, la réglementation ou les produits concernés (Gret, 1994).

- L'épuration physique du lait se fait par filtration ou par centrifugation et permet de retenir les impuretés du lait.

- La standardisation concerne les matières grasses et protéiques. L'ajustement de la teneur en matières grasses du lait se fait soit par apport de lait écrémé dans du lait entier, soit par apport de crème dans le lait entier. La standardisation en matières protéiques se fait par ajout au lait de poudre, de caséine ou de caséinate ou encore par ultrafiltration. La teneur en protéine du lait de fromagerie est le plus souvent comprise entre 33 et 40 g.L⁻¹ au maximum.

- L'assainissement du lait se fait généralement à l'aide d'un traitement thermique. Cependant, la pasteurisation peut entraîner diverses modifications de la composition et de la structure physico-chimique du lait.

- Le rééquilibrage en ion permet de redonner au lait pasteurisé un comportement normal, il suffit généralement de lui ajouter du chlorure de calcium à une dose de 0,2 g.L⁻¹.

➤ La maturation du lait a pour but d'améliorer le lait en tant que milieu de culture pour les bactéries lactiques et d'amener le lait à son pH optimum d'emprésurage. Elle contribue également à reconstituer les équilibres physico-chimiques du lait ayant pu être perturbés lors des traitements antérieurs comme la réfrigération principalement (Cayot et Lorient, 1998).

➤ L'emprésurage correspond à une destruction de l'état micellaire originel de la caséine. En fromagerie, la destruction est réalisée soit par voie fermentaire à l'aide de bactéries lactiques, soit par voie enzymatique sous l'action des enzymes coagulants. Toutefois, l'aspect du coagulum obtenu varie selon que l'acidification débute avant l'emprésure (pâtes molles et certaines pâtes pressées non cuites) ou que l'acidification débute après l'emprésurage et la gélification.

➤ Le tranchage est l'étape qui consiste à trancher le coagulum formé pour faciliter l'écoulement du lactosérum. Le tranchage est obligatoire sauf pour les fromages à pâtes fraîches. Plus on tranche le coagulum plus le lactosérum sort.

➤ L'égouttage est le résultat de deux phénomènes physiques différents: un phénomène actif, la synérèse due à la contraction du gel, particulièrement important dans le coagulum présure; un phénomène passif qui résulte de l'aptitude du coagulum à laisser écouler le lactosérum occlus. La séparation du lactosérum s'accompagne d'une ségrégation des différentes composantes originelles du lait: la plus grande partie de l'eau et du lactose ainsi qu'une petite fraction de la matière grasse et des protéines sont éliminées par le sérum; la plus grande partie des protéines et de la matière grasse est retenue par le coagulum dont l'extrait sec croît progressivement à mesure de l'élimination du sérum.

➤ Le salage a un triple rôle: il complète l'égouttage et contribue à la formation de la croûte; il règle l'activité de l'eau du fromage, favorise freine ou oriente le développement des micro-organismes et les activités enzymatiques au cours de l'affinage; il relève la saveur du fromage et masque ou exalte le goût de certaines substances formées au cours de l'affinage (Fox, 1987). Le salage s'effectue de différentes façons: soit en saupoudrant le caillé de sel ou en l'immergeant dans de la saumure généralement saturée (318 g.L^{-1} à 20°C), soit en le frottant avec un tissu salé. Le sel utilisé ici joue principalement plusieurs rôles: il ralentit la production d'acide lactique, conserve le fromage, rehausse l'arôme et accélère le processus de séchage. La plupart des fromages ont une teneur en sel de 1,5 à 2,5 %.

➤ L'affinage correspond à un ensemble de dégradations enzymatiques, simultanées ou successives du substrat (caillé) préparé par la coagulation et l'égouttage. Le fromage va subir des modifications de sa composition, de sa valeur nutritive, de sa digestibilité et de ses caractères organoleptiques (aspect, consistance, saveur, odeur) (Encyclopédie Encarta, 2009). Le fromage est placé pendant une durée variable dans une salle ou dans une cave spéciale appelée hâloir, ventilée ou non, où la température et l'humidité sont contrôlées. Pendant ce temps le fromage peut être lavé, retourné, brossé ou déplacé. L'affinage est dominé par plusieurs phénomènes biochimiques dont les plus importants sont la fermentation qui transforme le sucre restant en gaz carbonique et en acide lactique, la dégradation enzymatique des protéines et l'hydrolyse de la matière grasse. Les protéines sont hydrolysées en éléments de plus en plus simples: polypeptide, peptide, acides aminés, ammoniac. Les triglycérides sont hydrolysés en acides gras et en glycérol, eux-mêmes pouvant être transformés en résidus plus sapides et aromatiques tels que les aldéhydes et les cétones (Curioni *et Coll.*, 2002). Les gaz formés au cours de ces différentes dégradations peuvent s'échapper du fromage, c'est ainsi que se forment les trous ou vacuoles plus ou moins nombreuses caractéristiques de certains fromages. Les fromages à pâtes pressées cuites ou non nécessitent une période d'affinage plus ou moins longue, décisive pour la maturation du goût. Ces fromages sont plus aptes

à la conservation qui peut atteindre plusieurs jours voire plusieurs semaines ou plusieurs mois. Cependant l'acquisition des caves d'affinage n'est pas à la portée des fermiers camerounais d'où l'avantage de produire des fromages à pâtes fraîches.

3.2 Technologie de fabrication des fromages à pâtes fraîches

Les fromages frais sont obtenus par coagulation acide prédominante. Elle est obtenue par ensemencement du lait avec des bactéries lactiques mésophiles à la dose de 1 à 3 % à la température de 18 à 45 °C. Elle est complétée par une faible addition de présure de 1 à 5 % destinée à donner une légère contractilité au caillé. Le processus de coagulation est essentiellement tributaire de la vitesse d'acidification (Julliard *et coll.*, 1987). Le temps de floculation varie de 6 à 15 h. Le temps de tranchage ou de coagulation totale est de l'ordre de 8 à 48 heures. En fin de coagulation, l'acidité du sérum est élevée et le pH bas (4,5). Le coagulum est ferme (friable), perméable. Son aptitude à l'égouttage est faible, la matière sèche dégraissée finale est toujours inférieure à 30 % et varie le plus souvent entre 12 et 22 %. L'égouttage spontané est lent et incomplet; aussi en pratique, il est nécessaire pour obtenir un fromage suffisamment égoutté dans les délais acceptables, d'exercer une action mécanique limitée sur le coagulum. La centrifugation permet de réaliser l'égouttage de façon presque instantanée. Afin de rendre le caillé moins friable et éviter des pertes excessives de matière sèche dans le sérum, on accentue légèrement le caractère présure du coagulum par des doses de présure et des températures de coagulation un peu plus élevées. La pâte obtenue en fin d'égouttage se caractérise par une forte humidité, un goût acidulé et une faible minéralisation soit 0,1 % de calcium et 0,2 % de phosphore (Caron *et coll.*, 1997).

Le faible degré de minéralisation et la teneur de 25 % de lactose sous forme d'acide lactique entraîne un manque de cohésion du fromage qui se présente généralement sous forme d'une pâte qu'il faut conditionner dans des récipients rigides et étanches. La consommation s'effectue sans affinage dès la fin de l'égouttage après incorporation éventuelle de la crème, de sel, de sucre, d'épices ou d'arômes. Le fromage doit être conservé au froid.

Les fromages faits avec les coagulants végétaux sont produits sur une échelle artisanale. Cependant, ils apportent une contribution socio-économique importante au secteur de la laiterie et aux régions locales de chaque pays et jouent ainsi un rôle important dans leur économie agricole. Ces fromages portent généralement le nom des régions dans lesquels ils sont produits et les techniques de fabrication de ces fromages sont bien connues. La température de coagulation se situe entre 27 et 35 °C. Le caillé obtenu est tranché, partiellement égoutté malaxé et salé (Roseiro *et coll.*, 2003).

La production des fromages à pâtes fraîches ne nécessite pas de caves d'affinage comme celle des pâtes pressées. Ainsi produire les pâtes fraîches permet d'utiliser une technologie facile pouvant être facilement appropriés par les fermiers camerounais et ces fromages pourront facilement être conservés par la réfrigération car n'ayant pas subi la maturation nécessaire à la conservation des fromages à pâtes pressées.

3.3- Valeur nutritive des fromages

Les fromages sont des aliments universels. Ils comptent parmi les meilleurs aliments en raison de leur remarquable valeur nutritive, car ils contiennent les matières azotées sous différentes formes, les matières grasses, le calcium et le phosphore.

Leurs qualités organoleptiques sont extrêmement variées. Les fromages sont des aliments à la fois nutritif pour l'adulte et de croissance pour le jeune, du fait de la présence des protides de valeur biologique élevée et du complexe phosphore-calcium-vitamine D. Les microflore bactérienne et fongique réalisent la synthèse de plusieurs vitamines du groupe B surtout les vitamines B2 et PP au cours de l'affinage. La teneur en matière grasse du fromage varie fortement tout comme celle des vitamines liposolubles et est comprise entre 40 et 50 % (Schultz, 1990).

La valeur biologique des protéines du fromage est un peu inférieure à celle des protéines du lait. Les fromages sont capables dans une large mesure de remplacer le lait. Ainsi, pour 0,5 L de lait il faut approximativement 70 g de fromage à pâte dure, 90 g de fromage à pâte molle ou 120 g de fromage frais (Agabriel *et coll.*, 1999).

2^{ème} partie

PERSPECTIVES DE LA COAGULATION VEGETALE

1- RAPPELS SUR LES ENZYMES COAGULANTS D'ORIGINE VEGETALE

1.1- généralités sur les extraits coagulants végétaux

Plusieurs plantes ont été utilisées pour fabriquer ou isoler des enzymes coagulantes. Celles-ci deviennent de plus en plus intéressantes du fait que l'utilisation de la présure d'origine animale est très limitée pour des raisons religieuses (Judaïsme et Islam), des raisons diététiques (végétariens) ou pour ceux qui refusent la consommation des organismes génétiquement modifiés (Allemagne, Hollande et France qui rejettent l'utilisation de la présure recombinée de veau). Récemment l'apparition de l'encéphalopathie spongiforme bovine a considérablement réduit l'offre et la demande en présure bovine (Antao et Malcata, 2005).

Des sources d'enzymes de coagulation du lait ont été identifiées à partir de nombreuses plantes telles que: *Actinidia chinensis* et *Adenolichos anchietae* (Lopes et coll., 1998), *Ananas comosus* (Cattaneo et coll., 1994), *Asparagus officinalis* (Lopes et coll., 1998), *Benincasa cerifera* (Gupta et Eskin, 1977), *Bromelia hieronymi* (Mariela Bruno et coll., 2010), *Calotropis procera* (Sanni et coll., 1999), *Carica papaya* (Veringa, 1961), *Centaurea calcitrapa* (Tavaria et coll., 1997; Raposo et Domingos, 2008), *Cereus triangularis* (Umar et coll., 1990), *Cirsium arietinum* (Robinson et Wilbey, 1998), *Cucurbita pepo* (Barbosa, 1983), *Cynara cardunculus* (Sousa et Malcata, 2002; Heimgartner et coll., 1990; Cordeiro et coll., 1993; Verissimo et coll., 1998), *Cynara humilis* (Vieira et Barbosa, 1970), *Cynara scolymus* (Sidrach et coll., 2005; Llorente et coll., 2004; Chazarra et coll., 2007), *Dieffenbachia maculata* (Padmanabhan et coll., 1993), *Droogmansia megalantha* (Lopes et coll., 1998), *Eriosema ellipticum*, *E. gossweileri*, *E. pauciflorum*, *E. psoraleoides*, *E. shirensense* (Lopes et coll., 1998), *Euphorbia caducifolia*, *E. hista* (Umar et coll., 1990), *Ficus bengalensis*, *F. elastica* (Umar et coll., 1990), *Ficus carica*, *F. glomerata*, *F. religiosa* (Lopes et coll., 1998; Veringa, 1961), *Helianthus annuus* (Park et coll., 2000), *Lactuca sativa* (Lo Piero et coll., 2002), *Onopordum turcicum* (Tamer, 1993), *Opuntia phylloclades* (Umar et coll., 1990), *Oryza sativa* (Asakura et coll., 1997), *Silybum marianum* (Vairo Cavalli et coll., 2005), *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* L. et *Solanum melongena* (Guama et coll., 2010), *Taraxacum officinale* (Garg et Johri, 1994), *Withania coagulans* (Veringa, 1961), *Zingiber officinale* (Lopes et coll., 1998).

Les études menées sur la plupart de ces extraits ont permis de classer les protéases qu'elles contiennent selon leur mécanisme d'action.

1.2- Principales classes des protéases coagulantes

Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour les protéases, ce qui permet de les regrouper, en fonction de la nature du ou des acides aminés du site actif impliqués dans la catalyse. On distingue ainsi 6 classes: les protéases à sérine (EC 3.4.21), les protéases à thiol ou à cystéine (EC 3.4.22), les protéases à acide aspartique (EC 3.4.23), les métalloprotéases (EC 3.4.24), les protéases à thréonine et les protéases à acide glutamique.

Toutes les protéases coagulantes décrites à ce jour appartiennent à la classe des protéases acides ou des protéases à sérine.

➤ Les protéases acides agissent à pH acide et possèdent un acide aspartique sur leur site actif. C'est le cas de la pepsine qui est spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagés les acides aminés aromatiques.

Les fleurs de cardons, *Cynara cardunculus*, contiennent des protéases aspartiques telles que la cardosine A (Faro *et coll.*, 1999) plus abondante et la cardosine B (Vieira *et coll.*, 2001). La cardosine A a été étudiée en détail (Verissimo *et coll.*, 1995) et est capable de couper la liaison Phe105– Met106 de la caséine kappa bovine comme la chymosine. La cardosine B a des propriétés semblables à la pepsine notamment sur la spécificité et l'activité.

Des protéases aspartiques ont également été trouvées dans les cellules des fleurs du *C. scolymus* par certains auteurs qui les ont appelées cyprosines A et B et cynarases A, B, et C, respectivement (Cordeiro *et coll.*, 1994; Sidrach *et coll.*, 2005). Des extraits de *Cynara* sont employés principalement dans la fabrication de divers fromages espagnols tels que la *Torta del Casar*, *La Serena*, *Los Pedroches*, *Los Ibores*, *Flor de Guia*, et des fromages portugais tels que *Serra da Estrela*, *Serpa*, *Azeitao*, *Nisa*, *Castelo Branco*, *Evora* (Roseiro *et coll.*, 2003).

Des extraits de cardons et de présure animale ont été utilisés pour produire des camemberts. Après comparaison des résultats il s'avère que le camembert à l'extrait végétal a mûri plus rapidement que celui produit à la présure (Barbosa *et Coll.*, 1981). De plus, ce fromage a un goût plus astringent au début de la maturation alors que ce goût est absent en fin de maturation, ceci s'explique par la présence des tanins et autres substances présents dans les fleurs. Ces auteurs ont conclu que ce coagulant végétal est bien capable de substituer la présure animale sans inconvénients.

Viera de Sá et Barbosa (1970, 1972) ont comparé le comportement rhéologique des caillés au découpage dans la fabrication du fromage en employant l'extrait de cardon et de la présure animale. Ils ont rapporté que les fromages (*Edam*, *Serra da Estrela* et le *Roquefort*) faits avec

l'extrait de cardon comparés à ceux faits à la présure ont une texture plus douce et présente un lactosérum de couleur blanchâtre; ce qui suggère un degré de protéolyse plus élevée et un faible rendement. Ces auteurs ont également relevé que ces fromages sont légèrement acides et présentent un goût amer. Ces dernières caractéristiques disparaissent au cours de la maturation.

Les principales différences sur le fromage *Serra da Estrela* fait avec les deux types de coagulants sont presque négligeables sauf que les fromages faits avec la présure sont de qualité plus pauvre. Les mêmes différences sont observées pour le *Roquefort* fait avec l'extrait coagulant végétal, avec une protéolyse plus poussée et un faible rendement. Cependant en fin de maturation les deux fromages sont similaires. Ces auteurs ont conclu que, en dehors de la forte activité protéolytique, le cardon peut remplacer avec satisfaction la présure classique particulièrement pour le *Serra da Estrela* et le *Roquefort*.

Des expériences similaires de comparaison ont été effectuées avec l'extrait de cardon pour la fabrication des fromages *Bel Paese*, *Gruyère*, *Grana* et *Provolone* à partir du lait de vache (Roseiro, 1990). Ils arrivent aux mêmes conclusions que Christen et Virasoro (1935a et b).

Une protéase aspartique des graines de tournesol montrant une activité coagulante a été identifiée et sa structure primaire a été déduite à partir de la séquence de ses gènes; la comparaison avec la séquence de la cynarase du *C. cardunculus* (Cordeiro *et coll.*, 1994) a montré une identité de 78 % avec la protéase aspartique du tournesol. Cependant l'enzyme du tournesol a une activité plus faible que celle de la cynarase mais son action sur la caséine n'est pas encore connue (Park *et coll.*, 2000).

Les graines d'*Albizia julibrissin* possèdent des enzymes protéolytiques qui ont aisément coagulé le lait, sans développer une quelconque amertume même après 3 mois de maturation (Otani *et coll.*, 1991a et b).

En outre, l'amertume des fromages peut être due à un excès de cardon employé pendant la fabrication. La quantité de coagulant est ajoutée empiriquement. L'excès d'amertume peut être évité par une meilleure standardisation de l'extrait. L'utilisation de l'extrait de cardon a été suggérée pour la production de nouveaux types de fromages Barbosa *et coll.*, 1981) et pour améliorer la texture des fromages à faible teneur en matière grasse tels que le cheddar. (Banks *et coll.*, 1998).

Actuellement, les normes concernant les coagulants d'origine végétale sont rares. La collecte des fleurs de cardon est laborieuse et chère. Les fromagers d'Espagne et du Portugal ont développé leur propre production en cultivant cette plante dans leurs domaines. Il existe un brevet espagnol (Cáceres Arriba et Fernández, 2000) pour la production d'une poudre sèche d'extrait aqueux des fleurs des espèces de *Cynara*, afin d'obtenir un produit normalisé. Cependant aucune différence significative n'a été notée entre les fromages (*Los Pedroches*) faits avec cette poudre coagulante et

l'extrait aqueux brut utilisé par les fromagers traditionnels (Fernández-Salguero *et coll.*, 2002). La coagulation se produit dans 30 à 60 minutes après l'ajout au lait de l'extrait aqueux des fleurs du cardon (Roseiro, 1991). La quantité de fleurs sèches et d'eau utilisée pour la préparation de l'extrait coagulant dépend de la quantité de lait à coaguler, de la qualité des fleurs séchées et de l'expérience du fromager.

➤ Les protéases à sérine possèdent une triade catalytique caractéristique comprenant une sérine (d'où leur nom), une histidine et un acide aspartique. Le groupement hydroxyle de la sérine joue le rôle de nucléophile et attaque le carbonyle de la liaison peptidique.

Des extraits coagulants contenant des protéases de type sérine ont également été réalisés à partir des plantes telles que *Cucumis trigonus* Roxburghi (Asif-Ullah *et coll.*, 2006), de *Cucumis melo* L. var. Prince (Yamagata *et coll.*, 1989), d'*Euphorbia milii* (Yadav *et coll.*, 2006) de *Lactuca sativa* (Lo Piero *et coll.*, 2002), de *Solanum dubium* (Mohamed Ahmed *et coll.*, 2010). Les extraits aqueux de *Benincasa cerifera*, *Trichosantus kirrilowi* A. et *Trichosantus cucumeroides* ont également permis d'obtenir des extraits coagulants utilisable en fromagerie (Asif-Ullah *et coll.*, 2006; Yamagata *et coll.*, 1989; Kaneda et Tominaga, 1977; Uchikoba *et coll.*, 1998, Kaneda *et coll.*, 1986).

Les plantes contiennent ainsi généralement les enzymes appartenant à la famille des protéases à acides aspartiques, des protéases à sérine ou des protéases à cystéines. Les travaux de Libouga *et Coll.*, (2006) ont montré que l'extrait des fruits de *Balanites aegyptiaca* possède des protéases utilisables en fromagerie. Cependant aucune étude n'a été effectuée pour caractériser la famille des protéases contenues dans cet extrait.

2- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LE *BALANITES AEGYPTIACA*

2.1- Systématique et dénomination

B. aegyptiaca (L.) Delile (Balantiaceae, *alt*-Zygophyllaceae) appartient à l'embranchement des Spermaphytes (phanérogames, plantes à fleurs et à graine), au sous-embranchement des Angiospermes (ovule protégée par une enveloppe appelée carpelle), à la classe des dicotylédones (embryon à deux cotylédons), à la famille des Balanitacées parfois appelée Zygophyllacées (Fortin et Maynard, 1988); cette famille contient un seul genre *Balanites* et plusieurs espèces: *B. angolensis*, *B. glabra*, *B. orbicularis*, *B. scillin* (Wasonga *et coll.*, 2003; Milewski et Madden, 2006) *B. pedicellaris*, *B. wilsoniana* (Babweteera *et coll.*, 2007) et *B. roxburghii* (Padmashali *et coll.*, 2006); *B. maughamii* Sprague (Elgorashi *et coll.*, 2002; Taylor *et coll.*, 2003).

Il existe diverses dénominations de cette plante qui varient selon les régions et les langues parlées: *Sequene saguene* en Bambara au Mali; dattier du désert, Myrobolan d'Egypte, dattier sauvage, savonnier en Français; *goloteki*, *mourotoki*, *tane*, *tanné*, *tanni* en Peul; *hadjilidji* en Arabe au Tchad; *adwa* en Haoussa; *tabarak*, *taborak* en Touareg; *baka* en Toupouri; *sump* en Wolof au Sénégal; *thron tree* et *soap berry* en Anglais (Tubiana, 1993; Baumer, 1995)

2.2- Aire de répartition et écologie

Le *B. aegyptiaca* est un arbre cultivé depuis la haute antiquité en Egypte; c'est une espèce des zones sahéliennes, soudano-sahéliennes d'Afrique orientale, d'Arabie et de l'Inde (Eyog *et coll.*, 2000). Il se rencontre du Sénégal à la Mauritanie jusqu'à la Mer Rouge mais aussi dans les régions chaudes du Congo ex-Belge et de l'Angola. Il est répandu dans le Cameroun septentrional, au sud du Lac Tchad et au nord de la Bénoué. Il est très résistant à la sécheresse et pousse sur tous les types de sol (Letouzey, 1982). D'une grande amplitude écologique, on trouve cet arbre en Afrique Orientale jusqu'à 1500 m d'altitude. Il indique le surpâturage et les régions caractérisées par un indice de pluviométrie comprise entre 500 et 750 mm.

2.3- Description et biologie

Le *B. aegyptiaca* (figure 4) est un petit arbre dont la taille varie entre 6 et 12 m de hauteur et 30 à 35 cm de diamètre à tronc droit, aux branches à extrémité légèrement retombante, à écorce foncée, profondément striée avec une couronne arrondie ou ovale (Gnoula *et coll.*, 2008). Cet arbre est caractérisé par:

- ses racines pivotantes et rayonnantes riches en saponines tout comme ses écorces.
- son bois réputé résistant aux termites et aux insectes xylophages.

- ses branches et rameaux verts-jaunâtres qui possèdent des épines à l'aisselle des feuilles; ces épines robustes et droites peuvent mesurer jusqu'à 12 cm de longueur. Elles sont coriaces à cuticule épaisse ce qui diminue au maximum les pertes d'eau par évaporation;
- son écorce grise, lisse au stade jeune, noirâtre, fissuré et crevassé à l'état adulte;
- son feuillage dense, souvent retombant portant des feuilles, des fleurs jaunes à vert, peu apparentes groupées en petites inflorescences. Les feuilles sont alternes, bifoliacées, ovales, orbiculaires, rhomboïdes et mesurent 2,5 à 3 cm.



Figure 4: Un pied de *Balanites aegyptiaca*

2.4- Le fruit

Le fruit (figures 5 et 6) en forme d'olive elliptique de 3 à 4 cm de longueur et 1 à 2 cm de diamètre, est une drupe (fruit charnu à noyau) sphérique, ovoïde, anguleuse, légèrement arrondie à chaque extrémité et tomenteuse; d'abord verdâtre, il est jaunâtre à maturité.



Figure 5: Fruit de *B. aegyptiaca*

Chaque fruit présente (figure 6) :

- un épicarpe (peau) jaunâtre mince et dur : il a un arrière goût amer et des propriétés purgatives; il entoure une pulpe douce, comestible et légèrement astringente
- un mésocarpe (chair qui se trouve entre la peau et le noyau) brun foncé et charnu.
- un endocarpe très épais, sorte de noyau très dur.

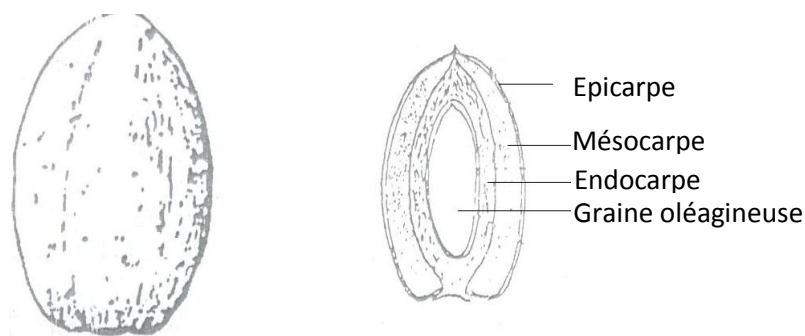


Figure 6: Schéma du fruit de *B. aegyptiaca* (Tubiana, 1993)

Le mésocarpe contient des sapogénines stéroïdiques et des pregnanes glycosiques (Kamel et Koskinen, 1995). Ses extraits aqueux sont anthelminthiques (Koko *et coll.*, 2000; Koko *et coll.*, 2005). Par ailleurs des tri et tétraglycosides, D-glucose, L-rhamnose, et xylose liés à la yamogénine (aglycone) ont été isolés de ses extraits aqueux (Liu et Nakanishi, 1982). Ses sapogénines sont décrites comme possédant un effet molluscicide potentiel.

L'endocarpe contient une graisse oléagineuse (Mohammed *et coll.*, 2002) donnant une huile comestible (Dupriez et De Leener, 1987).

2.5- Quelques utilisations de *B. aegyptiaca*

Le bois dur, résistant aux insectes, est utilisé en charpenterie, en menuiserie, pour la fabrication des manches d'outils; ce bois est également excellent pour le chauffage et ses branches servent à la confection de clôtures. Les jeunes rameaux et feuilles entrent dans la confection des sauces ou sont affouragés (Baumer, 1995). Un détergent riche en saponine est tiré des racines, des fruits et des fibres du liber. L'extrait aqueux des différentes parties de l'arbre du *B. aegyptiaca* comme les racines et les écorces possèdent des propriétés larvicides contre les larves des moustiques du genre *Culex pipiens* (Chapagain et Wiesman, 2007). L'écorce des jeunes branches, réduite en poudre et transformée en pâte, est un poison de pêche utilisé dans les mares (Tubiana, 1993).

Une émulsion des fruits fournit un poison utilisé à la fois contre les escargots d'eau douce qui servent d'hôtes intermédiaires à la Bilharzie, les larves de ce parasite et les mouches du genre *Cyclops*, vecteurs du ver de Guinée (*Dracunculus medinensis*). L'huile extraite des noix de *B.*

aegyptiaca possède une valeur nutritionnelle, cosmétique et médicinale remarquable (Kapseu *et coll.*, 1997). Le fruit est consommé comme un bonbon; il contient environ 40 % de sucre et 7 % de saponine (Chapagain et Wiesman, 2005). La pulpe des fruits est sucrée et consommée par l'Homme (Hamilton et El Naiem, 2000).

Plusieurs parties de cet arbre contiennent un appoint très important dans l'alimentation humaine et animale, en médecine et en pharmacopée traditionnelle. Le tableau 3 présente une synthèse de différentes utilisations de *B. aegyptiaca* en pharmacopée traditionnelle.

Tableau 3: Utilisations de *B. aegyptiaca* en pharmacopée traditionnelle

Maladies et effets	Parties utilisées			
	Feuilles	Racines	Ecorces	Fruit
Amibiase		+	+	
Colique		+	+	
Constipation			+	
Epilepsie		+	+	
Fièvre jaune		+	+	
Goitre	+			
Ictère		+	+	+
Laxatif		+	+	
Maux de dent			+	
Otites	+			
Purgatif		+	+	
Rhume	+		+	
Stérilité		+	+	
Syphilis		+	+	
Ténia				+

Légende: + désigne la partie utilisée pour le traitement de la maladie correspondante.

(Dupriez et Leener, 1987; Tubiana, 1993; Baumer, 1995.)

Les pratiques locales d'utilisation de *B. aegyptiaca* pour épaissir le lait permettent de penser que les fruits de cette plante peuvent intervenir dans la fabrication des fromages en coagulant le lait (Libouga *et coll.*, 2006). Les résultats précédemment obtenus ont permis d'identifier et de localiser la partie possédant le principe actif dans la graine, d'extraire ce principe et fabriquer des fromages,

puis de faire des essais de toxicité sur des souris et à procéder au test d'acceptabilité à travers des analyses sensorielles.

MATERIEL ET METHODES

1- METHODES DE PREPARATION

1.1-Préparation de l'extrait pour la purification

Les fruits mûrs de *Balanites aegyptiaca* ont été récoltés en saison sèche (novembre) à Pitoa (Garoua: Cameroun), localité située à 9°23 latitude nord et 13°32 longitude Est (Letouzey, 1968). Environ 200 g de fruits dépouillés de l'épicarpe ont été introduits dans un bécher contenant environ 500 mL de solution de NaCl à 5 % ou des tampons citrate de sodium et Tris-HCl. Les graines ont été macérées pendant une nuit puis triturées et filtrées. La filtration des extraits et des solutions ont été effectuée à l'aide des filtres standard plissés de 190 mm (Fisherband). Le filtrat obtenu a été centrifugé à 10 000g pendant 30 min. Toutes les opérations ont été réalisées à 4 °C. Les solutions ont été filtrées à l'aide des filtres de cellulose acétate de 0,45µm (Sartorius). Les extraits bruts ainsi obtenus ont été utilisés tels quels ou bien ont plus ou moins été purifiés par les différents procédés ci-après:

1.2-Saturation et précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium a été faite selon la méthode de Harris et Angal (1989). L'extrait brut est ainsi porté à la saturation voulue puis centrifugé pour séparer le surnageant du culot. En effet, cette opération consiste à récupérer la protéase et à éliminer le maximum des composants indésirables tels que les glucides et les polyphénols. Pour déterminer la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter et selon le degré de saturation voulue la formule suivante a été utilisée:

$$G = \frac{533 (S_2 - S_1)}{100 - 0,3 S_2}$$

avec G: la masse de sulfate d'ammonium à peser,

S₁: la concentration initiale,

S₂: la concentration finale désirée en sulfate d'ammonium

1.3-Dialyse

Les échantillons issus de la précipitation ont été introduits dans des boudins de dialyse. Ce sont des membranes laissant passer les ions et permettant d'évacuer le sulfate d'ammonium de la solution pour retenir les protéines. L'eau ou le tampon a été remplacé plusieurs fois pendant au moins 12 heures et cette opération s'est entièrement déroulée à 4 °C.

1.4-Ultrafiltration frontale et tangentielle

L'ultrafiltration a été réalisée par la voie frontale ou tangentielle basée respectivement sur l'utilisation de la pression et d'une force centrifuge. Cette technique permet ainsi de concentrer et de clarifier l'extrait en rajoutant régulièrement la solution d'extraction ou le tampon de lavage.

L'ultrafiltration frontale a été réalisée grâce à une cellule amicon ayant une membrane (Millipore amicon bioseparation®) dont le seuil de coupure est de 10 000 Da et soumise à une pression de 1 Bar sous agitation. L'eau, les ions et les polyphénols sont partiellement éliminés. Les protéines sont ainsi retenues par la membrane.

Certains extraits ont été concentrés par centrifugation de 4000g à 10 000g grâce à des tubes VIVASPIN^{15R} de 20 mL ayant une membrane dont le seuil de coupure est de 10 000 Da. Ces membranes sont imperméables aux protéines ce qui permet d'éliminer l'eau et les ions.

1.5-Décoloration au charbon végétal actif

Des échantillons bruts et concentrés ont été décolorés au charbon végétal actif selon Llorente *et coll.* (2004). Une masse correspondant à 10 % (p/v) de charbon actif a été pesée et mélangée à l'extrait dans un bécher à l'aide d'un barreau aimanté pendant 10 min. Le bécher est ensuite déposé sur de la glace pendant 30 min puis le mélange est centrifugé pendant 80 min à 4 °C et à 10000g. Le surnageant est récupéré après filtration pour être analysé.

1.6-Purification

1.6.1-purification par chromatographie d'échange d'ions

Après l'extraction, la purification a été réalisée à l'aide de la chromatographie d'échanges d'ions en utilisant l'appareil de chromatographie *FPLC system (Pharmacia)*. Différentes résines ont été utilisées: les gels échangeurs d'anions tels que le DEAE-Sepharose et le Q-Sepharose, ou des gels échangeurs de cations: le CM-Sepharose Hitrap et le SP-Sepharose.

Dans un premier temps, la résine est équilibrée dans un tampon dont le pH est tel que les groupements portés par l'échangeur d'ions soient ionisés. Le volume d'échantillon ensuite injecté dans la colonne dépend de sa teneur en protéines. Les premières molécules éluées de la colonne sont celles qui ne sont pas adsorbées sur la phase stationnaire. L'étape suivante est l'élution des molécules fixées au gel en ajoutant une concentration croissante de 0 à 1 mol.L⁻¹ de NaCl. Les molécules éluées sont détectées à 278 nm avec une échelle d'absorbance variant de 0,5 à 2 puis collectées. Le débit est réglé de 0,2 à 0,5 mL.min⁻¹ et la vitesse de déroulement du papier variait de 0,1 à 0,25 cm.min⁻¹.

➤ Purification à pH acide

Plusieurs résines ont été utilisées pour la purification à pH acide. Des essais ont été réalisés sur une colonne CM-Sepharose Hitrap de 1 mL en tampon acétate 20 mmol.L⁻¹, pH 4,5 et sur une colonne SP-Sepharose de 80 mL en tampon citrate de sodium 50 mmol.L⁻¹ pH 3, en tampon phosphate 50 mM, pH 6 et en tampon acétate 20 mmol.L⁻¹ pH 4,5. Enfin une colonne DEAE-Sepharose de 20 mL en tampon phosphate 50 mM, pH 6 a été utilisée.

➤ Purification à pH alcalin

Pour la purification à pH 8, un échantillon d'extrait brut concentré a été chromatographié sur une colonne HILOAD 16/10 Q Sepharose Fast Flow équilibrée par du tampon Tris-HCl à pH 8,1 (20 mmol.L⁻¹) contenant, ou non, de l'EDTA (1 mmol.L⁻¹) et du β-mercaptoéthanol (3 mmol.L⁻¹). L'élution a été effectuée par plateaux de concentrations en NaCl croissantes à savoir 0,15 mol.L⁻¹, 0,4 mol.L⁻¹ et 1 mol.L⁻¹ respectivement.

1.6.2-Purification par chromatographie d'exclusion moléculaire

La chromatographie d'exclusion a permis de séparer les protéines en fonction de leur taille moléculaire. Une colonne Superdex 75 10/300 GL de 10 mm de diamètre et 30 cm de hauteur avec un volume d'environ 24 mL et dont la limite de séparation variait de 3 000 à 70 000 Da a été utilisée.

Un échantillon d'extrait purifié (pic 2 issu de la chromatographie d'échange d'ions) a été chromatographié. Le tampon Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 8,1 contenant l'EDTA (1 mmol.L⁻¹) et le β mercaptoéthanol (3 mmol.L⁻¹) puis du NaCl à 0,15 mol.L⁻¹ a été utilisé pour l'élution dont le débit était fixé à 0,3 mL.min⁻¹.

1.6.3-Purification par chromatographie d'affinité sur gel de concanavaline A

La Concanavaline A fixée au Sepharose 4B par la méthode au bromure de cyanogène permet de déterminer la présence de glycoprotéines à mannose dans un échantillon.

Une colonne contenant 5 mL de gel de Concanavaline A Sepharose est équilibrée en tampon acétate de sodium (10 mmol.L⁻¹), pH 5,8 contenant du NaCl (0,15 mol.L⁻¹). Le débit est réglé à 1 mL.min⁻¹. Un échantillon d'extrait purifié (Pic 3 par chromatographie d'échanges d'ions sur Q-Sepharose à pH 8,1 et diafiltré contre du tampon acétate (20 mmol.L⁻¹), pH 4,5). L'élution est réalisée avec du Methyl-α-D-mannopyranoside à 0,2 mol.L⁻¹. Après chaque utilisation, la colonne de Concanavaline A a été lavée avec du tampon acétate de sodium (10 mmol.L⁻¹) pH 7,5 contenant du NaCl (0,15 mol.L⁻¹), du MnCl₂ (1 mmol.L⁻¹), du CaCl₂ (1 mmol.L⁻¹) et du MgCl₂ (1 mmol.L⁻¹).

2-TECHNIQUES D'ANALYSES

2.1-Analyses

➤ Mesure des temps de coagulation

La mesure des temps de coagulation (Milk clotting time) a été faite selon la méthode de Arima *et coll.*, (1970) modifiée en incubant 5 mL de lait frais de zébu (Libouga *et coll.*, 2001) ou du lait reconstitué, selon la méthode française de l'INRA ou de l'IDF (12g de lait dissous dans 100 mL de CaCl_2 10 mmol.L⁻¹) dans un tube à essais plongé dans un bain marie à 37 °C et 1 mL d'extrait. Le tube à essai est soumis à un mouvement de rotation lente. A l'aide d'un chronomètre, on mesure le temps qui s'écoule entre l'introduction de l'extrait coagulant et le moment où un mince film se forme à l'intérieur des parois du tube à essais.

➤ Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford (1976) dont le principe est basé sur la réaction entre le bleu de Coomassie et les protéines. En milieu acide, il se forme un complexe bleu qui présente un maximum d'adsorption à 595 nm. Une solution étalon de sérum albumine bovine (SAB) de concentration connue (2 mg.mL⁻¹) a été utilisée. Le réactif de Bradford utilisé était constitué de 320 mg de bleu de Coomassie, 660 mL d'acide phosphorique pur puis compléter à 1L de solution avec de l'eau distillée.

➤ Détermination de la matière sèche

L'extrait sec total a été déterminé par dessiccation de 10 mL de lait ou d'environ 5g de fromage frais à 105 °C jusqu'à poids constant selon la Norme Afnor (1980).

➤ Détermination de la matière grasse

La matière grasse du fromage a été mesurée par extraction éthéro-ammoniacale selon la méthode de Rose Gottlieb en utilisant le butyromètre de Pien selon le recueil des normes Afnor (1980). Trois grammes de fromage sont ajoutés à 10 mL de HCl puis portés à ébullition à 100 °C jusqu'à dissolution complète du fromage. Après avoir ajouté 25 mL d'éther de pétrole sur le mélange précédent, le butyromètre a été agité pendant 1 min puis laissé au repos pendant 5 heures environ jusqu'à l'obtention de deux phases. La phase supérieure contenant la matière grasse a été placée à 105 °C à l'étuve jusqu'à poids constant selon la Norme Afnor (1980).

2.2-Électrophorèse en SDS-PAGE

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide en milieu SDS (*Sodium Dodecylsulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* ou *SDS-PAGE*) ont été réalisées selon la méthode de Laemmli (1970) dont le principe est basé sur la séparation des molécules selon leur taille et leur charge électrique dans un champ électrique. Les échantillons sont dénaturés à l'aide du SDS et du β mercaptoéthanol pendant 3 minutes à 95 °C. La migration des échantillons à travers les gels de concentration et de séparation est effectuée à une intensité constante de 35 mA sous un courant électrique de 100 V. les gels sont colorés avec une solution de bleu de Coomassie (R250) dans un mélange méthanol: acide acétique: eau (5/1/4), puis décolorés dans un mélange méthanol: acide acétique: eau (2,5/1/6,5).

2.3-Préparation du gel de gélatine

Un gel de gélatine à 1 % final a été préparé dans les mêmes conditions que la méthode de Laemmli (1970) à la seule différence que l'eau milliQ est remplacée par la solution de gélatine. Après migration le gel a été rincé dans 2 bains successifs de Triton X 100 pendant 1h à température ambiante pour éliminer le SDS. Le gel a été incubé dans du tampon phosphate à 100 mmol.L⁻¹ à pH 5 ou dans du tampon di-sodium de citrate à pH 7 pendant 2h à 37 °C puis coloré et décoloré classiquement. Le gel de gélatine permet de détecter la présence des protéases grâce à leur activité protéolytique sur la gélatine.

2.4-Détermination des pI par électrophorèse bidimensionnelle

L'isoélectrofocalisation a été réalisée sur des bandelettes *ReadyStrip*TM de gel de polyacrylamide à gradient de pH préformé (pH 3-10). Les échantillons ont été concentrés par précipitation à l'acétone (-20 °C) pendant 1h puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 min. L'échantillon ainsi préparé est additionné de 110 μ L de tampon de reprise et 110 μ L de tampon de réhydratation (tableau 4) puis déposé sur des bandelettes.

Tableau 4: Composition des tampons de reprise et de réhydratation

	Tampon de reprise	Tampon de réhydratation
Urée 8 mol.L ⁻¹	48 g	48 g
Chaps	4 g (4 %)	2 g (2 %)
Tris base 0,04 mol.L ⁻¹	0,48 g	-
Ampholytes 2 %	-	5 mL
DTT 0,01 mol.L ⁻¹	0,15 g	0,15 g
Bleu de bromophénol 0,01 %	0,01 g	0,01 g
Eau milliQ	Qsp 100 mL	Qsp 100 mL

L'échantillon est déposé dans un portoir de réhydratation ajusté aux dimensions de la bandelette. La face de la bandelette comportant le gel, débarrassée de son film en plastique est mise en contact avec l'échantillon. Le gel est réhydraté pendant 7 heures puis déposé sur une plaquette comportant 2 électrodes préalablement recouvertes de papier buvard humide. Un minimum de 1 mL d'huile minérale est déposé sur la bandelette. Celle-ci est placée dans le générateur Biorad IPG-Strips programs.

Une bandelette témoin a été traitée dans les mêmes conditions en présence des marqueurs de pI. Les marqueurs des pI utilisés sont l'amyloglucosidase (3,50), le rouge méthyle (3,75), l'inhibiteur tryptique (4,55), la β -lactoglobuline A (5,20), l'anhydrase carbonique B bovine (5,85), l'anhydrase carbonique B humaine (6,55), la myoglobine bande acide (6,85), la myoglobine bande basique (7,35), la lectine de lentille acide (8,15), la lectine de lentille neutre (8,45), la lectine de lentille basique (8,65), le trypsinogène (9,30).

La migration électrophorétique est faite selon la programmation indiquée au tableau 5.

Tableau 5: Programme d'électrophorèse Biorad IPG

Biorad IPG-Strips program 7 cm	
Réhydratation	Non
Etape 1	250V pendant 2h
Etape 2	1000V pendant 2h
Etape 3	8000V pendant 12h
Etape 4	500V pendant 9h
V.h ⁻¹	103000

Dans la deuxième dimension, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par migration électrophorétique SDS-PAGE. L'équilibration des bandelettes est réalisée par incubations successives dans 2 solutions tampons préparées extemporanément (tableau 6). Pour cette étape, des gels de polyacrylamide de 12,5 % sont utilisés selon le protocole de Laemmli (1970) puis sont colorés au bleu de Coomassie puis au nitrate d'argent (Rabilloud et Chevallet, 2000). Une solution «stop» a été préparée pour arrêter la réaction de coloration.

Tableau 6: Composition des Tampons d'équilibration

	Tampon I	Tampon II
Urée (6 mol.L ⁻¹)	36 g	36 g
SDS 2 %	2 g	2 g
Tris/HCl 0.375 mol.L ⁻¹ , pH 8,8	25 mL	25 mL
Glycérol 30 %	30 mL	30 mL
Dithiothréitol 2 % (DTT)	2 g	-
Iodoacétamide 2,5 % (IAA)	-	2,5 g
Eau milliQ	Qsp 100 mL	Qsp 100 mL

2.5-Détection et différenciation des glycanes des extraits brut et purifié

➤ Détection des glycanes

La détection des glycoprotéines dans les deux échantillons (brut et purifié) a été réalisée à l'aide du DIG Glycan Détection Kit (*Roche*) dont le principe est basé sur l'oxydation du groupement hydroxyle du glycan porté par une glycoprotéine en groupement aldéhyde par un traitement au métapériodate. Une liaison covalente s'établit entre la digoxygénine (DIG) et le groupement hydrazide de l'aldéhyde. La DIG fixée à la glycoprotéine est ensuite détectée par des réactions immunologiques et enzymatiques en utilisant des anticorps spécifiques (anticorps anti-digoxygénine) couplés à la phosphatase alcaline. Le NBT/X-phosphate est le substrat utilisé pour visualiser la réaction. Les glycoprotéines sont détectées par réaction de coloration après analyse en gel d'électrophorèse en SDS-PAGE suivie du transfert en blot sur membrane de nitrocellulose (Burnette, 1981). Deux méthodes ont été utilisées pour la détection: la première est la détection par

oxydation et marquage à la digoxygénine dans le tube et la méthode de détection par oxydation et marquage à la digoxygénine sur membrane de nitrocellulose après électrophorèse en SDS-PAGE.

➤ Différenciation des glycanes

La différenciation a été effectuée d'une part en utilisant des lectines biotinylées marquées à la peroxydase. La lectine Concanavaline A (ConA) est spécifique du mannose, la lectine *Aleuria* (AAA) est spécifique du fucose et la lectine *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) est spécifique de la N-acétylglucosamine (Glc-NAc). Quinze microlitres d'échantillons purifié et bruts ont été analysés par électrophorèse en SDS-PAGE sur des gels de polyacrylamide de 12,5 %. Après migration, un transfert sur membrane de PVDF (*HybondTM P GE Healthcare Amersham, membrane optimized for protein transfert Roll 0,300 m x 3 m removal rating: 0,45 µm*) a été effectué pendant 5 heures à 250 mA dans le tampon MeOH/Tris-glycine (15/85) selon la méthode de Burnette (1981).

D'autre part, les lectines du kit de différenciation *Roche* ont été utilisées. Ces lectines sont marquées à la DIG couplées à la phosphatase alcaline. Il s'agit notamment de la lectine *Galanthus nivalis* agglutinine (GNA) qui reconnaît les résidus mannose en $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$ ou $\alpha(1-2)$ et permet d'identifier les N-glycanes de type oligomannosidiques ou les chaînes O- mannosylées. La lectine *Peanut* agglutinine (PNA) qui reconnaît le core disaccharidique galactose $\beta(1-3)$ N-acetyl galactosamine et permet d'identifier les O-glycanes. La lectine *Datura stramonium* agglutinine (DSA) qui reconnaît le disaccharide Gal-(1-4)GlcNAc dans les N-glycanes de type complexe et l'hybride dans les O-glycanes.

➤ Détermination des monosaccharides par méthanolyse et analyse des dérivés HFB par GC et GC-MS

Dans des tubes *Sovirel*, 100 à 300 µg de protéines d'extrait brut et purifié dialysé contre l'eau ou repris dans de l'eau après précipitation acétonique, sont introduits. Le mélange a été lyophilisé après avoir ajouté 2 µg de lysine comme standard interne soit 20 µL de solution de lysine à 100 µg.mL⁻¹ ou 1 mL de solution 100 µg.mL⁻¹ diluée à 2 %. Après lyophilisation toutes les étapes suivantes se déroulent en milieu anhydre selon Zanetta *et coll.*, (1999).

2.6-Détermination des peptides par spectrométrie de masse

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées dans le centre commun de spectrométrie de masse de Lille1. L'analyse par spectrométrie de masse est constituée d'une série d'opérations successives: les molécules à analyser sont ionisées dans la source de l'appareil,

obtenant un mélange d'ions. Ces ions sont filtrés selon leur rapport masse/charge par un analyseur et terminent leur course sur un détecteur.

Pour déterminer la carte peptidique des protéines de l'extrait de *B. aegyptiaca* isolées par SDS-PAGE et après digestion tryptique des spots purifiés, deux types d'ionisation ont été utilisés: la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF) et le couplage LC/MS.

➤ Détermination de la carte peptidique par la désorption/ionisation laser assistée par matrice: MALDI-TOF

Le MALDI ou désorption/ionisation laser assistée par matrice, est une technique qui permet de travailler sur une grande gamme de masse suivie d'une bonne précision de mesures et d'une grande rapidité d'analyse.

La technique utilise en général un faisceau laser pulsé émettant dans l'ultraviolet (U.V.) ou l'infrarouge (I.R.) pour désorber et ioniser un mélange matrice/échantillon cristallisé sur une cible (figure 7). L'énergie est restituée en partie et transférée à l'échantillon qui sera ionisé par transfert de proton puis par collision après désorption avec la matrice excitée pour former des ions monochargés. Les ions formés sont ensuite accélérés par application d'un champ électrique intense. La source MALDI utilisée, est couplée à un analyseur à temps de vol (TOF pour Time Of Flight). Le TOF est un tube de vol qui sépare les ions en fonction de leur vitesse au cours de leur déplacement et cet analyseur offre une gamme de masse théoriquement illimitée. La matrice α -cyano-4-hydroxy-trans-cinnamic acid (Aldrich) a été utilisée

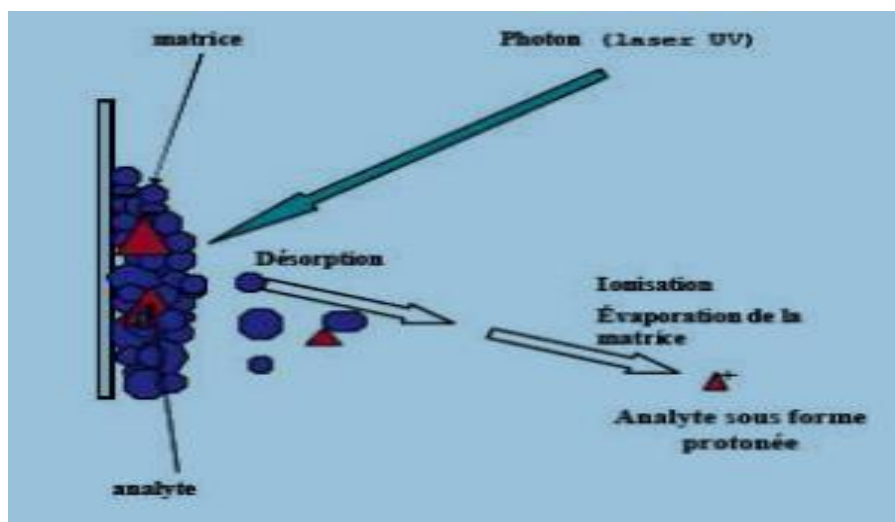


Figure 7: Principe du MALDI

➤ Détermination des séquences peptidiques par couplage LC/MS-MS

Le couplage LC/MS-MS a été réalisé sur un spectromètre de masse Q-STAR Pulsar quadripôle TOF (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Ontario, Canada) par une source d'ionisation par nano-électrospray (Protana, Odense, Danemark). Pour l'analyse par le couplage MS/MS, les peptides ont été dissous à volume égal dans un mélange méthanol/eau (1/1) contenant 0,1 % d'acide formique. Pour l'enregistrement des spectres de masse conventionnels, les données en temps de vol (TOF) ont été acquises par l'accumulation de 50 scans CMA (canaux multiple d'acquisition). Pour extraire les données MS/MS, les spectres ont été obtenus par l'accumulation de 60 scans CMA. Les analyses nano-HPLC-nano-ESI-MS/MS ont été réalisées sur un spectromètre de masse (LCQ Deca XP⁺, Thermo-electron, San José, CA) équipé d'une source d'ion nano-électrospray couplée au système de chromatographie liquide à nano-flux haute pression (LC Packings Dionex, Amsterdam, The Netherlands).

Les séquences peptidiques obtenues ont été comparées avec des bases de données *NCBI* et *UniProtKB* dans le but d'obtenir par blast, le match ou l'alignement de plusieurs séquences sur une même protéine d'un organisme séquencé que la fonction soit identifiée ou non.

3-CARACTERISATION ENZYMATIQUE

3.1- Mesure de l'activité enzymatique avec l'azocaséine

La détermination de l'activité protéolytique, de la température optimale, du pH optimum, de la stabilité thermique a été réalisée selon la méthode de Sarath *et coll.* (1989) en utilisant la Sulfanilamide-azocaséine ou azocaséine à 2 % comme substrat (figure 8). Le Sulfanilamide, agent colorant, est libéré lors de l'hydrolyse de la caséine et présente un maximum d'absorbance à 440 nm.

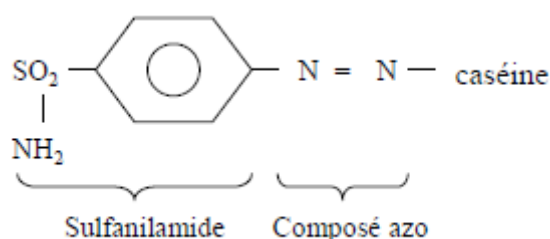


Figure 8: Schéma du composé sulfanilamide-azocaséine

Le substrat est une solution d'azocaséine à 2 % préparée dans une solution tampon (100 mmol/L, pH 5). La solution doit être clarifiée par centrifugation (12 000g, 10 min).

Le substrat et l'enzyme sont ajustés à la température de la réaction. La réaction débute dès que 150 μL d'enzymes sont ajoutés à 250 μL de solution de substrat. Le mélange est incubé à 40 °C pendant 1h. Un témoin est préparé en mélangeant 150 μL de tampon à 250 μL de substrat. La réaction est arrêtée en ajoutant 1,2 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 %. Un "témoin blanc" doit être préparé en ajoutant dans l'ordre: l'enzyme, le TCA, le substrat. Ce témoin permettra de déterminer l'absorbance au temps zéro. Les tubes sont centrifugés à 8000g pendant 5 minutes. L'absorbance est lue à 440 nm après avoir neutralisé le TCA en ajoutant 1,4 mL de soude 1 mol.L⁻¹.

3.2- Mesure de l'activité enzymatique avec l'hémoglobine

La détermination de l'activité protéolytique a été également réalisée avec comme substrat de l'hémoglobine dénaturée selon la méthode de Sarath *et coll.* (1989). Une solution aqueuse à 15 % d'hémoglobine (p/v) a été préparée puis centrifugée. La concentration en hémoglobine de cette solution est déterminée par la méthode de Crosby *et coll.* (1954). En présence du réactif de Drabkin, l'hémoglobine se transforme en cyanméthémoglobine stable qui absorbe dans le visible à 546 nm. 50 μL de surnageant sont ajoutés à 12,5 mL de réactif de Drabkin. Une solution à 14,7 % d'hémoglobine présente une absorbance de 0,4 à 546 nm.

La dénaturation de l'hémoglobine est effectuée en ajoutant 80 g d'urée à 5 g d'hémoglobine, à 37 °C pendant 1h. Le volume est ajusté à 80 mL par de l'eau distillée. Le pH est ensuite ajusté par ajout des tampons citrate 0,25 mol.L⁻¹ (pH 2,7 à 5,5), acétate (pH 3 à 5,5), phosphate (pH 6 à 8), et du mélange acide borique/KCl/NaOH (pH 8,5 à 10) à la solution d'hémoglobine (concentration finale 2 %). Pour démarrer l'essai, 5 mL de milieu réactionnel sont mélangés à 1 mL de solution d'enzyme puis incubés. La réaction est stoppée en ajoutant 10 mL de TCA au mélange après 1h d'incubation. Un essai blanc a été réalisé en parallèle pour chaque pH étudié en mélangeant dans l'ordre l'enzyme, le TCA et le substrat. La précipitation est obtenue au bout de 30 min. Les échantillons ont été filtrés sur papier Whatman ou centrifugés et l'absorbance a été mesurée à 280 nm.

3.3-Dosage des fonctions –NH₂ par la méthode à l'Ortho-PhtalaldiAldéhyde (OPA)

Afin de mesurer plus précisément l'hydrolyse de l'hémoglobine par l'extrait enzymatique, la méthode de Church *et coll.* (1983) utilisant l'OPA a été employée pour doser les amines primaires (-NH₂) libérées au cours de l'hydrolyse. La solution d'OPA (25 mL de 0,1 mol.L⁻¹ de tétraborate de sodium, 5 mL de SDS 10 %, 100 μL de β -mercaptoéthanol, 40 mg d'OPA dissous dans 1 mL de méthanol) a été préparée extemporanément puis ajustée à 50 mL avec de l'eau distillée. La gamme

étalon a été préparée à partir d'une solution mère de leucine à 10 mmol.L⁻¹. 50 µL de chaque essai ont été mélangés à 1 mL d'OPA. Les absorbances ont été lues à 340 nm après 1h d'incubation.

3.4 - Digestion des caséines

Deux milligrammes de caséine bovines commerciales (α -, β -, κ -) ont été dissous dans 1 mL de tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 6,2 et incubés indépendamment avec les échantillons purifiés par chromatographie d'échanges d'ions à pH 8,1 sur Q-Sepharose, puis avec des extraits bruts lyophilisés et concentrés et de la chymosine. L'incubation s'est déroulée à 30 °C avec un rapport enzyme-substrat de 1/100. Des prélèvements ont été réalisés à des intervalles de temps de 1h, 2h, 4h et 24h. L'arrêt de la réaction s'est faite par ajout de 100 µL de tampon échantillon d'électrophorèse contenant du β -mercaptoéthanol selon McSweeney *et coll.* (1993), suivi d'un chauffage pendant 3 min à 100 °C dans un bain marie à sec. Les échantillons ont été ensuite analysés par électrophorèse en SDS-PAGE selon Laemmli (1970).

3.5 -Détermination du pH optimum

Le pH optimum a été déterminé avec l'azocaséine à 2 % préparée à différents pH. Différents tampons ayant un pouvoir tampon élevé, ont été utilisés: ce sont le tampon citrate de sodium 0,1 mol.L⁻¹, (pH 3 à 5), le tampon phosphate de potassium 0,1 mol.L⁻¹, (pH 5 à 6,5), le tampon Tris/HCl à 0,2 mol.L⁻¹, (pH 7 à 8,5), le tampon glycine/NaOH à 0,1 mol.L⁻¹ (pH 8 à 10). Chaque solution a été clarifiée par centrifugation à 12000g pendant 10 min et le pH a été noté.

Le pH optimum a également été déterminé grâce à l'hydrolyse de l'hémoglobine selon suivie du dosage par l'OPA. Les solutions tampon de citrate de sodium 50 mmol.L⁻¹ (pH 2,7 à 5,5), d'acétate de sodium 0,1 mol.L⁻¹ (pH 3 à 5,5), de phosphate de potassium 0,1 mol.L⁻¹ (pH 6 à 8), et du mélange acide borique/KCl/NaOH (pH 8,5 à 10) ont été utilisées.

3.6-Détermination de la température optimale

L'azocaséine 2 % préparée dans du tampon phosphate pH 5 à 0,1 mol.L⁻¹ a été utilisée pour la détermination de la température optimale selon Sarath *et coll.*, (1989). L'échantillon à analyser a été incubé pendant 5 min à des températures variables de 0, 20, 30, 40, 50, 60 et 70 °C. Un essai blanc a été réalisé en parallèle pour chaque température étudiée en mélangeant dans l'ordre l'enzyme, le TCA et le substrat.

3.7-Détermination de la stabilité thermique

Cette étude a été réalisée selon Sarath *et coll.*, (1989) en utilisant l'azocaséine comme substrat. Les échantillons à analyser ont été incubés à des températures variables de 4, 30, 37, 50, 60 et 70 °C. Pour chacune de ces températures, des prélèvements ont été effectués à des temps successifs de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200, 260, 340, 530 et 600 min. L'activité résiduelle a été mesurée en utilisant l'azocaséine comme substrat. Un "témoin blanc" a été préparé pour chaque essai en ajoutant dans l'ordre: enzyme, TCA, substrat.

3.8- Détermination de la spécificité de la protéase sur des substrats synthétiques

Des échantillons issus d'un extrait purifié de la chromatographie sur Q-Sepharose et d'un extrait brut ont été utilisés pour cette étude.

➤ Le substrat H-Pro-Thr-Glu-Phe-Phe-(4-NO₂)-Arg-Leu-OH

L'hydrolyse de ce peptide synthétique chromogène indique sa spécificité à la famille des protéases à acide aspartique. Pour cette étude, une solution mère de substrat à 0,2 mmol.L⁻¹ a été préparée en ajoutant 100 µL de substrat à 300 µL de tampon acétate de sodium, 50 mmol.L⁻¹, pH 5. Cette solution a ensuite subi une dilution de 1/100 et de 1/200. L'essai est démarré en mélangeant 150 µL substrat dilué et 250 µL de tampon d'acétate de sodium dans une cuve en quartz. Après avoir fait le blanc, 10 µL d'extrait enzymatique ont été ajoutés au mélange précédant et l'absorbance a été lue à 310 nm toutes les 5 min.

➤ Le substrat N-Succinyl-trialanyl-p-nitroanilide

La solution de substrat N-Suc-Ala₃-pNa, 100 mmol.L⁻¹, est préparée dans du diméthyle sulfoxide (DMSO) pur. L'échantillon enzymatique (150 µL) est incubé à température ambiante pendant 5 minutes avec 2 mL de tampon Tris/HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 8,1 contenant de l'EDTA à 1 mmol.L⁻¹ et du β mercaptoéthanol à 3 mmol.L⁻¹. Après avoir établi le zéro sur le spectrophotomètre, 10 µL du substrat sont ajoutés à cette solution. L'absorbance de la p-nitroaniline libérée est lue à 410 nm toutes les 15 secondes pendant 5 minutes.

➤ Le substrat N-Succinyl-dialanyl-Pro-Phe-pNa

La solution de substrat N-Succinyl-Ala₂-Pro-Phe-pNa, 100 mmol.L⁻¹, est préparée dans du diméthyle sulfoxide (DMSO) pur.

Des essais ont été réalisés avec 150 µL d'échantillon enzymatique et 50 µL de substrat dans un volume final de 2 mL. Plusieurs pH ont été testés: pH 5 en tampon acétate de sodium 200

mmol.L⁻¹, pH 7 en tampon tri-sodium citrate 100 mmol.L⁻¹ et pH 8 en tampon Tris/HCl 50 mmol.L⁻¹.

L'enzyme coupe la liaison peptidique se trouvant entre la Phénylalanine et la pNa (figure 9) tout comme la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la k-caséine présent dans le lait. L'absorbance de la p-nitroaniline libérée est lue toutes les 15 secondes à 410 nm pendant 5 min.

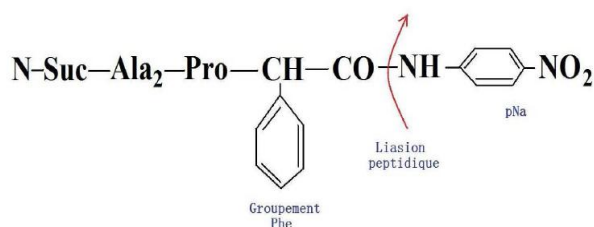


Figure 9: Schéma de l'hydrolyse du N-Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa

3.9-Utilisation d'inhibiteurs de protéases

Cette étude porte sur l'inhibition relative de l'activité enzymatique de l'extrait par des inhibiteurs spécifiques à des concentrations définies par Raposo et Domingos (2008) au tableau 7. Le dosage des activités relatives a été effectué par la méthode de Sarath *et coll.*, (1989) en utilisant l'azocaséine à 2 % comme substrat.

Tableau 7: Inhibiteurs et classes de protéases

Inhibiteurs	Type de protéase	Concentration
Aprotinine	Serine	3,8 U.mL ⁻¹
PMSF	Serine	1,00 mM
Cystatine	Cystéine	0,50 mM
Iodoacétamide	Cystéine	0,50 mM
O-Phenantroline	Métalloprotéase	10,0 mM
Pepstatine A	Aspartique	10,0 µM

Les échantillons ont été dilués de moitié dans le tampon phosphate 100 mmol.L⁻¹, pH 5,5. Le mélange constitué de l'enzyme et de l'inhibiteur est incubé pendant 30 minutes à la température de 40 °C. L'essai est démarré dès que 250 µL d'azocaséine sont ajoutés au mélange précédent. Le mélange est incubé à 40 °C pendant 1h. Un témoin actif constitué de l'enzyme, du tampon et de l'azocaséine a été également préparé. Le blanc absorbance est constitué du tampon et de l'azocaséine.

4-FABRICATION DES FROMAGES

4.1- Etude microbiologique et assainissement de l'extrait

Vingt cinq grammes de graines ont été pesés et macérés dans 60 mL de solution NaCl 5 %. Après une nuit de macération à 30 °C, l'extrait obtenu après filtration à travers la gaze stérile est analysé.

➤ Analyses microbiologiques

Le choix des analyses microbiologiques a été basé sur les critères microbiologiques applicables en Union Européenne sur des produits résultant de la transformation du lait thermisé (Normes CE n° 2073/2005 modifiées par Règlement CE/1441/2007 du 5 décembre 2007 et rectifiées le 29/04/2008).

Les Coliformes ont été recherchés et dénombrés sur milieu VRBL (*Violet Red Bile Lactose agar*, Biokar) après incubation à 37 °C pendant 24h. Seules les colonies rouges caractéristiques des coliformes ont été dénombrées.

Staphylococcus aureus a été recherché par dénombrement sur milieu Baird Parker (Biokar) après incubation à 37 °C pendant 24h. La présence de *Staphylococcus aureus* a été confirmé à travers le test de la coagulase réalisé sur du plasma de lapin.

La recherche de la présence de salmonelles a été effectuée suivant la norme EN/ISO 6579. Après un pré-enrichissement de 10 mL d'extrait dans 90 mL d'eau peptonnée tamponnée (Biokar) à 37 °C pendant 24h, un enrichissement a été réalisé dans le milieu Rapaport pendant 24h à 42 °C. Puis, un isolement a été effectué sur milieu Hecktoen (Biokar). Après 24h d'incubation à 37 °C, l'observation de la présence ou non des colonies caractéristiques des salmonelles a été réalisée.

Listeria monocytogenes a été recherchée suivant la norme EN/ISO 11290. Après un pré-enrichissement de 24h à 30 °C sur milieu Frazer au ½ (Biokar), un enrichissement de 24h à 37 °C sur milieu Frazer complet (Biokar) a été réalisé. Puis, un isolement a été effectué sur milieu Palcam (Biokar). Après 24h d'incubation à 37 °C, l'observation de la présence ou non des colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* a été réalisée.

➤ **Traitement bactéricide sur *E.coli***

Des tests d'efficacité pour la destruction des coliformes (*E. coli*) par le métabisulfite de sodium et l'eau de javel ont été effectués. Des solutions de concentrations de 75, 150 et 300 ppm finale de métabisulfite de sodium et d'eau de javel (à partir d'une concentration initiale de 2,6 % de chlore actif) ont été préparées.

Un volume de 0,5 mL de chaque solution a été incubé avec 5 mL de bouillon d'*E. coli* à 10^5 ufc/mL à température ambiante (23 °C) à des temps respectifs de 5 et 15 min. Ensuite, 100 µL de chaque mélange ont été prélevés et déposés dans des boîtes de pétri contenant de la gélose VRBL. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24h. Un volume de 0,1 mL de bouillon d'*E. coli* à 10^5 ufc.mL⁻¹ a été incubé avec de la gélose comme témoin.

➤ **Traitement bactéricide sur des graines entières contaminées par *E.coli***

Seize fruits de *B aegyptiaca* (environ 140 g) dont les épicarpes sont intacts ont été incubés 1h dans 100 mL d'un bouillon d'*E. coli* à 10^6 ufc.mL⁻¹ à température ambiante (23 °C). Deux lots de 4 fruits ont été mis en contact pendant 15 min (sous légère agitation) et simultanément avec 60 mL d'une solution d'eau de javel de concentration finale de 75 et 150 ppm préparée à partir d'une solution de 2,6 % de chlore actif. Chacun des deux lots a été ensuite trempé dans un volume de 60 mL d'eau stérile pendant 15 minutes pour être rincé. Le troisième lot a été analysé seulement après avoir été rincé dans 60 mL d'eau stérile pendant 15 minutes. Le quatrième lot de 4 fruits n'a subi aucun traitement après le contact avec le bouillon d'*E. coli*. Ensuite, chaque lot a été débarrassé de son épicarpe et les graines ont ensuite été macérées dans une solution de NaCl 5 % pour en extraire l'activité enzymatique. 1 mL des différentes eaux de rinçage et des extraits issus de la macération a été prélevé et déposé dans des boîtes de pétri contenant de la gélose VRBL. Ces boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24h.

4.2-Fabrication des fromages et mesures texturales

➤ **Préparation des échantillons**

Les fromages ont été préparés avec la présure (fromage de référence) et avec l'extrait végétal des fruits de *Balanites aegyptiaca*.

Une masse d'environ 260 g des fruits de *Balanites aegyptiaca* ont été pesés puis introduits dans un bêcher contenant 800 mL de solution de NaCl 5 %. Après macération au réfrigérateur pendant une nuit à 4 °C, les graines ont été ensuite triturées et filtrées à travers un tissu en toile blanche. Les filtrats obtenus ont été concentrés sur membrane Amicon dont le seuil de coupure est

de 10 kDa. Les échantillons obtenus ont été décolorés avec du charbon végétal actif (10 %) puis centrifugés à 10 000 g, 4 °C pendant 30 min.

➤ Protocole de fabrication des fromages

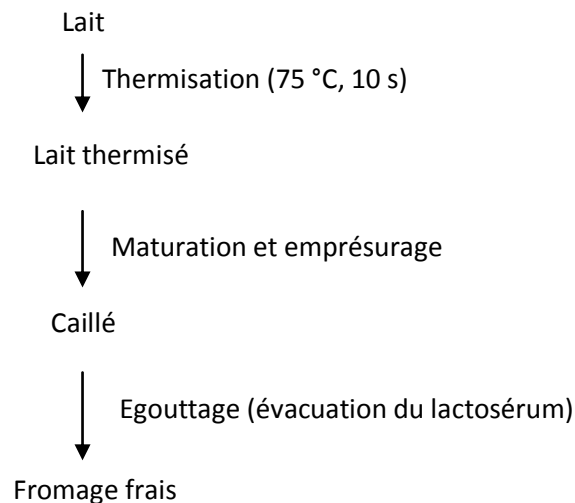


Figure 10: Diagramme de fabrication des fromages

➤ Préparation du lait, thermisation et maturation

Le lait utilisé ici a été préparé selon la méthode de l'IDF (1992). Douze grammes de lait en poudre ont été dissous dans 100 mL de CaCl_2 10 mmol.L⁻¹.

Cent millilitres de lait ont été pasteurisés (75 °C, 10s) puis laissés maturer par la flore banale pendant 3 heures à la température ambiante (20 ± 2 °C).

➤ Emprésurage

Le lait thermisé et mûri est ensuite porté à une température de 35 °C etensemencé par 5 mL de présure diluée à 1/500 (v/v) d'une part et par 5 mL de l'extrait des fruits de *Balanites aegyptiaca* d'autre part. La coagulation est survenue au bout de 6h.

➤ Egouttage

Le coagulum est séparé du lactosérum à l'aide d'un tissu en toile de coton blanc propre et perméable au lactosérum pendant au moins 2 heures d'égouttage à la température ambiante. Le caillé obtenu constitue ainsi un fromage frais et est utilisé pour déterminer quelques paramètres de texture.

➤ Mesures texturales

Les propriétés texturales des fromages obtenus ont été évaluées par la méthode Texture Profile Analysis (TPA). Le profil de texture a été réalisée avec un texturomètre *TAplus* (Lloyd Instruments, Leicester, U.K., texture analyser) équipé et piloté par le logiciel *NEXYGENPlus*.

Les échantillons (36 ± 1 mm d'épaisseur) ont été soumis à deux cycles consécutifs de compression-décompression uniaxiale à l'aide d'une sonde cylindrique de 12 mm de diamètre. Les conditions expérimentales de ce test TPA sont consignées dans le tableau 8.

Tableau 8: Conditions expérimentales du test TPA

Pénétration	15 mm
Vitesse de compression 1	5 mm.min ⁻¹
Vitesse retour 1	5 mm.min ⁻¹
Maintien	0 s
Vitesse de compression 2	15 mm.min ⁻¹
Vitesse retour 2	15 mm.min ⁻¹

Quelques propriétés texturales (dureté, élasticité, adhésivité, force d'adhésion) ont été calculées sur la base des profils obtenus. Le module d'élasticité des coagulum obtenus a été déterminé selon la loi de Hooke pour un solide élastique linéaire.

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

σ : Contrainte, $\sigma = F/S$: force par unité de surface (N.m⁻²)

ε : Déformation, $\Delta l/l_0$

F: Force (N)

S: Surface de contact de la sonde (m²)

E: Module d'Young (module d'élasticité) (Pa) est le coefficient de proportionnalité entre la contrainte et la déformation

Δl : Distance parcourue par la sonde (m)

l_0 : Epaisseur initiale du fromage (m)

4.3-Aromatisation des fromages par les huiles essentielles

➤ Extraction des huiles essentielles

Les rhizomes de *Zinziber officinalis* (figure 11) et les feuilles d'*Ocimum gratissimum* (figure 12) ont été finement pulvérisés. Les huiles essentielles extraites ont été introduites tour à tour dans un dispositif d'hydro-distillation de type Clevenger comportant une plaque chauffant, une cocote minute contenant la matière végétale et un réfrigérant. Après 5 heures de distillation une phase organique contenant les huiles essentielles repose au dessus de la phase aqueuse. L'huile est séparée de l'eau à l'aide d'une pipette munie d'une poire puis conservée dans un réfrigérateur à 4 °C avant l'utilisation.



Figure 11: Rhizome de *Z. officinalis*



Figure 12: Feuilles d'*O. gratissimum*

➤ Préparation des fromages frais

Le fromage frais a été fabriqué à partir du lait de zébu. Ce lait a été pasteurisé en vrac à 75 °C, 10s puis laissé à mûrir par la flore banale pendant 3h. L'emprésurage a été fait avec l'extrait de présure (Cardin, Texel, Groupe Rhône-Poulenc France de force 1/10000) diluée au 1/500^{ème} de façon à avoir un temps de coagulation de 4h, puis avec l'extrait du mésocarpe des fruits de *B. aegyptiaca* décoloré et lyophilisé. Le caillé a été ensuite découpé en portion cubique puis mis en égoutter dans un sac en toile de coton blanc propre pendant 2h. Après avoir récupéré le caillé on y a incorporé des huiles essentielles. Une goutte de la phase contenant les huiles essentielles a été diluée au tiers dans l'huile des graines de coton (*Diamor*, Cameroun) avant d'être incorporée au fromage. La quantité d'huile ajoutée représentait pratiquement 4 ‰ (v/p) de la masse du fromage. Le lissage a été effectué à l'aide d'un broyeur de type robot (*Moulinex*, France).

4.4-Analyse sensorielle

Elle comportait un panel d'épreuve accompagné d'un questionnaire comportant des informations sur le dégustateur et l'échelle de notation utilisée.

➤ Le Panel

Les dégustateurs (136 au total) étaient constitués d'étudiants, d'enseignants et des ménagères de la localité de Bini-Dang. Leur âge variait entre 21 et 49 ans. Ils étaient originaires du Cameroun et du Tchad. Les panelistes ont subi préalablement un entraînement qui consistait à préparer les dégustateurs pour l'épreuve. Les tests ont été faits 1 à 2h après le déjeuner.

➤ L'épreuve

Elle portait essentiellement sur le test hédonique (Köster, 1990). Pendant ce test, les échantillons de fromage aromatisé et non aromatisé sont présentés de façon monadique pour être appréciés sur une échelle de notation de 1 à 9 points. Chaque dégustation est suivie d'un gargarisme à grande eau afin d'éviter toute interférence d'arôme.

➤ Le questionnaire

Ce questionnaire se présente comme suit au tableau 9

Tableau 9: Fiche d'analyse sensorielle

Identification	Code		Nationalité	Province d'origine	
	Age		Date et Heure		
	Profession		Sexe		
	Consommez-vous du Fromage?				
Régularité	Très souvent	Souvent	Rarement	jamais	
Echelle	Cinq échantillons de fromage vous sont présentés. Exprimez votre appréciation de chaque fromage suivant l'échelle ci-dessous: 1 déteste extrêmement 2 Déteste beaucoup 3 Déteste modérément 4 Déteste un peu 5 N'aime pas, ne déteste pas 6 Aime un peu 7 Aime modérément 8 Aime beaucoup 9 Aime extrêmement				
Paramètres sensoriels	Gout	Arome	Couleur	Texture	Appréciation générale
Fromage A					
Fromage B					
Fromage C					
Fromage D					
Fromage E					
	Merci pour votre collaboration				

4.5-Analyses statistiques

Chaque essai a été répétée trois fois et les résultats obtenus ont été exprimés en termes de moyennes $\pm$ écart-type. Les analyses de variance ont été menées entre les variables à l'aide des logiciels de statistique SAS[®] (1991), Xlstat et Statgraphics Plus 5.0.

RESULTATS ET DISCUSSION

1^{ère} partie

BIOCHIMIE DE L'EXTRAIT COAGULANT

1- DETERMINATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION: PREPARATION D'UN EXTRAIT BRUT

1.1- Effet du NaCl

Une extraction a été faite à partir des fruits macérés dans de l'eau ou dans une solution de NaCl 5 % (P/V). Le choix du NaCl se base sur les travaux antérieurs de Yousif *et coll.*, 1996; Mohamed Ahmed *et coll.*, 2009_b; Hamdy *et coll.*, 1976; ceux-ci ont montré que le NaCl permettait d'améliorer l'extraction et l'activité coagulante de certains extraits enzymatiques.

Pour exploiter nos résultats, une unité coagulante a été définie suivie d'une unité totale. L'activité spécifique, le taux de purification et le rendement d'extraction ont été aussi calculés. Une unité coagulante (U) désigne la quantité d'enzyme permettant la coagulation de 1 mL de lait en 60 min, à 37 °C et à pH 6,4.

L'activité spécifique de l'enzyme exprimée en unité coagulante par milligramme de protéine a été calculée avec la relation suivante:

$$AS = U * \frac{1}{[Protéines]}$$

Avec

AS: activité spécifique (U/mg)

U: Unité coagulante (U/mL)

[Protéines]: concentration en protéines (mg/mL)

Le facteur de purification a été calculé à partir des activités spécifiques:

$$Facteur\ de\ purification = \frac{AS_{données}}{AS_{initiales}}$$

Le rendement d'extraction a été calculé à partir des protéines totales:

$$Rendement\ d'extraction = \frac{Protéines\ (mg)_{données}}{Protéines\ (mg)_{initiales}}$$

Le rendement d'activité a été déterminé par le rapport des activités totales:

$$Rendement\ d'activité = \frac{Activité\ totale\ (U)_{données}}{Activité\ totale\ (U)_{initiales}}$$

Le tableau 10 présente quelques résultats de l'extraction de 100 g de fruits de *B. aegyptiaca*.

Tableau 10: Comparaison des effets des extractions par l'eau et NaCl sur l'activité coagulante

Solution d'extraction	Activité coagulante (U.mL ⁻¹)	Protéines (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)
Eau distillée	0,4	178	93	0,52
Solution NaCl (5 %)	1,4	58,8	133	2,3

Les résultats indiquent que l'extrait au NaCl possède une activité coagulante 4 fois supérieure à celle de l'extrait à l'eau pour une concentration en protéines 3 fois inférieure. L'activité spécifique de l'extrait au NaCl est 5 fois supérieure à l'extrait obtenu avec l'eau. La présence du NaCl permettrait ainsi de maintenir l'activité des enzymes dans la solution. Ainsi, malgré sa faible concentration en protéines, l'extrait au NaCl donne une meilleure activité coagulante. De même, la présence du NaCl dans la solution d'extraction accroît la force ionique augmentant ainsi la solubilité des enzymes coagulants. Ces résultats corroborent ceux de Yousif *et coll.* (1996) qui a extrait des enzymes coagulant de *Solanum dubium* en utilisant une solution de NaCl à 5 %.

La figure 13 montre que le NaCl dans la solution d'extraction entraîne la libération du maximum de protéines coagulante dans le milieu. En effet, l'analyse électrophorétique a montré 4 bandes protéiques de 28, 32, 38 et 43 kDa communes pour l'extrait à l'eau distillée et au NaCl. Deux bandes protéiques supplémentaires de 70 kDa et 85 kDa sont observées dans l'extrait au NaCl, sans doute due à la meilleure extraction.

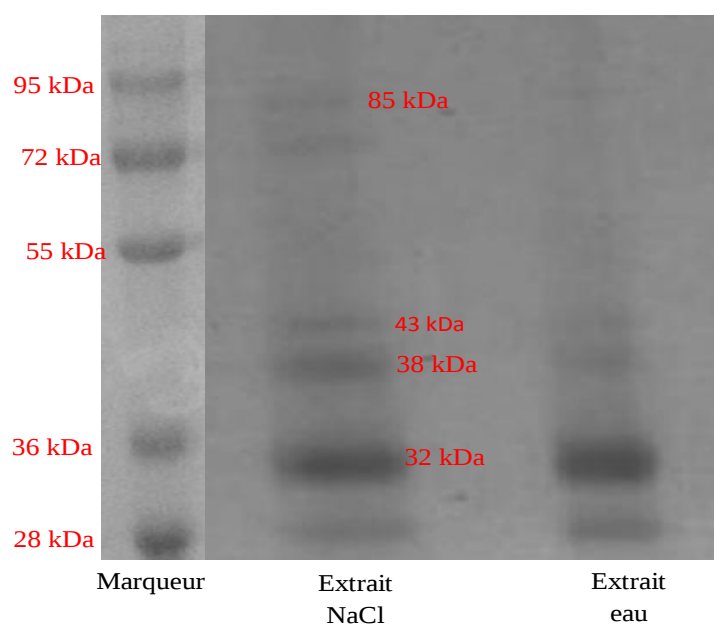


Figure 13: Electrophorèse de l'extrait avec et sans NaCl

L'extrait brut obtenu est comme la plupart des extraits végétaux de couleur jaune brun, qui peut influencer significativement la couleur du fromage; de même que son double goût sucré et amer. Une purification permettrait de débarrasser l'extrait des molécules responsables de sa couleur et de son double goût.

1.2- Effet du pH

Au cours de nos différentes manipulations nous avons observé des temps de coagulation très longs (supérieurs à 5 heures) ou une perte d'activité coagulante lorsque l'extraction était réalisée à pH 3 dans du tampon citrate de sodium contenant du NaCl (1 mol.L⁻¹). Mais après plusieurs lavages de l'extrait brut par diafiltration avec différents tampons (tampon acétate de sodium (20 mmol.L⁻¹) pH 4,5; tampon phosphate de sodium (50 mmol.L⁻¹) pH 6; tampon Tris-HCl (25 mmol.L⁻¹) pH 7,6 et le tampon Tris-HCl (50 mmol.L⁻¹) pH 8,1 contenant de l'EDTA (1 mmol.L⁻¹) et du β -mercaptoéthanol (3 mmol.L⁻¹)), une reprise de l'activité coagulante a été constatée avec une amélioration des temps de coagulation (tableau 11).

Tableau 11: Activité coagulante de l'extrait après diafiltration à pH variable

Solution d'extraction	pH 3 + NaCl 1mol.L ⁻¹				
Solution de diafiltration	pH 3	pH 4,5	pH 6	pH 7,6	pH 8,1
Activité coagulante (U.mL ⁻¹)	1,5	2,5	1,66	3,15	1,27

Pour comprendre ce phénomène, des électrophorèses ont été réalisées en comparant l'extrait brut avec les différents extraits diafiltrés. Le résultat obtenu est présenté sur la figure 14.

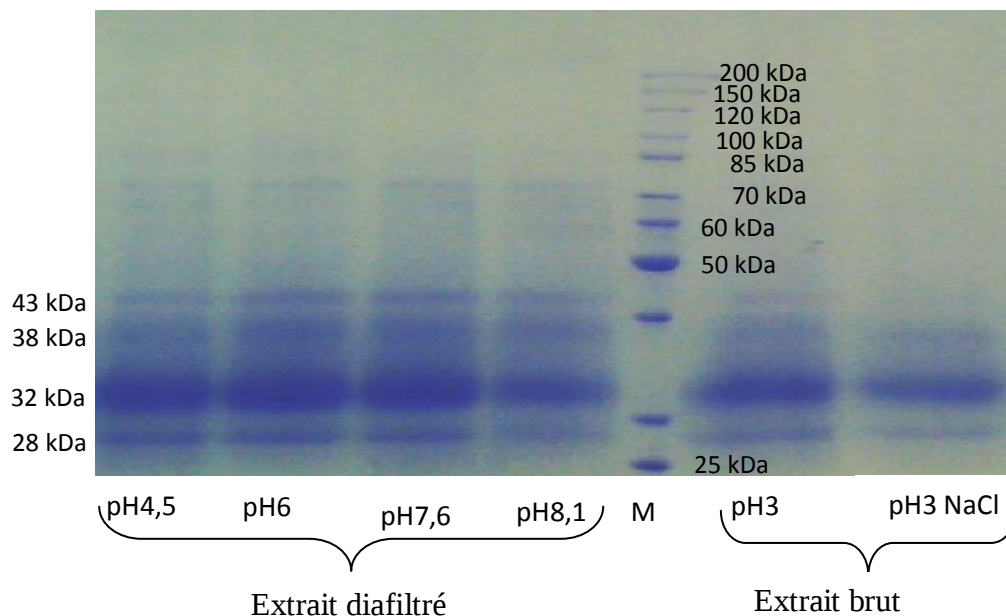


Figure 14: Electrophorèse de l'extrait brut avec et sans NaCl comparée avec les extraits diafiltrés et concentrés à différents pH

L'observation de ce gel nous permet de remarquer l'absence de la bande protéique de 43 kDa dans l'extrait brut pH 3 contenant du NaCl. En effet, cet extrait ne coagule pas le lait comme nous l'avons souligné plus haut, mais après dialyse et concentration on a une reprise de l'activité coagulante et apparition de la bande protéique de 43 kDa. Deux hypothèses ont été retenues pour justifier ces deux phénomènes: soit il existe un point d'activation ou d'autoprotéolyse lorsqu'on évolue du pH 3 très acide vers des pH moins acides (pH 4,5 et pH 6) aux pH basiques (pH 7,6 et pH 8,1), soit il se pose un problème de solubilité de la bande de 43 kDa en présence du NaCl à des pH très acides. Dans une première démarche nous avons entrepris de vérifier la première hypothèse en incubant l'extrait brut pH 3 dans différents tampons. Ainsi, plusieurs prélèvements ont été effectués à différents temps et ont été étudiés par électrophorèse, ensuite les temps de coagulation ont été mesurés. Après plusieurs essais aucun changement n'a été visible au cours du temps nous n'avons obtenu aucun résultat probant permettant de démontrer l'autoprotéolyse ou l'activation en passant d'un pH à l'autre. Ainsi l'on peut écarter l'hypothèse selon laquelle l'enzyme contenue dans notre extrait brut serait auto-protéolytique ou posséderait une limite d'activation. La deuxième hypothèse semble plus probante en effet au cours des étapes de dialyse, d'ultrafiltration et de diafiltration le NaCl est éliminé au fur et à mesure de notre extrait tamponné ce qui augmenterait ainsi sa solubilité protéique notamment celle des protéines coagulantes d'où l'apparition de la bande de 43 kDa et la reprise de l'activité coagulante.

Ces résultats ont également montré que l'ultrafiltration suivie de la diafiltration peuvent être utilisées pour améliorer l'activité enzymatique de l'extrait. La diafiltration quand à elle peut

contribuer à l'élimination des différents pigments qui confèrent à l'extrait sa coloration jaunâtre. Cette même observation a été faite sur l'extrait coagulant de *Cynara* (Sidrach *et coll.*, 2005).

1.3- Décoloration de l'extrait brut au NaCl

Les travaux antérieurs ont montré que les fromages obtenus avec l'extrait de *B. aegyptiaca* comme enzyme coagulante avaient un arrière goût amer (Libouga *et coll.*, 2006). Cet arrière goût amer serait dû soit à l'activité protéolytique très poussée de l'extrait soit à sa concentration en polyphénols. Ainsi, un extrait débarrassé des polyphénols donnerait des fromages sans amertume; un extrait purifié permettrait également une meilleure connaissance des enzymes et la maîtrise de la technologie fromagère pour limiter l'extrême activité protéolytique. Des essais de décoloration ont été effectués soit par précipitation au sulfate d'ammonium soit par adsorption sur du charbon actif.

- **Effet du sulfate d'ammonium**

La précipitation au sulfate d'ammonium ou *salting out* est une méthode largement utilisée dans la purification des protéines. Elle est très appropriée pour le fractionnement des protéines et a montré son efficacité dans l'élimination de plusieurs contaminants d'extraits protéiques. Plusieurs saturations et précipitations au sulfate d'ammonium ont été réalisées avec l'extrait au NaCl à des pourcentages de 25, 30, 60 et 75 % pour éliminer les polyphénols. En effet, les polyphénols présents en grande quantité dans les extraits végétaux coagulants sont fréquemment éliminés par le sulfate d'ammonium (Barros *et coll.*, 2001; Raposo et Domingos, 2008). La précipitation au sulfate d'ammonium de l'extrait de *B. aegyptiaca*, a entraîné une perte importante de l'activité coagulante; la resolubilisation des précipités n'a même pas été possible. Des résultats similaires ont été obtenus par Llorente *et coll.* (2004) et Sidrach *et coll.* (2005) pour les fleurs de *Cynara scolymus*. Ceux-ci ont montré que l'utilisation du sulfate d'ammonium réduisait l'activité enzymatique de l'extrait et ne permettait pas de le décolorer. Cette méthode a donc été abandonnée.

- **Effet du charbon actif**

Le tableau 12 présente les résultats obtenus avant et après concentration par ultrafiltration frontale et décoloration de l'extrait par le charbon actif. L'activité coagulante a été multipliée par trois et le facteur de purification a doublé. On remarque tout de même qu'on récupère 95 % de l'activité coagulante après la concentration contre 70 % après décoloration. La teneur en protéines passe de 84,4 mg à 35,3 mg respectivement pour l'extrait brut et l'extrait décoloré. La décoloration de l'extrait améliore l'activité coagulante qui passe de 0,85 U.mL⁻¹ à 2,2 U.mL⁻¹ malgré un rendement d'extraction protéique de 41,8 %.

Tableau 12: purification partielle de l'extrait au NaCl par décoloration au charbon actif

	Protéines totales (mg)	Activité coagulante (U.mL ⁻¹)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)	Rendement d'extraction (%)	Rendement d'activité (%)	Facteur de purification
Extrait brut	84,4	0,85	123	1,5	100	100	1
Extrait concentré	62,3	2,2	118	1,9	73,8	96	1,3
Extrait décoloré	35,3	2,2	84,1	2,4	41,8	70	1,7

La décoloration au charbon actif élimine les molécules responsables de la couleur de l'extrait qui semble interférer avec l'activité enzymatique de l'extrait des fruits de *B. aegyptiaca*. Ainsi, le charbon actif est très efficace dans un procédé de purification; en effet Llorente *et coll.* (2004) soulignent que la décoloration permet d'éliminer les polyphénols, d'améliorer l'activité coagulante et d'augmenter la viscosité de l'échantillon.

2-MISE EN EVIDENCE DE PLUSIEURS ACTIVITES COAGULANTES DANS L'EXTRAIT BRUT

Les protéases comme toutes les enzymes utilisables en technologie alimentaires ont une activité qui dépend des conditions d'utilisation, dont les plus importantes sont la concentration en enzyme, la température et le pH.

2.1-Effet de la concentration de l'enzyme

A l'instar des autres enzymes coagulantes (McMahon et Brown, 1985) telles que la présure et les moisissures, la concentration en enzyme des extraits de *B. aegyptiaca* affectent le temps de coagulation. Dans les conditions idéales où le temps de coagulation est calculé une telle droite de régression pour la chymosine passe par l'origine, car la chymosine affecte spécialement la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caséine kappa. Chitipinitiyol et Crabbe (1998) ont montré qu'il existe une relation linéaire entre l'inverse de la concentration en enzyme et les temps de coagulation. Pour l'extrait de *B. aegyptiaca*, il y a une corrélation forte ($R^2 = 0,99$) entre le temps de coagulation et l'inverse de la concentration en enzyme (figure 15).

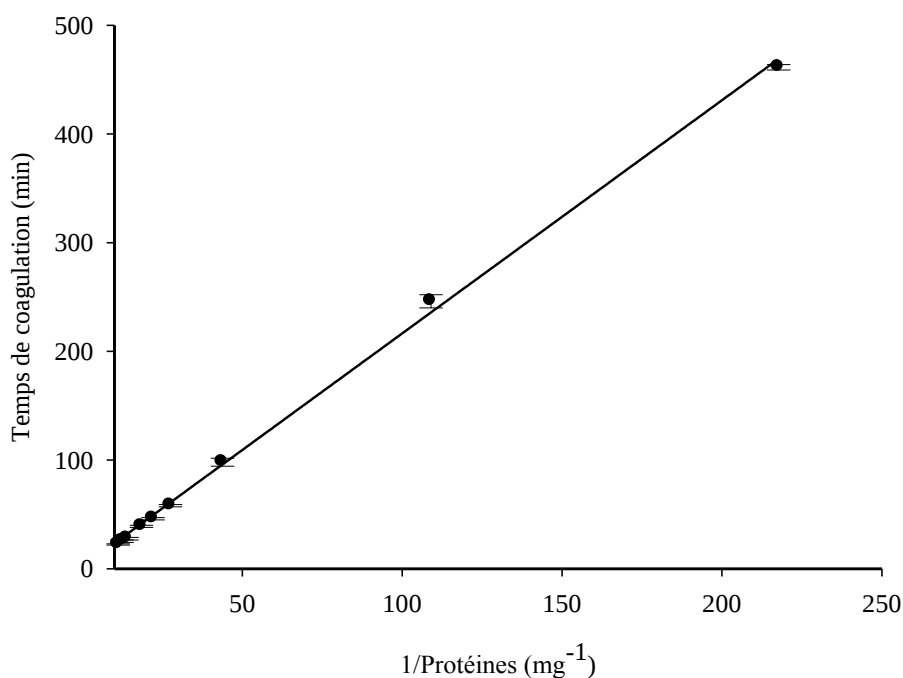


Figure 15: Effet de la concentration de l'extrait brut sur la coagulation du lait

Cependant, la droite de régression (figure 16) ne passe pas par l'origine. Cela peut être dû soit au manque de spécificité des enzymes de *B. aegyptiaca* sur la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆, soit parce que d'autres protéases sont présentes dans l'extrait. Ces protéases peuvent aussi causer une

protéolyse générale. La même observation est faite par Yousif *et coll.* (1996) sur *Solanum dubium* et Chazarra *et coll.*, (2007) sur *Cynara scolymus*.

2.2 –Effet de la température

La température est un facteur très important en fromagerie surtout dans l'étape de coagulation. La maîtrise de la technologie fromagère passe par la connaissance de la température d'emprésurage qui doit correspondre à la température optimale des protéases utilisées.

Deux études ont été réalisées: la première en utilisant l'azocaséine comme substrat, la deuxième utilisant du lait.

- L'azocaséine a été préalablement équilibrée à une température donnée (20, 30, 40, 50, 60 et 70 °C). Son hydrolyse par l'extrait brut est ensuite suivie à cette température.

La figure 16 présente la température optimale de l'extrait de *B. aegyptiaca* qui se situe autour de 50 °C. Cette activité décroît rapidement au-delà de 55 °C. Des profils de température similaires ont été trouvés par Lo Piero *et coll.*, (2002) et Asakura *et coll.*, (1997), avec les protéases de *Lactuca sativa* L. et *Oriza sativa*, respectivement. Ils ont montré que la température optimale des protéases de ces deux plantes se situent à 50 °C. Ce comportement des protéases végétales a également été rapporté par Raposo et Domingos (2008) sur les protéases de *Centaurea calcitrapa*.

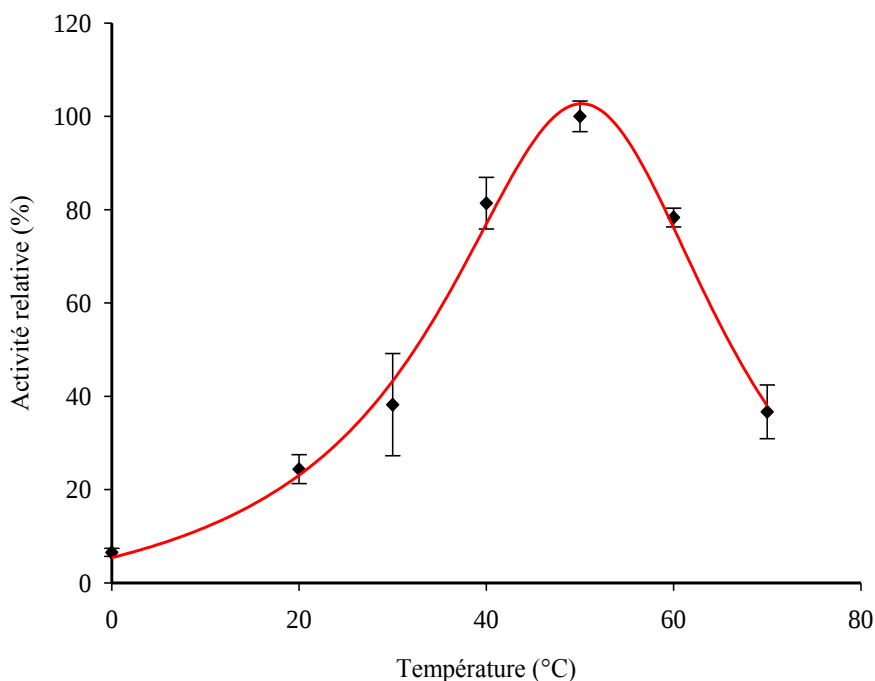


Figure 16: Température optimale de l'extrait brut

Calcul de l'énergie d'activation

En prenant les valeurs de vitesse de la première partie de courbe, correspondant à l'activation de la réaction d'hydrolyse par la température (entre 0 et 50 °C), et en utilisant la loi d'Arrhénius:

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

L'énergie d'activation de cette réaction a pu être calculée et est de l'ordre de 16,5 kcal.mol⁻¹

- Lorsque le lait est utilisé comme substrat, on remarque que plus la température du lait augmente, plus sa coagulation est rapide (figure 17).

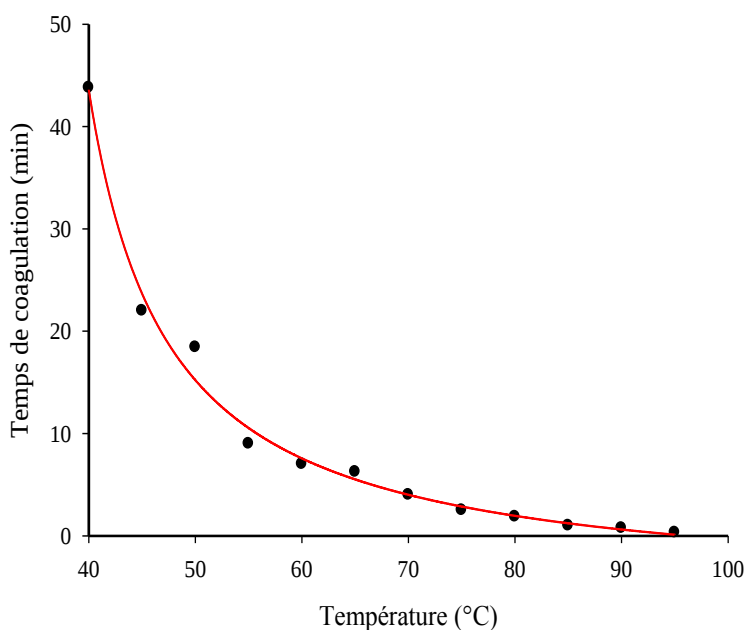


Figure 17: Influence de la température du lait sur le temps de coagulation

Avec la chymosine, la coagulation du lait s'arrête quand la température dépasse 60 °C. L'étape limitante de la coagulation est l'hydrolyse de la caséine, la deuxième étape d'agrégation des micelles est d'autant plus rapide que la température est élevée. L'extrait brut n'est certainement pas très stable longtemps à haute température mais son action est suffisamment rapide pour permettre l'hydrolyse de la caséine κ et ainsi initier la coagulation du lait. A forte température la coagulation est très rapide inférieure à 1 minute, cela pourrait être intéressant pour éviter la contamination du lait lors de la fabrication du fromage sachant que l'étape de coagulation est l'étape où il y a un risque important de contamination microbienne.

2.3-Détermination de la stabilité thermique

Les enzymes en général sont très sensibles à la température. La perte de l'activité enzymatique est fonction de la température de stockage et du temps. Les enzymes d'origine végétale, bien que thermophiles, peuvent perdre leur activité dans le temps. Cette variation de l'activité enzymatique en fonction de la température et du temps pourrait être un facteur limitant pour une application en technologie alimentaire (Nouani *et coll.*, 2009).

La figure 18 met en évidence la stabilité des enzymes extraites de *B. aegyptiaca* en fonction de la température et du temps.

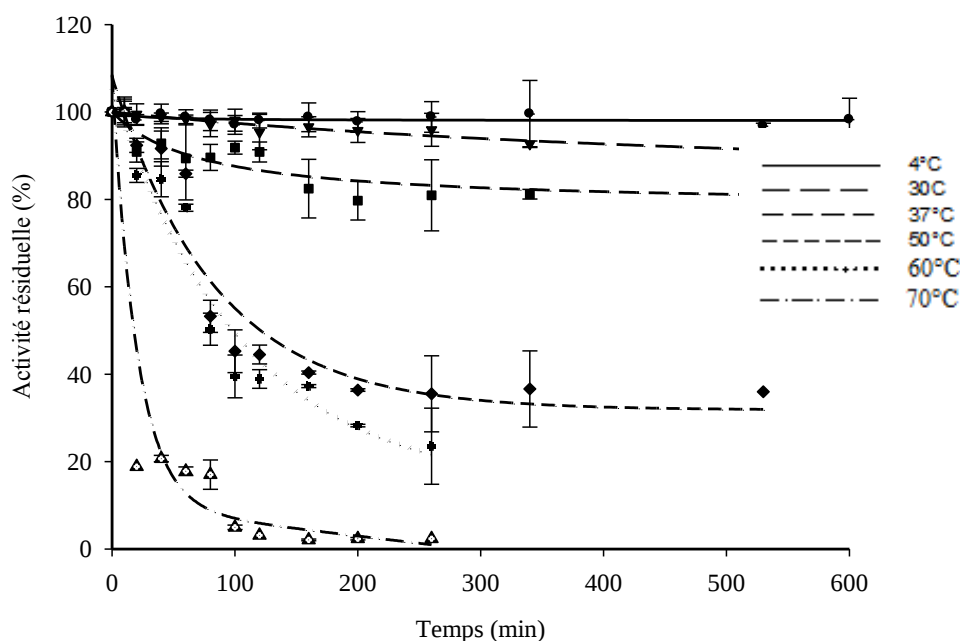


Figure 18: Courbe de stabilité thermique de l'extrait brut

L'extrait est stable au-delà de 10h entre 4 et 37 °C avec des activités résiduelles de 98, 91 et 82 % respectivement pour 4, 30 et 37 °C. Au-delà de cette température, l'activité diminue de moitié en 2h à 50 °C et jusqu'à n'être que de 36 % après 8h d'incubation. 77 % d'activités sont perdues après 4h d'incubation à 60 °C; alors qu'à 70 °C, 2 % d'activités sont conservées. On peut aussi relever que la température dénaturante de cet extrait enzymatique se trouve au-delà de 60 °C. L'extrait enzymatique de *Cynara scolymus* est inactivé au-delà de 60 °C (Sidrach *et coll.*, 2005). Les travaux de Raposo et Domingos (2008) montrent que l'extrait de *Centaurea calcitrapa*, perd toute son activité après 6h d'incubation à 70 °C.

Ces résultats, combinés à ceux obtenus pour la coagulation du lait, montrent bien qu'il est tout à fait possible d'utiliser l'extrait coagulant pour la fabrication des fromages dans des conditions sanitaires correctes et qu'un traitement thermique prolongé pourrait permettre de contrôler le degré d'hydrolyse des caséines et limiter l'amertume.

2.4- Effet du pH

Les enzymes des plantes sont connues pour être actives soit en milieu acide (Chazarra et Coll., 2007), soit en milieu basique (Raposo et Domingos, 2008). L'effet du pH sur l'activité protéasique a été étudié en utilisant l'hémoglobine bovine (Figure 19a) et l'azocaséine (Figure 19b) comme substrat. L'activité maximale de l'extrait brut des fruits de *B. aegyptiaca* a été atteinte à pH 5,5 et à pH 7,5 - 8 avec ces deux substrats différents.

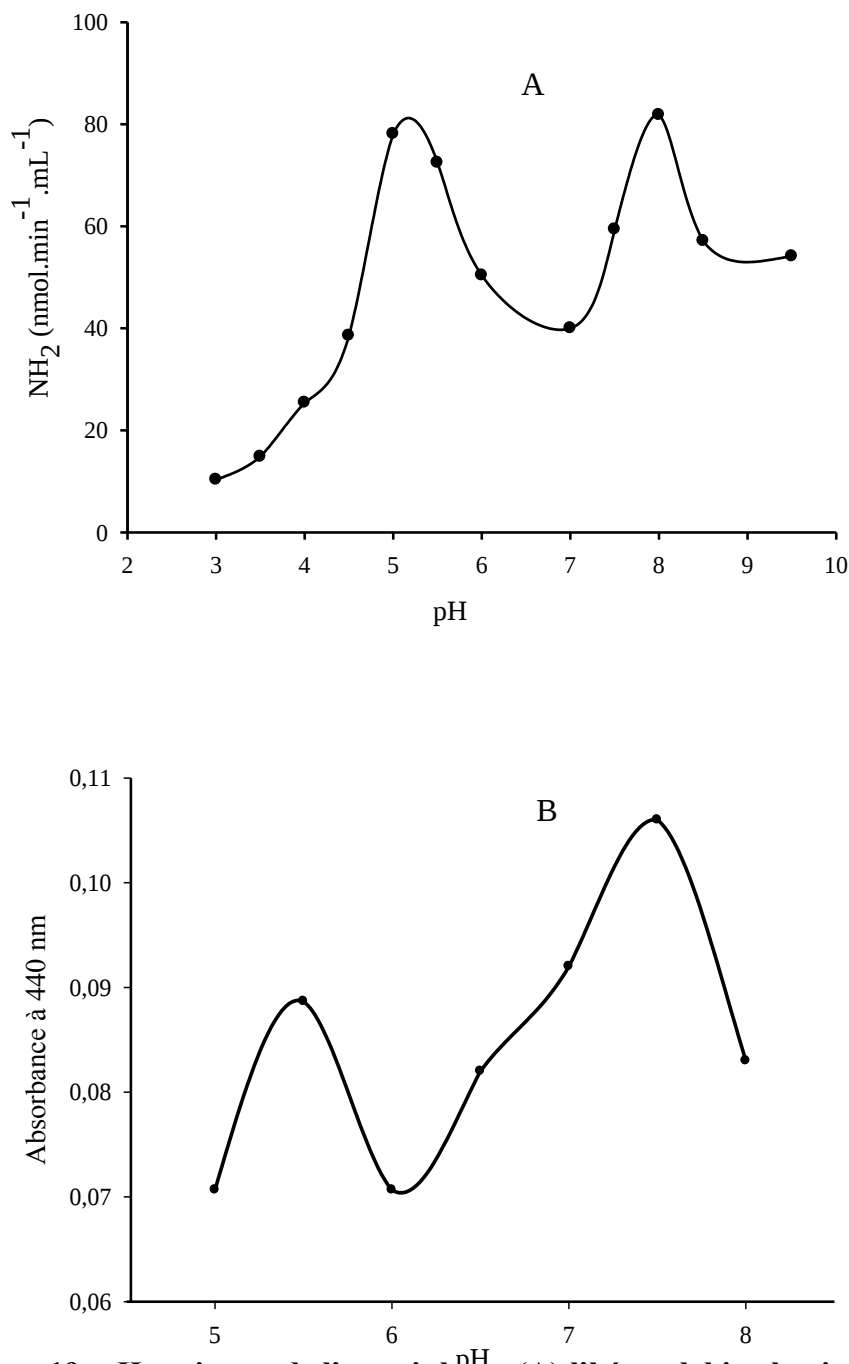


Figure 19: pH optimum de l'extrait brut. (A) l'hémoglobine bovine, (B) azocaséine

Les enzymes végétales d'*Albizia julibrissin* (Egito et coll., 2007), de *Centaurea calcitrapa* (Raposo et Domingos, 2008) et de *Cynara scolymus* (Sidrach et coll., 2005; Chazarra et coll., 2007;

Oliveira *et coll.*, 2010), sont de type aspartique et présentent des valeurs de pH optimum comprises entre 5 et 5,5. Des publications récentes ont montré également que d'autres extraits d'enzymes d'origine végétales atteignent leur activité optimale à pH basique. C'est ainsi que les enzymes de *Cucumis trigonus* Roxburghi (Asif-Ullah *et coll.*, 2006), de *Cucumis melo* L. var. Prince (Yamagata *et coll.*, 1989), d'*Euphorbia milii* (Yadav et Jagannadhan, 2006), de *Trichosantus kirrilowi* (Uchikoba *et coll.*, 1990) et de *Solanum dubium* (Mohamed Ahmed *et coll.*, 2009_a), qui appartiennent à la famille des protéases à sérine (dubiumin et cucumisin) présentent une activité optimale aux valeurs de pH supérieures à 7.

Les deux valeurs optimales du pH pour l'activité protéolytique obtenu dans cette présente étude suggèrent la présence simultanée de deux protéases distinctes: l'une active en milieu acide et l'autre active en milieu basique.

2.5-Effet des inhibiteurs sur les enzymes des extraits

Afin de confirmer la présence de deux protéases de classes différentes, l'extrait de *B. aegyptiaca* a été mis en présence d'inhibiteurs de protéases à acide aspartique, à sérine, à cystéine et des métalloprotéases puis testé sur l'azocaséine. Les études d'inhibition permettent de déterminer la nature de l'enzyme et la présence des sites actifs éventuels (Sedmak et Grossberg, 1977).

Tableau 13: Effet des inhibiteurs sur l'extrait brut

Inhibiteurs	Spécificité	Concentration	Pourcentage d'inhibition (%)
Pepstatine A	Protéase à Aspartate	10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	86
PMSF	Protéase à Sérine	1 mmol.L^{-1}	12
Aprotinine	Protéase à Sérine	3,8 U.mL^{-1}	32
O-Phenantroline	Métalloprotéase	10 mmol.L^{-1}	7
Cystatine	Protéase à Cystéine	50 mmol.L^{-1}	8
Iodoacétamide	Protéase à Cystéine	50 mmol.L^{-1}	5

L'extrait brut est inhibé fortement (86 %) par la pepstatine A, inhibiteur des protéases à acide aspartique; mais il est également inhibé par des inhibiteurs de protéases à sérine (PMSF et Aprotinine) (tableau 13). Ces résultats suggèrent la présence simultanée dans l'extrait des deux types de protéases.

Les inhibiteurs tels que l'O-Phenantroline, la cystatine et l'iodoacétamide ont donné une activité relative supérieure à 90 %. Ce résultat permet d'exclure la présence des métalloprotéases et des protéases à cystéine dans l'extrait de *B. aegyptiaca* et donc indique l'absence d'un groupement thiol dans le site d'action de cet extrait enzymatique (Raposo et Domingos, 2008).

3-PURIFICATION ET CARACTERISATION D'UNE PROTEASE ACIDE

3-1 Purification par chromatographie d'échange d'ions

Différentes chromatographies ont été réalisées: tout d'abord, l'extrait brut au du NaCl a été chromatographié par gel filtration sur Sephadex G25 superfine en tampon citrate de sodium 50 mM, pH 3 afin de séparer les protéines des petites molécules dont les polyphénols, les sucres réducteurs qui perturberaient les dosages de protéines et d'activité. Ensuite, une chromatographie d'échanges d'ions sur DEAE-Sephadex a été réalisée en tampon phosphate (50 mmol.L⁻¹), pH 6. Ce procédé n'a pas permis de séparer les différents constituants de l'extrait et de purifier la protéase coagulante.

Sur la base des travaux effectués à partir des fleurs et des feuilles de l'artichaut ou *Cynara cardunculus* (Sidrach et Coll., 2005), des extractions ont été réalisées à pH acide dans du tampon citrate de sodium (50 mmol.L⁻¹), pH 3 avec ou sans précipitation au sulfate d'ammonium. Les différents extraits préparés ont été chromatographiés sur colonne Q-Sepharose en tampon phosphate 50 mmol.L⁻¹, pH 6. Bien que la séparation n'ait pas été très concluante, une fraction contenant une activité coagulante a été éluée avec environ (0,20 mol.L⁻¹) de NaCl (figure 20, Pic2).

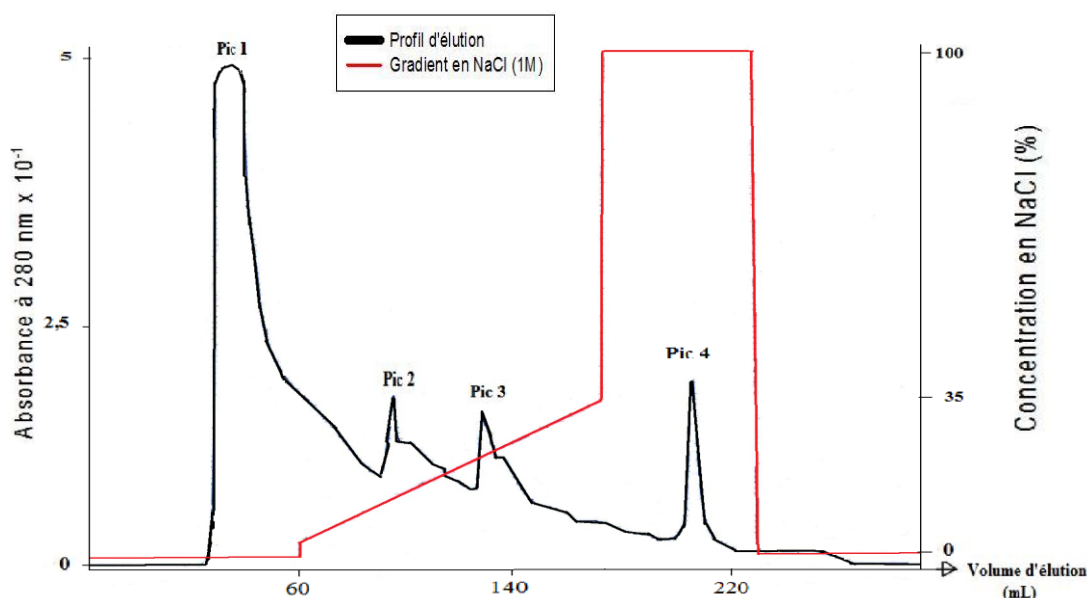


Figure 20: Chromatogramme de la purification à pH acide sur Q-Sepharose pH 6

La présence des bandes de 38 et 43 kDa dans cette fraction a été révélée par SDS-PAGE (figure 21).

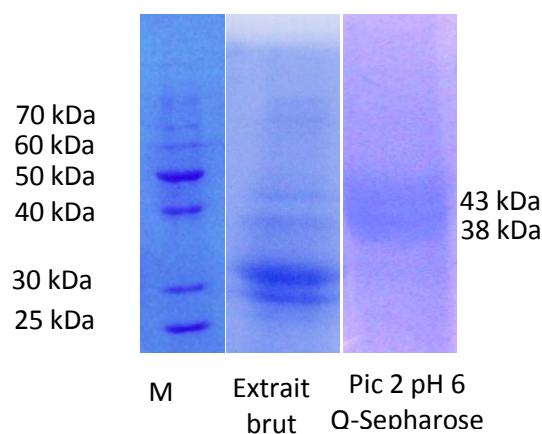


Figure 21: Electrophorèse du Pic 2 du chromatogramme (Q-Sepharose pH 6)

La protéase semble donc se trouver dans le pic 2. En effet l'activité coagulante est présente uniquement dans cette fraction (pH 6). Aucune activité n'a été décelée dans les autres pics.

Des essais ont également été réalisés sur des résines échangeuses de cations de type SP-Sepharose en tampon citrate de sodium (50 mmol.L^{-1}), pH 3 puis en tampon phosphate 50 (mmol.L^{-1}), pH 6. A chaque fois, l'élution est réalisée avec un gradient de NaCl. Les chromatogrammes mal résolus n'ont pas été présentés. Des électrophorèses ont été réalisées pour comparer les différentes fractions issues de cette purification en milieu acide (figure 22).

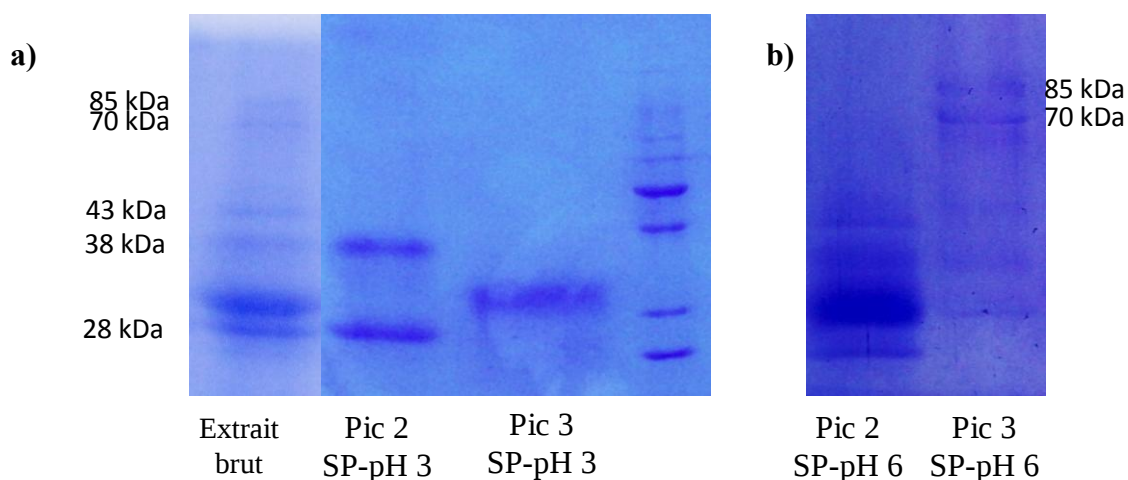


Figure 22: Electrophorèse de la purification sur SP-sepharose

Les résultats obtenus au cours de cette purification sur colonne SP-sepharose à pH 3 montrent deux pics dont un seul possède l'activité coagulante, le pic 2 qui comporte les bandes de 28 et 38 kDa. Par contre, le Pic 3 présente une bande de 32 kDa qui ne possède pas d'activité coagulante (figure 22a).

Lorsque la purification se déroule à pH 6, une activité coagulante est présente dans les deux pics. Cependant le pic 2 présentant les bandes de 28, 32, 38 et 43 kDa possède une activité

coagulante meilleure que le Pic 3 qui regroupe les bandes de 70 et 85 kDa mais également les bandes de 32, 38 et 43 en proportion moins importante (figure 22b).

La purification des protéases de *B. aegyptiaca* en milieu acide donne des activités coagulantes très faibles; ce qui pourrait être préjudiciable pour son utilisation en fromagerie. La force d'un extrait coagulant est un facteur qui influence le rendement fromager, d'où l'intérêt de poursuivre la purification de cet extrait en milieu basique.

3-2 -Purification par chromatographie d'affinité

Un gel de concanavoline A Sepharose 4B a été utilisé pour poursuivre la purification des protéases contenues dans l'extrait. La majorité des protéases acides intervenant dans la coagulation du lait sont des glycoprotéines.

Un échantillon issu de la chromatographie d'échange d'anions sur Q Sepharose à pH 6 et possédant les bandes de 38 et 43 kDa (Pic 2 – figure 21), a été purifié par chromatographie d'affinité. C'est une méthode ultime pour la purification des protéases.

L'analyse sur gel d'électrophorèse du pic élué avec 30 mmol.L⁻¹ de méthyl α -D mannopyrannoside montre une bande de 38 kDa correspondant probablement à une protéase acide (figure 23).

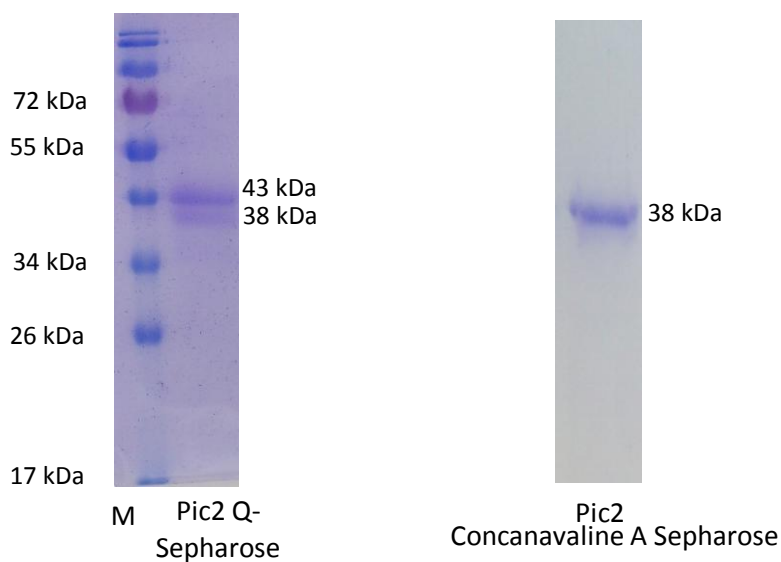


Figure 23: Electrophorèse de la purification sur gel de Concanavoline A Sepharose

Cependant l'activité coagulante a été perdue comme a reconnu Salvador *et coll.* (2006) sur les protéases aspartiques de *Centaurea calcitrapa* après élution en chromatographie d'affinité. Ces

résultats suggèrent la présence dans l'extrait purifié des protéases possédant une partie glycosylée à chaînes mannoses N-terminales (Guevara *et coll.*, 2001)

3-3 Détermination du pH optimum

La recherche du pH optimum de la protéase purifiée après extraction à pH acide (3.0) a été réalisée après chromatographie d'échange d'anions à pH 6 (Pic 2 - figure 21). Les conditions de réaction sont fixées en utilisant l'azocaséine comme substrat à 40 °C pendant 60 min. les variations d'absorbance ont permis de déterminer la valeur du pH optimum en milieu acide (figure 24).

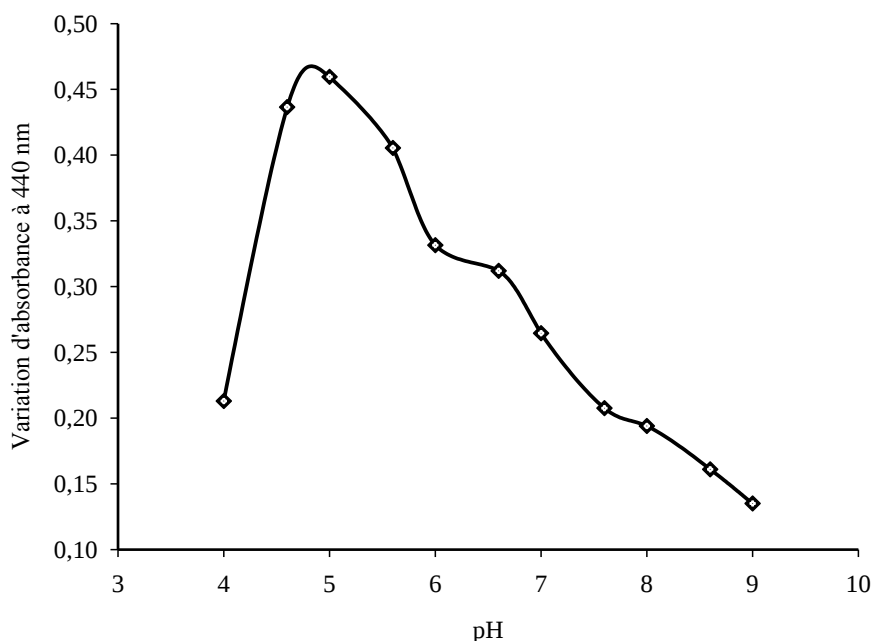


Figure 24: Etude du pH optimal de la protéase avec l'azocaséine comme substrat.

Cette étude montre que le pH optimal de l'enzyme est proche de 5 témoignant le caractère acide de notre enzyme. Des résultats similaires ont été trouvés à partir des enzymes végétales du *Cynara scolymus* (Sidrach *et coll.*, 2005; Chazarra *et coll.*, 2007; Oliveira *et coll.*, 2010), d'*Albizia julibrissin* (Egito *et coll.*, 2007); et de *Centaurea calcitrapa* (Raposo et Domingos, 2008) qui sont des protéases possédant un pH optimal acide entre 5 et 5,5.

4-PURIFICATION ET CARACTERISATION D'UNE PROTEASE A SERINE

4 1- Chromatographie d'échange d'ions

L'extraction des protéases végétales est généralement réalisée à pH acide. Selon Raposo et Domingos (2008), bien que le milieu acide permette d'éliminer les impuretés, il peut aussi provoquer l'autoprotéolyse; elle peut être évitée au cours de la purification en réalisant l'extraction en milieu basique. Ainsi, la préparation de l'extrait brut et sa purification ont été réalisées à pH 7,6 et pH 8,1.

-Extraction-purification à pH 7,6

Cette extraction a été réalisée en macérant les graines sans épicarpe directement dans du tampon Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ à pH 8,1 contenant 1 mmol.L⁻¹ d'EDTA et 3 mmol.L⁻¹ de β -mercaptoéthanol selon la méthode de Raposo et Domingos (2008). Cependant, le pH de la solution n'ayant pas été ajusté pendant la macération, l'extrait obtenu a présenté un pH de 7,6. Il a été concentré et clarifié par diafiltration puis chromatographié sur colonne Q-Sepharose.

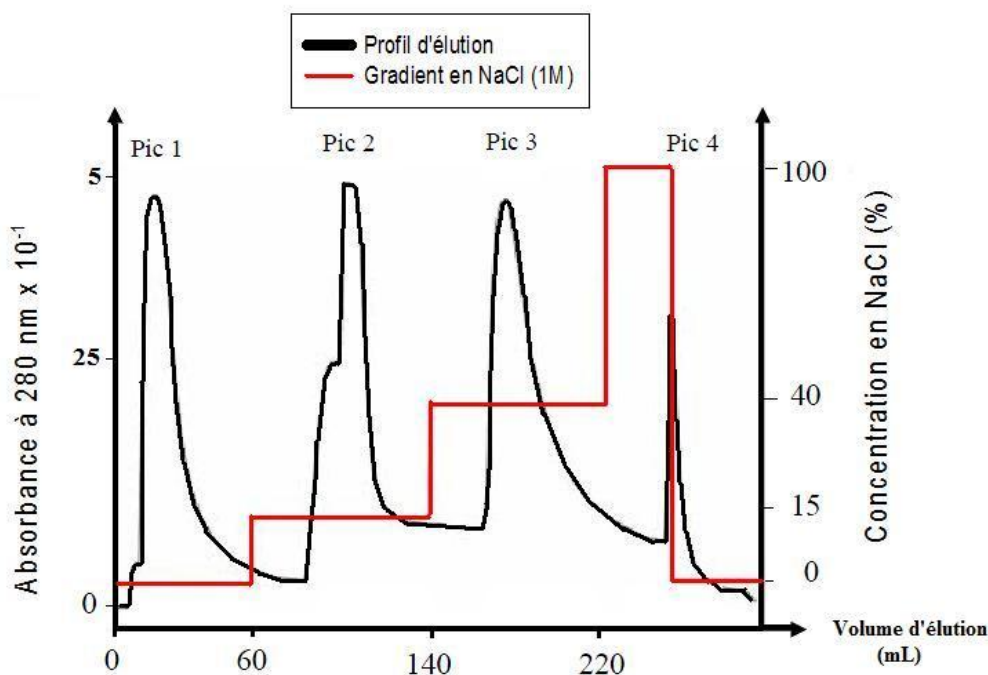


Figure 25: Chromatogramme obtenu sur Q-Sepharose

Quatre pics ont été recueillis puis analysés (figure 25). Le Pic 1 représente la fraction non retenue. Le Pic2 est élué avec du NaCl (150 mmol.L⁻¹) dans le tampon d'élution et les Pics 3 et 4 élués respectivement avec 400 mmol.L⁻¹ et 1 mol.L⁻¹ de NaCl. Les différentes fractions ont été

analysées et les résultats sont reportés dans le tableau 14. Les fractions 1 et 4, ne coagulant pas le lait, n'ont pas été retenues.

Nous avons déterminé une activité enzymatique de l'enzyme par dosage spectrophotométrique avec l'azocaséine comme substrat. Cette Activité Enzymatique, AE, a été définie à partir de la relation suivante:

$$\text{Activité enzymatique } (\Delta A_{440 \text{ nm}}/\text{min}/\text{mg}) = \frac{\text{Variation d'absorbance}}{\text{Temps d'incubation} \times \text{Quantité de Protéines}}$$

Tableau 14: Récapitulatif extraction-purification à pH 7,6

	Extrait brut	Concentrât	Pic2	Pic3
Unité Coagulante (U.mL ⁻¹)	0,51	0,92	0,18	0,33
Activité Spécifique (U.mg ⁻¹)	0,58	0,30	0,33	0,30
Activité Enzymatique *10 ⁻³ (ΔA.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	41	43	ND	24
Unité totale (U)	49	15,6	1	1,7

ND: Non Déterminé

Le tableau 14 montre que l'unité coagulante est deux fois plus élevée pour le Pic 3 que pour le Pic 2 avec des valeurs respectives de 0,33 U.mL⁻¹ et 0,18 U.mL⁻¹ à pH 7,6. Par ailleurs les deux pics semblent avoir une activité spécifique semblable soit 0,33 U.mg⁻¹ pour le Pic 2 et 0,30 U.mg⁻¹ pour le Pic 3. Ce dernier pic possède une activité enzymatique de 24.10⁻³ ΔA.min⁻¹.mg⁻¹ soit pratiquement la moitié de l'extrait brut.

Des électrophorèses ont été réalisées pour identifier les protéines contenues dans les différents pics (figure 26).

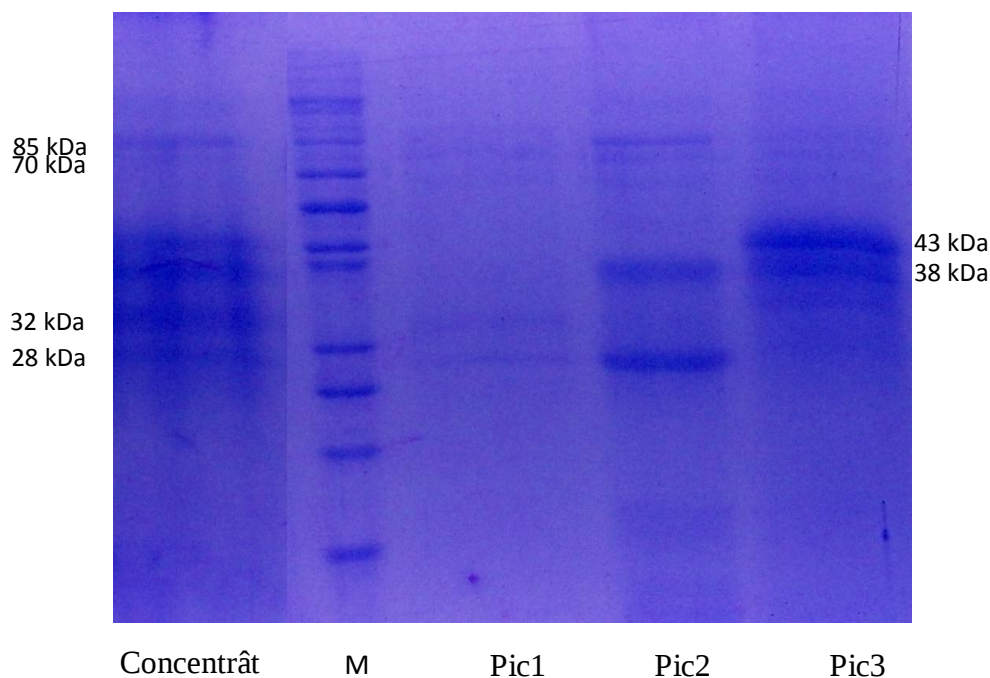


Figure 26: Electrophorèse de la purification à pH 7,6

L'électrophorèse des produits de cette extraction a permis de distinguer les différentes protéines. En effet, dans le Pic 2, quatre bandes protéiques sont bien distinctes notamment les bandes de 28 et 85 kDa qui sont très prononcées et les bandes de 38 et 70 kDa qui sont moins prononcées. Dans le Pic 3, deux bandes de 38 et 43 kDa sont présentes. L'activité coagulante est meilleure que celle du Pic 2. L'absence de bandes protéiques nettes dans le Pic 1 justifie effectivement l'absence d'activité dans le pic non retenu. A priori, l'extraction réalisée en milieu basique permet une très bonne séparation des protéines mais réduit considérablement l'activité coagulante. Ce qui suggère de tester une extraction avec ajustement de pH pour rechercher l'activité.

-Extraction-purification à pH 8,1

Le tampon Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 8,1 a été utilisé comme milieu d'extraction et le pH a été maintenu à 8,1 pendant toute l'extraction. Après chromatographie sur colonne Q-Sepharose, 4 pics ont été ainsi obtenus grâce à une élution par plateaux de concentrations en NaCl comme précédemment (figure 27).

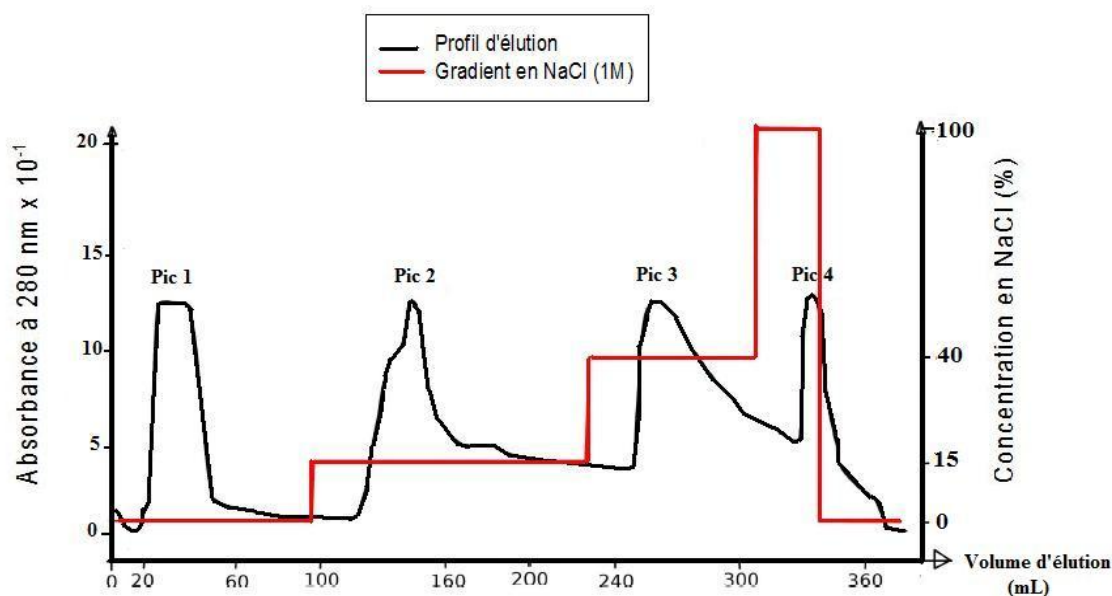


Figure 27: Chromatogramme de la purification à pH 8,1 sur Q-Sepharose

Les Pics 2 et 3 sont respectivement élués avec 150 et 400 mmol.L⁻¹, et le Pic 4 élué avec 1 mol.L⁻¹ de NaCl contenu dans le tampon Tris-HCl pH 8,1. Les principaux résultats obtenus sont consignés dans le tableau 15.

Tableau 15: Purification à pH 8,1

	Extrait brut	Concentrât	Pic1	Pic2	Pic3
Unité Coagulante (U.mL ⁻¹)	0,25	0,41	—	0,20	—
Activité Spécifique (U.mg ⁻¹)	0,46	0,21	—	0,47	—
Activité Enzymatique *10 ⁻³ (ΔA.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	22	27	7,4	44	7,5
Unité totale (U)	25	4,1	—	1	—

Le tableau 15 montre qu'après passage sur colonne Q-Sepharose, l'activité coagulante est présente uniquement dans le Pic 2. On remarque aussi que l'activité coagulante de l'extrait brut et de l'extrait concentré à pH 8,1 sont plus faibles (0,25 U.mL⁻¹ et 0,41 U.mL⁻¹) que lorsque l'extraction était réalisée à pH 7,6 (0,51 U.mL⁻¹ et 0,92 U.mL⁻¹). En effet, l'activité coagulante sans

ajustement de pH (pH 7,6) est pratiquement le double de celui obtenu à pH 8,1. L'activité enzymatique du Pic 2 à pH 8,1 est deux fois supérieure à celle du Pic 3 obtenu à pH 7,6 avec des valeurs respectives de $44.10^{-3} \Delta A.min^{-1}.mg^{-1}$ et de $24.10^{-3} \Delta A.min^{-1}.mg^{-1}$. On note aussi que l'unité totale de l'extrait brut à pH 7,6 est le double de celle obtenue à pH 8,1 soit respectivement 49 U et 25 U. Par contre le Pic 2 possède la même activité totale aussi bien pour l'extraction faite à pH 8,1 ou à pH 7,6 avec une valeur de 1 U. Il n'a pas été possible de déterminer l'activité totale du Pic 3 à pH 8,1 car aucune activité coagulante n'a été notée; cependant, à pH 7,6 le Pic 3 a donné une activité totale de 1,7 U. En parallèle, de nouvelles électrophorèses ont été réalisées pour vérifier le comportement des différentes bandes protéiques contenues dans les extraits bruts et purifiés (figure 28).

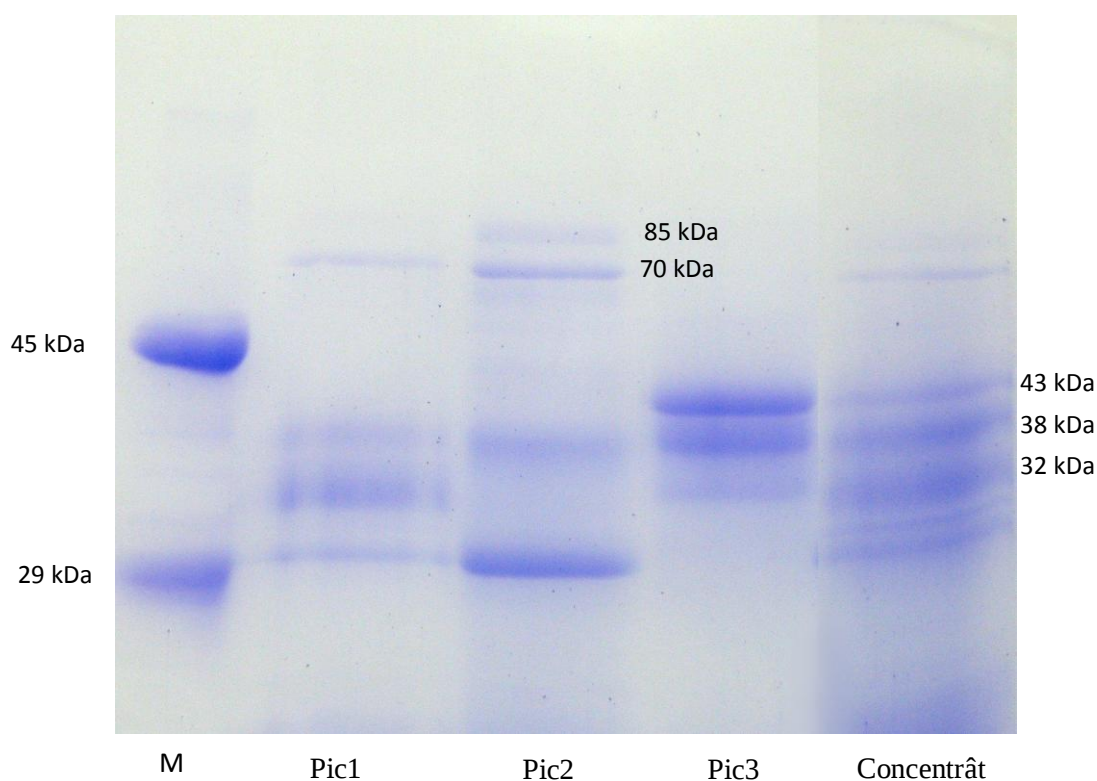


Figure 28: Electrophorèse de la purification à pH 8,1

La figure 28 montre que la disposition des bandes est la même que dans l'expérience précédente, avec les mêmes masses moléculaires. L'activité coagulante est toujours présente dans le Pic 2 contenant les bandes de 28, 70 et 85 kDa ainsi que la bande de 38 kDa en proportion moins importante. Cependant, elle est absente dans le Pic 3 contenant les bandes de 38 et 43 kDa. Il semble donc que la protéase présente dans le Pic 3 est inactivée par un pH basique. Ce résultat corrobore la présence d'une protéase à acide aspartique.

4.2 Purification par chromatographie d'exclusion

La fraction correspondant au Pic 2 résultant de la chromatographie par échange d'ions a été déposée sur une colonne Superdex 75.

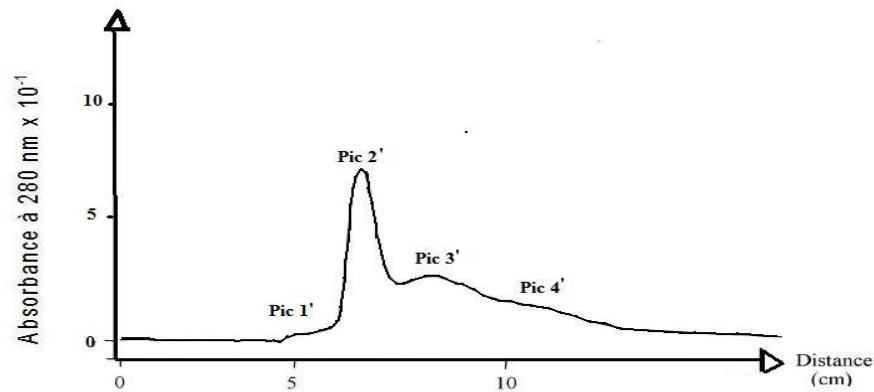


Figure 29: Chromatogramme de la purification à pH 8,1 sur Superdex 75

Le chromatogramme obtenu (figure 29) a été fractionné en 4 parties. L'activité coagulante est détectée au niveau de la fraction 1', ce qui indique que l'enzyme a conservé son activité en milieu basique. Cette enzyme aurait une masse moléculaire élevée pouvant être égale ou supérieure à 70 kDa (figures 29 et 30).

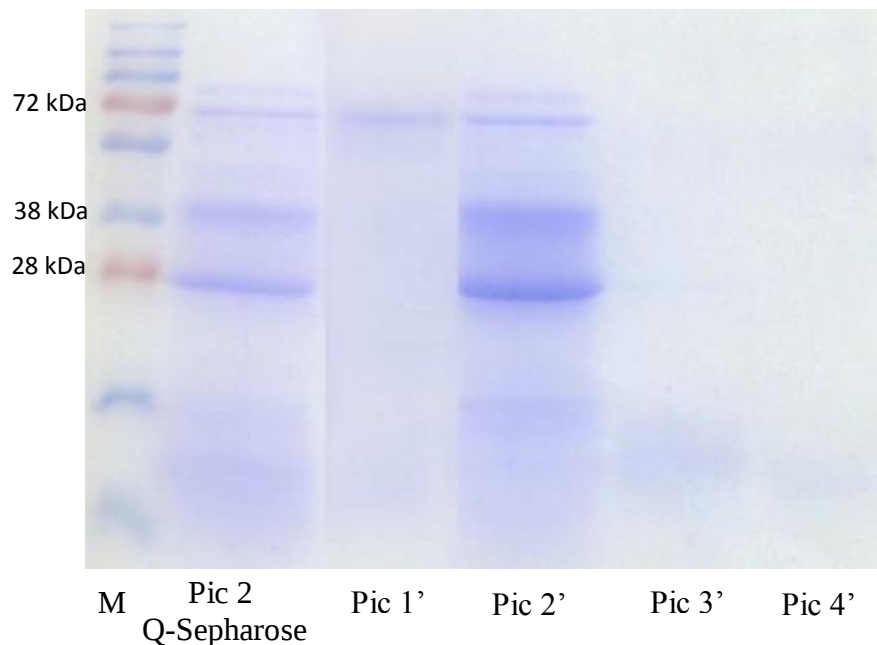


Figure 30: Electrophorèse de la purification à pH 8,1 sur Superdex 75

4.3 Détermination du pH optimum de la protéase

Dans un premier temps, la détermination du pH optimum a été effectuée sur l'extrait brut à pH 8,1 en utilisant de l'azocaséine comme substrat. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 31. Deux pH optimum sont observés. Néanmoins, l'activité mesurée à pH 7,5 est supérieure à celle observée à pH 5,5.

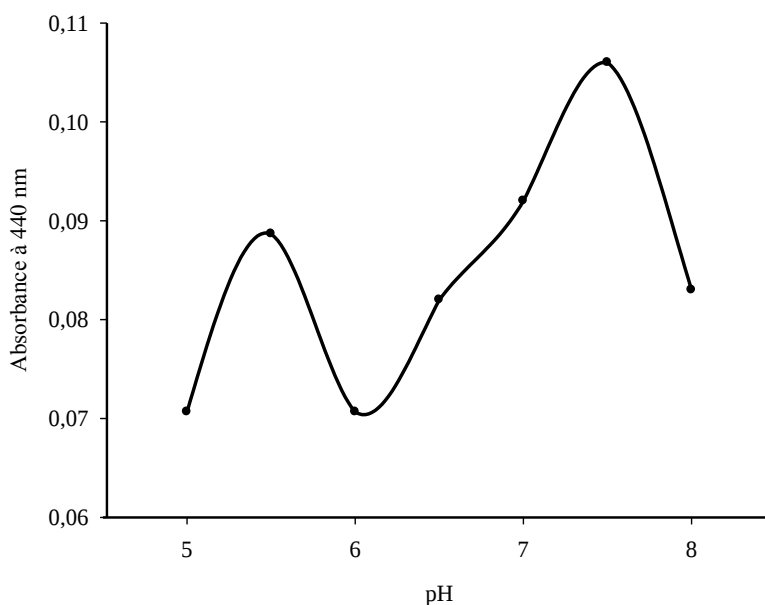


Figure 31: pH optimum de l'extrait brut (pH 8,1)

Par ailleurs, le pH optimum du Pic 2 obtenu précédemment de la chromatographie d'échanges d'ions sur colonne Q-Sepharose a été déterminé (figure 32). L'activité protéolytique est maximale pour un pH d'environ 7,0.

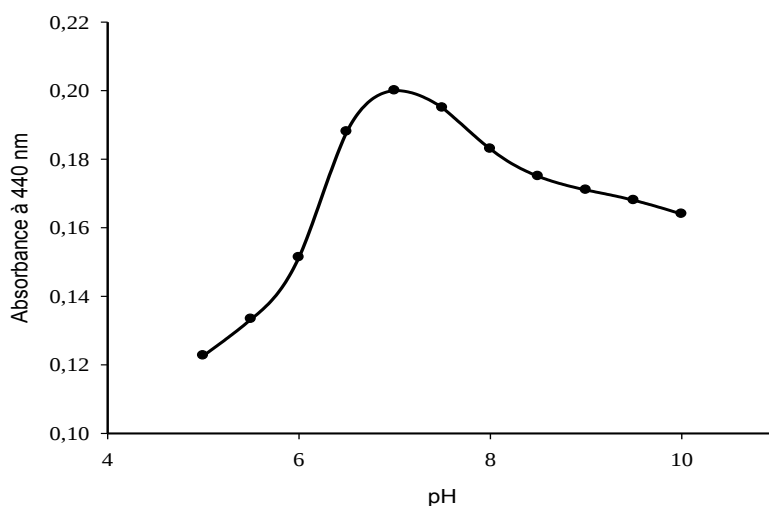


Figure 32: pH optimum du Pic2 (Q-Sepharose)

Une synthèse des résultats obtenus au cours des différentes purifications suggère la présence de deux protéases pouvant avoir des mécanismes d'action différents. En effet, on peut remarquer qu'à pH acide, la séparation chromatographique n'est pas bonne mais l'activité coagulante est tout de même présente. A pH alcalin, deux comportements différents sont observés. Lorsque la purification est menée à pH 7,6 une activité coagulante est détectée dans les Pics 2 et 3. Lorsqu'elle est conduite à pH 8,1 l'activité coagulante est présente uniquement dans le Pic 2 qui possède les bandes de 28, 70 et 85 kDa. Ainsi, l'extrait des fruits de *B. aegyptiaca* possède des protéases qui sont actives à pH acide mais totalement inhibée à pH basique, ce qui suggère la présence de 2 protéases dont l'activité dépend du pH du milieu.

5- ACTIVITES ENZYMATIQUES DES DEUX PROTEASES

5-1 Révélation de l'activité protéolytique des fractions

L'activité protéolytique des extraits est généralement confirmée par la digestion de la gélatine incorporée dans des gels de polyacrylamide. Les taches blanches correspondent aux trous laissés après la digestion de la gélatine par les protéases et permettent d'identifier l'activité protéolytique d'une bande obtenue après électrophorèse (Tomar *et coll.*, 2008).

Deux gels de polyacrylamide à la gélatine ont été réalisés en présence de SDS. Des échantillons d'extrait brut et purifiés ont été déposés. Après migration et élimination du SDS, un des gels a été incubé dans du tampon phosphate à 100 mmol.L⁻¹ à pH 5, et l'autre dans du tampon di-sodium de citrate à pH 7 pendant 2h à 37 °C. Cette expérience a été réalisée afin de détecter la présence d'enzyme dans ces extraits et leur activité en fonction du pH. Dans les conditions favorables où les protéases sont renaturées après élimination du SDS, elles digèrent la gélatine.

A pH 5 (figure 33), pour l'extrait brut obtenu à pH 8,1, les principales bandes de digestion ont été observées à la partie supérieure du gel, correspondant probablement à 70 et 85 kDa; alors que deux bandes plus fines à la médiane du gel correspondent respectivement à 28 et 38 kDa. La digestion a été également très active pour les Pics 2 et 3 obtenus après chromatographie sur échanges d'ions à pH 8,1; les bandes qui se sont manifestées sur le gel de gélatine correspondent à 70 et 85 kDa pour le Pic 2 et 43 et 38 kDa pour le Pic 3.

A pH 7, la digestion du gel de gélatine a été observée principalement pour les bandes de 70 et 85 kDa (figure 33). Ces résultats suggèrent la présence dans l'extrait de *B. aegyptiaca* de deux protéases dont les sites actifs pourraient être acides ou basiques.

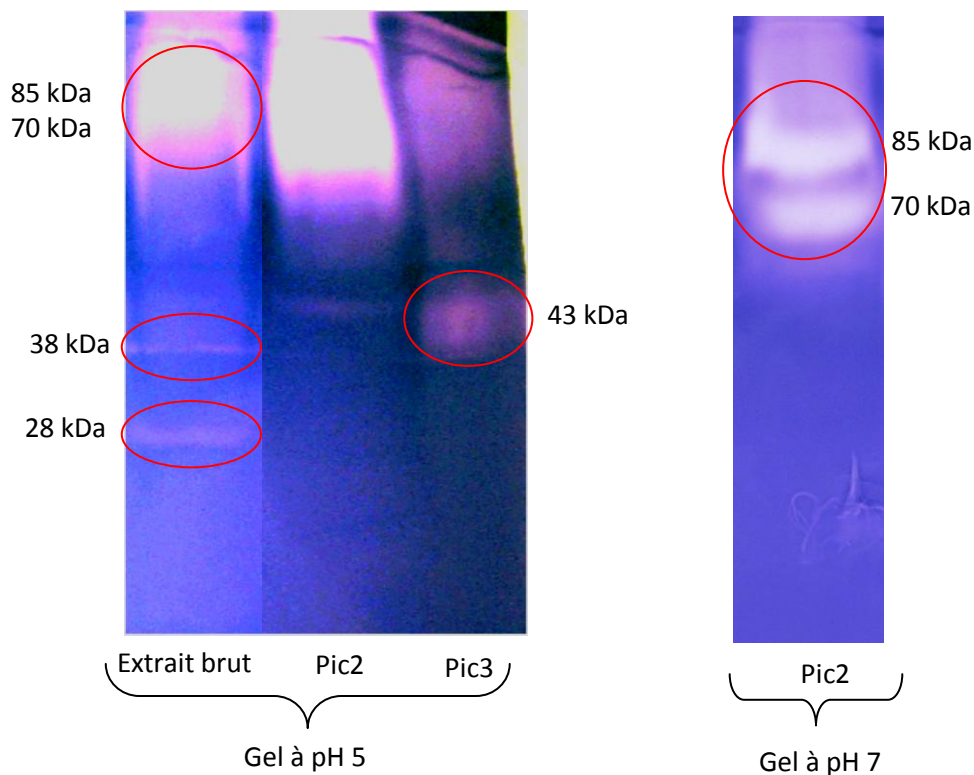


Figure 33: Gel à la gélatine à pH 5 et à pH 7

5-2 Activité sur les caséines

L'activité protéasique des extraits bruts et des fractions purifiées a été étudiée sur la caséine brute et sur les caséines purifiées à pH 6,2. Le rapport enzyme / substrat utilisé est de 1/100. Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse en présence de SDS. La figure 34 montre la digestion des caséines totales (caséine α et β) au bout d'1 h, 2h, 4h et 24 h à 30 °C par les extraits bruts, concentrés et purifiés à pH 8,1 et par la chymosine.

Lorsqu'un substituant potentiel à la présure est étudié, il est important d'évaluer sa capacité à dégrader les caséines à cause de leur effet sur le rendement, la consistance et la saveur finale du fromage (Fox, 1989). L'hydrolyse des caséines par les extraits bruts et purifiés de l'extrait des fruits de *B. aegyptiaca* et par la chymosine laisse apparaître des bandes de 1h à 4h d'incubation pour les caséines totales (figure 34a). Cependant après 24h d'incubation (figure 34b), les caséines totales sont complètement dégradées par l'extrait brut et par la chymosine. Ces résultats montrent que la caséine α et la caséine β sont susceptibles d'être hydrolysés par les enzymes de *B. aegyptiaca*. En effet, cette hydrolyse a montré que les enzymes de *B. aegyptiaca* ont donné de nouvelles bandes qui correspondent certainement aux fragments de peptides apparus au cours de cette réaction. Des études similaires ont été effectuées sur les enzymes coagulants de *Solanum dubium* (Mohamed Ahmed *et coll.*, 2010); *Albizia julibrissin* (Otani *et coll.*, 1991); *Cynara cardunculus* (Silva et

Malcata, 1999; Souza et Malcata, 1998; Souza et Malcata, 2002). Ces auteurs ont montré que les enzymes de ces plantes sont responsables de l'hydrolyse primaire des caséines totales en fragments de peptides. La chymosine a été utilisée comme enzyme témoin à cause de sa nature protéolytique limitée comme signalé par Mullin et Wolfe (1973).

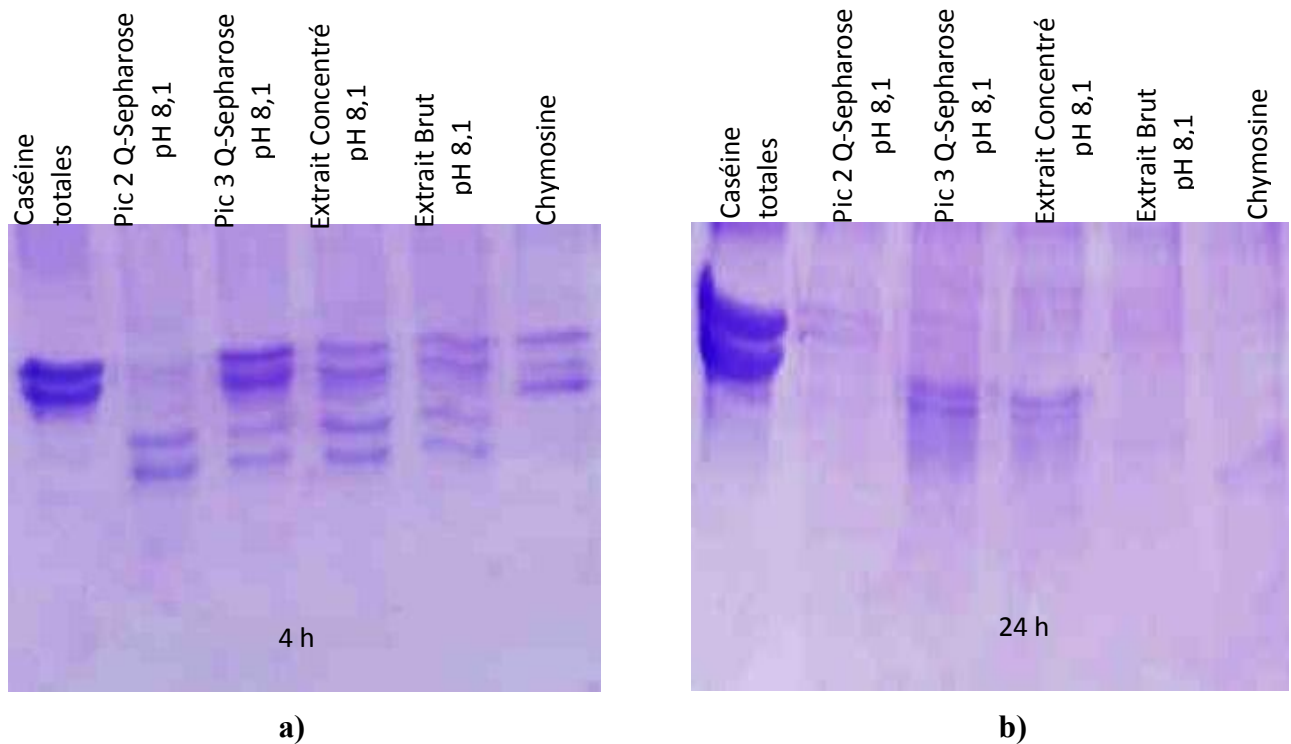
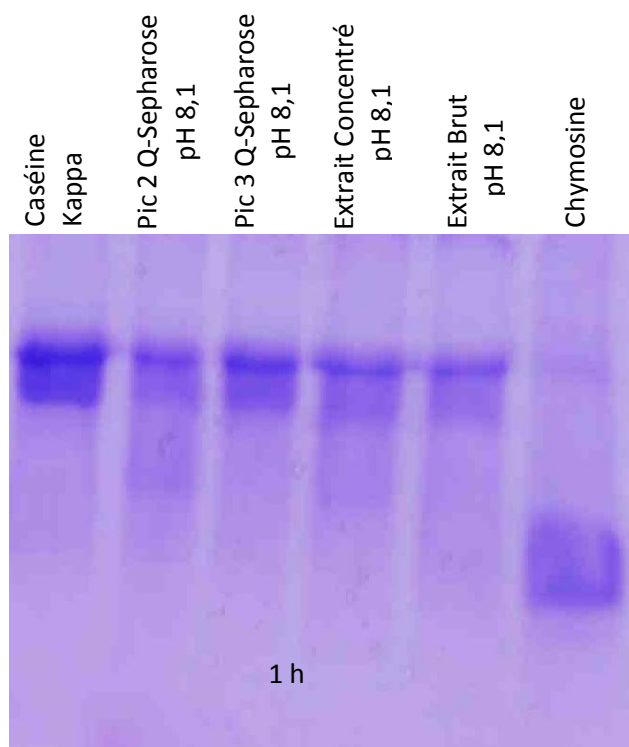
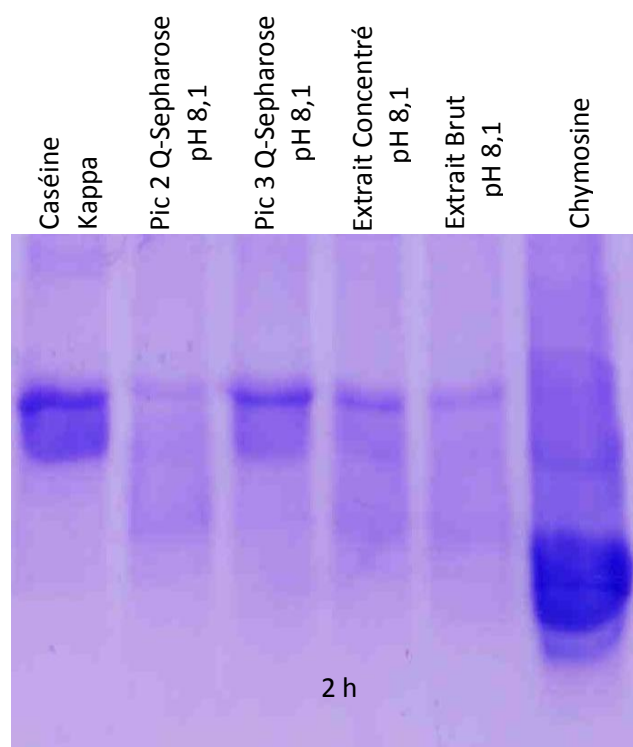


Figure 34: Digestion des caséines α et β par les fractions brutes et purifiées de l'extrait de *B. aegyptiaca*

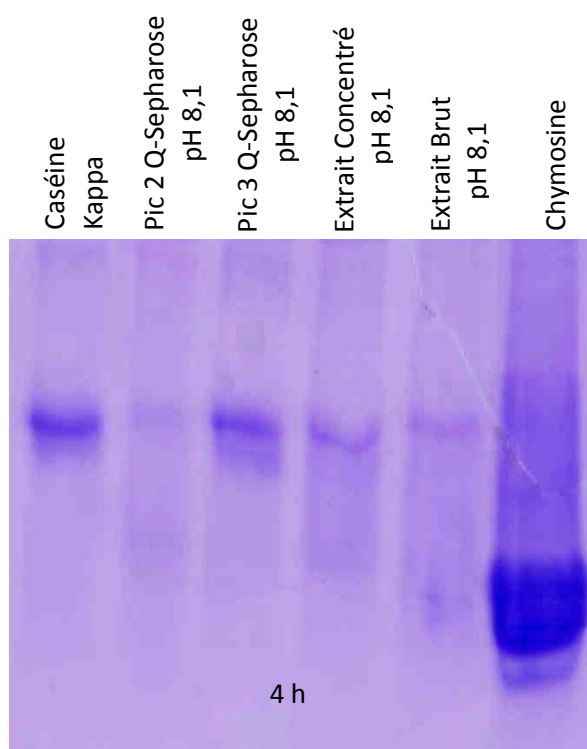
La figure 35 montre la digestion de la caséine kappa dans les mêmes conditions et par les mêmes extraits. Au bout de 2h d'incubation, la caséine kappa a été complètement hydrolysée par le Pic 2 (figure 35b). Par ailleurs, après 24h les extraits bruts et purifiés ont dégradé entièrement la caséine kappa (figure 35d). Cela s'est traduit par la disparition totale des bandes observées sur gel d'électrophorèse. Généralement, la caséine kappa est la principale fraction des caséines à être affectée dans la phase primaire du processus de coagulation. L'action de la présure et de la plupart de ses substituants sur la caséine kappa ont montré que la liaison Phe₁₀₅ - Met₁₀₆ est particulièrement hydrolysée. Une exception a été notée pour les enzymes d'*Endothia parasitica* et de *Solanum dubium* qui affectent la liaison Ser₁₀₄ - Phe₁₀₅ de la caséine kappa (Mohamed Ahmed et coll., 2010; Drophse et Foltman, 1989).



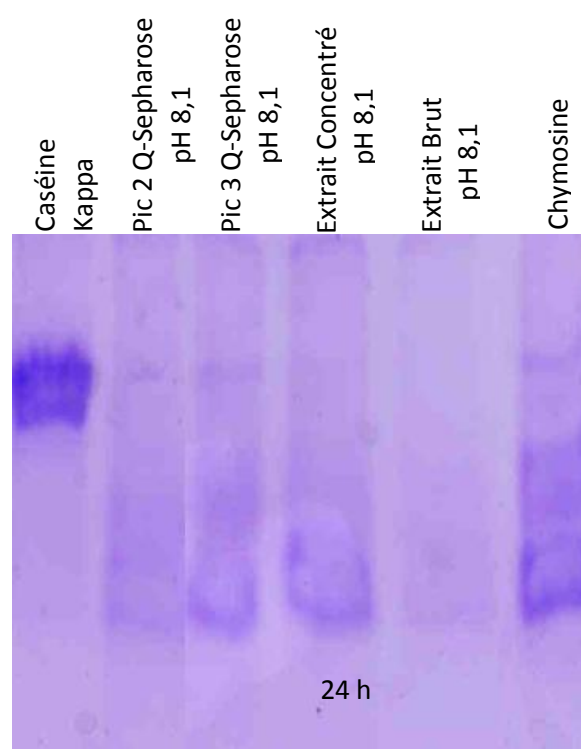
a)



b)



c)



d)

Figure 35: Digestion de la caséine κ par les fractions brutes et purifiées de l'extrait de *B. aegyptiaca*

5-3 Activité sur des substrats synthétiques

- **Activité sur un substrat synthétique de protéase à acide aspartique**

Dans l'optique de déterminer la spécificité des protéases extraites de *B. aegyptiaca*, un substrat spécifique des protéases aspartiques a été utilisé: le H-Pro-Thr-Glu-Phe-para(NO₂)-Phe-Arg-Leu-OH. Ce substrat a été incubé pendant 60 min avec un extrait obtenu à pH 6 après macération à pH 3 de *Balanites aegyptiaca*. Toutes les 5 min, une baisse de l'absorbance à 310 nm a été constatée, montrant l'hydrolyse du substrat en di ou tri-peptides (figure 36).

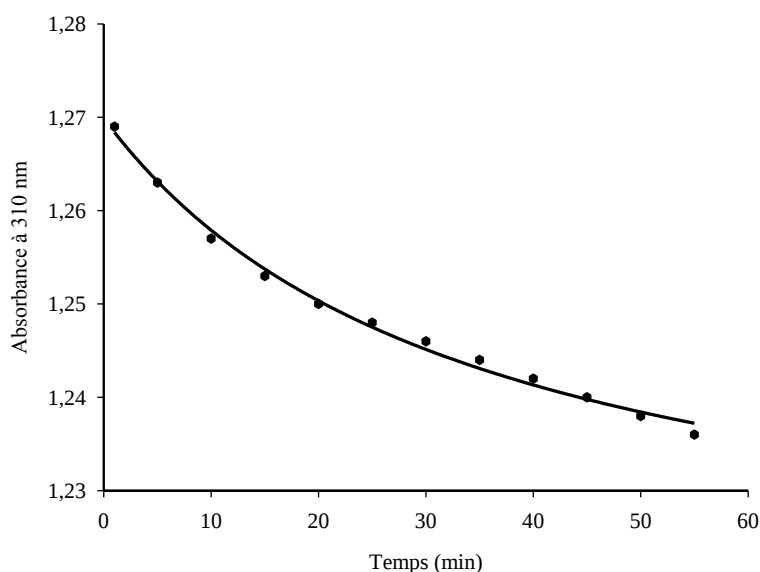


Figure 36: Cinétique d'hydrolyse du H-Pro-Thr-Glu-Phe-p(NO₂)-Phe-Arg-Leu-OH

L'hydrolyse de ce substrat est spécifique de la présence des endopeptidases à acide aspartique (Dunn *et coll.*, 1984, Dunn 2002). Il a été hydrolysé par la cynarase A (Sidrach *et coll.*, 2005). Ces observations confirment la présence d'une protéase à acide aspartique dans l'extrait de *B. aegyptiaca*.

- **Activité de l'extrait sur les substrats spécifiques de protéase à sérine**

Le Succinyl-trialanyl-p-nitroanilide (N-Suc-Ala₃-pNa) et le Succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-phenylalanyl-p-nitroanilide (N-Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa) ont été utilisés comme substrats pour tester la spécificité de la fraction (Pic 2 Q-Sepharose) contenant la protéase à sérine.

- Le N-Succinyl-Ala₃-pNa est hydrolysé par les élastases qui sont des protéases à sérine spécifiques notamment des acides aminés aliphatiques non hydroxylés comme la Glycine, l'Alanine, la Valine, la Leucine, l'Isoleucine et la Proline (Mohamed Ahmed *et coll.*, 2009_a). L'extrait de *B. aegyptiaca*

n'a pas été capable d'hydrolyser ce substrat. Ce résultat indique que la protéase à sérine présente dans l'extrait n'est pas de type élastase.

- Le N-Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa est hydrolysé par la chymotrypsine dont la spécificité porte sur les acides aminés aromatiques notamment la Phénylalanine, la Tyrosine et le Tryptophane (Fontanini et Jones, 2002). L'activité obtenue avec ce substrat à pH 5, à pH 7 et à pH 8 (figure 37) suggère que l'extrait coupe la liaison peptidique se trouvant entre la Phénylalanine et la para-nitro-aniline. Ce résultat était prévisible puisque la coagulation du lait se fait par coupure de la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caséine κ bovine.

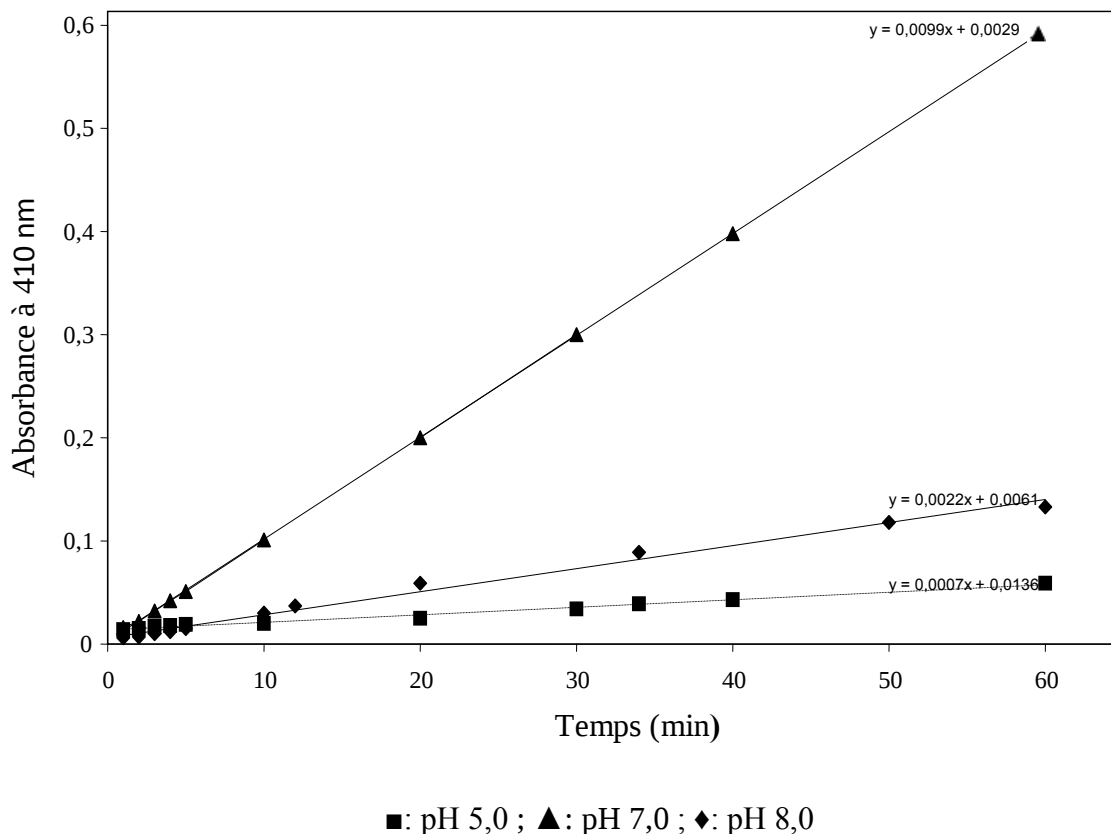


Figure 37: Cinétique d'hydrolyse du N-Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa par la protéase à sérine de l'extrait de *B. aegyptiaca* en fonction du pH

Grâce à ces graphes et en utilisant la loi de Beer-Lambert, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme a été déterminée (tableau 16).

La vitesse initiale a été déterminée selon la formule suivante:

$$Vi (\mu\text{mol}.L^{-1}.min^{-1}) = \frac{\Delta Abs}{\Delta Temps} \times \frac{1}{\epsilon \times l \times 10^5}$$

où ϵ est le coefficient d'extinction molaire de la paranitroaniline avec $\epsilon = 8250 \text{ L}.mol^{-1}.cm^{-1}$ et l est la largeur de la cuve (1 cm).

Tableau 16: Vitesse initiale d'hydrolyse de Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNA

	pH 8	pH 7	pH 5
Vi (μmol.L ⁻¹ .min ⁻¹)	0,36	1,2	0,22

L'analyse des résultats du tableau 16 et des différents graphes précédents (figure 37) montre que la protéase à sérine contenue dans l'extrait de *B. aegyptiaca* serait de type «chymotrypsine-like». D'autre part, les vitesses initiales d'hydrolyse en fonction du pH confirment que le pH optimum de cette enzyme se situe bien autour de pH 7.

Des essais d'hydrolyse du Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNA ont été réalisés avec la fraction contenant la protéase à acide aspartique (Pic 2 Q-Sepharose pH 6). L'apparition de la p-nitroaniline a pu être notée mais l'activité n'est pas mesurable, indiquant la probable spécificité de cette enzyme pour la liaison impliquant la phénylalanine (acide aminé aromatique). Ce résultat reste à prouver.

5-4 Action d'inhibiteurs spécifiques

Afin de confirmer la présence de deux protéases de classes différentes, la pepstatine, inhibiteur de protéase à acide aspartique, et le PMSF, inhibiteur de protéase à sérine qui avaient montré une activité inhibitrice sur l'extrait brut de *B. aegyptiaca*, ont été testés sur les Pics 2 et 3 de la chromatographie d'échange d'ions sur Q-Sepharose à pH 8,1.

Tableau 17: Effet des inhibiteurs spécifiques

Inhibiteurs	Spécificité	Concentration	Pourcentage d'inhibition		
			Extrait brut	Pic 2 Q-Sepharose pH 8,1	Pic 3 Q-Sepharose pH 8,1
Pepstatine A	Protéase à Aspartate	10 μmol.L ⁻¹	86	0	100
PMSF	Protéase à Sérine	1 mmol.L ⁻¹	12	100	0
Iodoacétamide	Protéase à Cystéine	50 mmol.L ⁻¹	5	0	0

L'analyse des résultats du tableau 17 montre qu'une inhibition de 100 % a été obtenue sur le Pic 2 issu de la chromatographie à pH 8,1 sur Q-Sepharose avec le PMSF, inhibiteur spécifique des protéases à sérine. Par ailleurs, le Pic 3 résultant de la même purification a été totalement inhibée par la pepstatine A, inhibiteur spécifique des aspartique protéases. L'extrait brut a été inhibé à 5 % par l'iodoacétamide, inhibiteur spécifique des protéases à cystéines; cependant aucune inhibition n'a été notée dans les différentes fractions purifiées et marquant ainsi l'absence de spécificité de ces fractions aux protéases à cystéines.

Ainsi, nous pouvons supposer que dans l'extrait brut, il n'y a pas une, mais plusieurs enzymes coagulant le lait. Une serait une protéase à acide aspartique, et l'autre une protéase à sérine. A pH 8,1 sur Q-Sepharose, la protéase à sérine a été purifiée dans le Pic 2 et la protéase à acide aspartique a été purifiée dans le Pic 3. Une étude structurale peut être nécessaire pour une bonne connaissance des enzymes purifiées de *B. aegyptiaca*.

6 – CARACTERISTIQUES STRUCTURALES

Les études structurales d'une protéase sont fondamentales pour connaître son rôle, sa fonction, sa stabilité et ses conditions extrêmes d'utilisation. La connaissance de ces paramètres est un facteur décisif pour son utilisation efficace comme enzyme en industrie et en biotechnologie. Ainsi les points isoélectriques, les séquences peptidiques primaires, la structure glycanique et la composition en monosaccharides ont été déterminés.

6-1 Détermination des points isoélectriques

Les points isoélectriques des composants du Pic 2 issu de la chromatographie d'échanges d'ions à pH 7,6 ont été déterminés par électrophorèse bidimensionnelle, suivie d'une coloration au nitrate d'argent. Cette fraction possédait les bandes de masse 28, 38, 70 et 85 kDa. Les bandes et les spots ayant focalisé ont été identifiés sur un gel d'électrophorèse (figure 38).

Les spots présents sur chacune des bandes purifiées sont distincts sur cette figure. Seules les bandes de masses 28 et 38 kDa ont focalisées correctement et ont pu être colorées. La bande de 28 kDa présente 3 spots correspondant à 3 isoformes avec des points isoélectriques respectifs de 4,55; 4,8 et 5,4; tandis que la bande de 38 kDa possède 2 spots correspondant à 2 isoformes avec des points isoélectriques respectifs de 5,2 et 5,5. Des résultats similaires ont été obtenus par Sidrach *et coll.* (2005) avec les protéases du Cynara dont une des bandes protéiques possédait 3 pIs correspondant respectivement aux cynarases A, B et C.

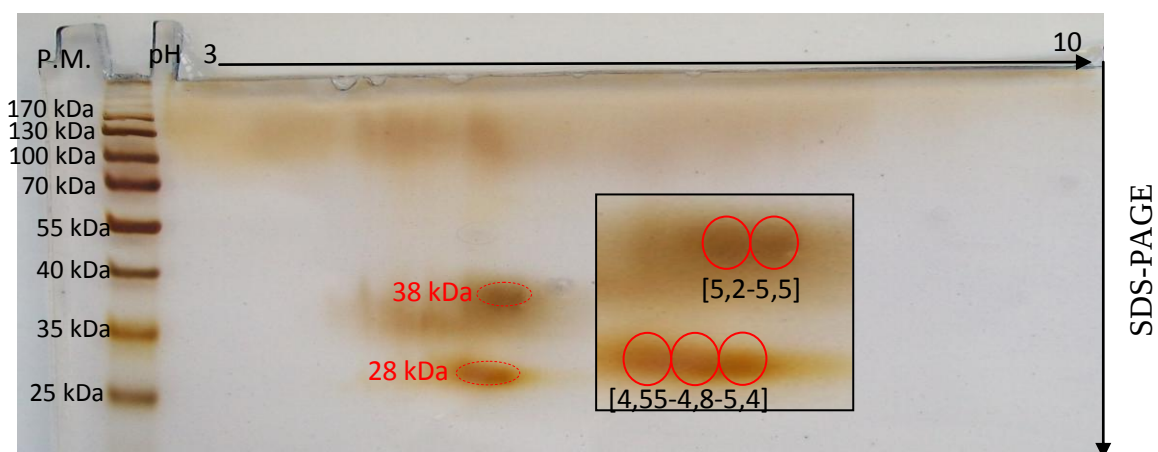


Figure 38: Electrophorèse bidimensionnelle du Pic 2 Q-Sepharose pH 7,6

En revanche, les bandes de 70 et 85 kDa présentes dans l'échantillon n'apparaissent pas en 2D. Ces bandes ont été mal focalisées dans la première dimension soit par précipitation, soit par aggrégation et forment peut-être le smire observé en haut du gel. La présence d'isoformes montre également la possibilité d'avoir plusieurs modèles de glycosylation pour une même protéine. Selon Sarmiento *et coll.* (2009), la présence des isoformes dans les végétaux est probablement due à l'expression de plusieurs gènes dans les tissus des plantes qui codent pour une ou plusieurs enzymes. Alternativement elle peut aussi être due à l'hétérogénéité du polymorphisme inhérent dans les cellules eucaryotes. En effet, la présence de plusieurs gènes qui codent pour les protéases aspartiques ont été décrites par Takahashi *et coll.* (2008) chez *Arabidopsis thaliana*.

6-2 Séquences peptidiques partielles

L'analyse par électrophorèse a montré précédemment que les bandes de 38 et 43 kDa ont été identifiées dans le Pic 3 issu de la chromatographie d'échanges d'ions sur Q-Sepharose à pH 8,1 puis les bandes de 28, 70 et 85 kDa dans le Pic 2 obtenu dans les mêmes conditions. Une synthèse des résultats obtenus jusqu'ici suggère que les bandes présentes dans le Pic 2 seraient des protéases à sérine et celles présentes dans le Pic 3 seraient des protéases à acides aspartiques. Pour le vérifier, les séquences peptidiques primaires ont partiellement été déterminées après prélèvement des bandes protéiques dans les gels de polyacrylamide, digestion trypsique de ces protéines et analyse par MALDI-TOF et LC/MS. Les différentes séquences peptidiques résultant de cette analyse ont été comparées aux bases de données existantes pour trouver une ou plusieurs homologues avec des protéases connues.

L'analyse en MALDI-TOF permet de vérifier la qualité des échantillons (Pande *et coll.*, 2006) en confirmant l'absence des contaminants comme la kératine et les polymères ainsi que la quantité de protéines présentes dans ces échantillons (Sharma *et coll.*, 2009). Après analyse en MALDI-TOF, les spectres des bandes 28, 38, 70 et 85 kDa sont présentés respectivement dans les figures 39, 40, 41 et 42. L'intensité des spectres montre que les quantités de protéines analysées sont suffisantes et que les échantillons à analyser sont assez purs.

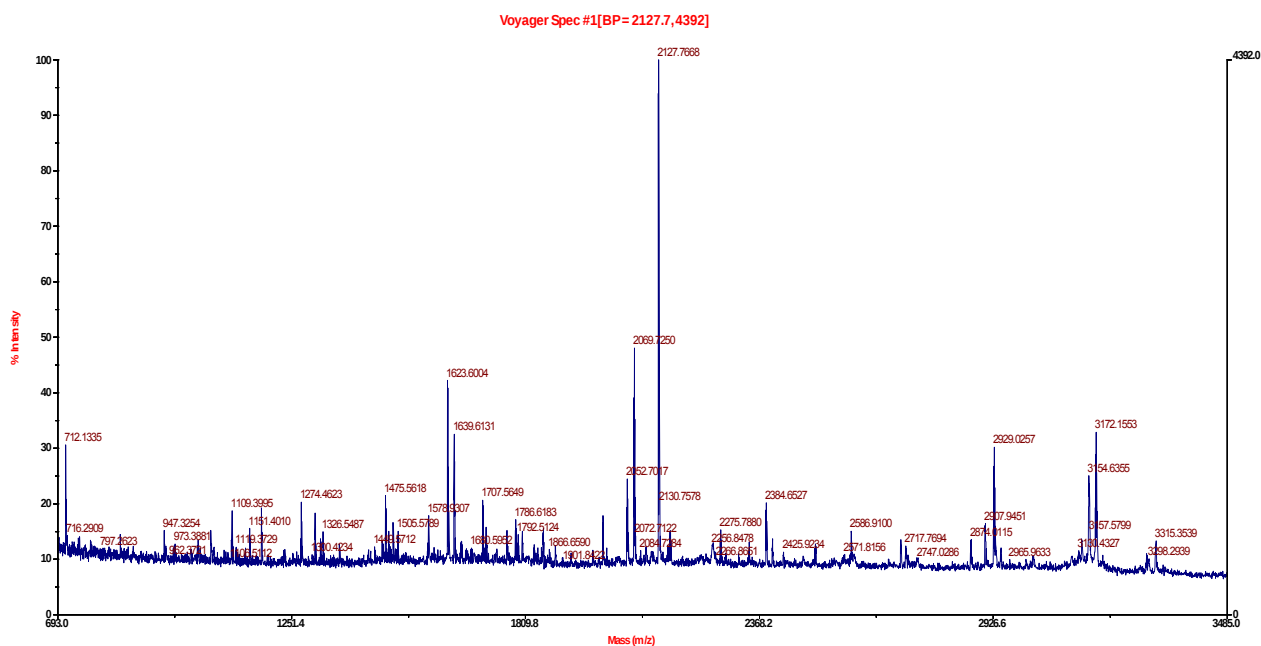


Figure 39: Spectre de masse MALDI-TOF de la bande de 28 kDa

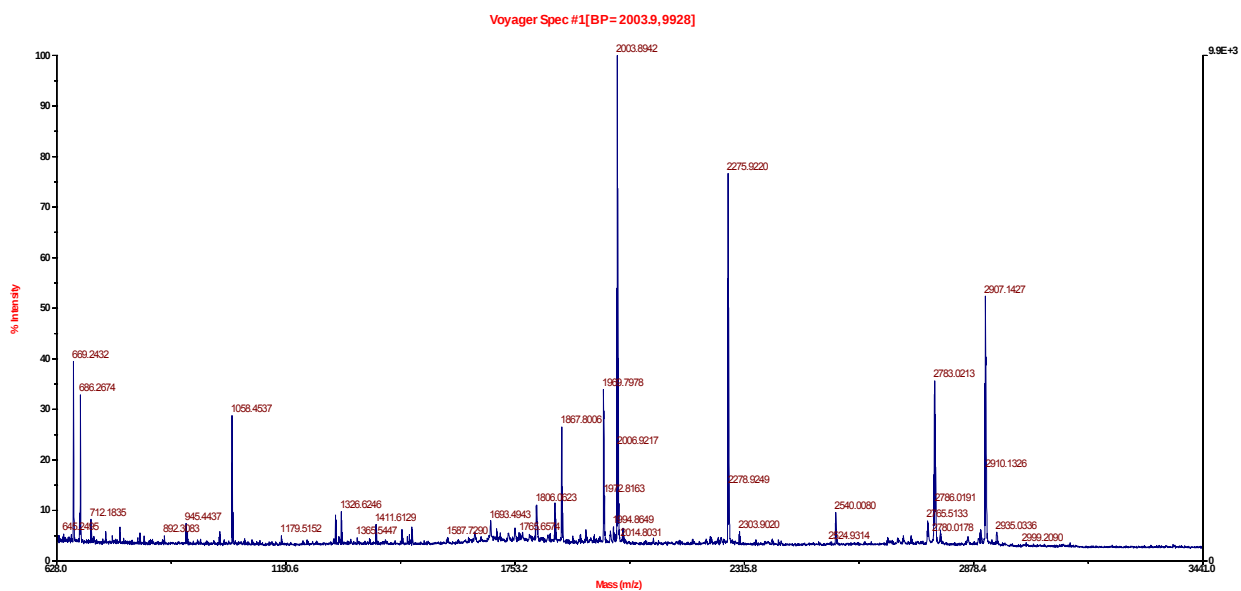


Figure 40: Spectre de masse MALDI-TOF de la bande de 38 kDa

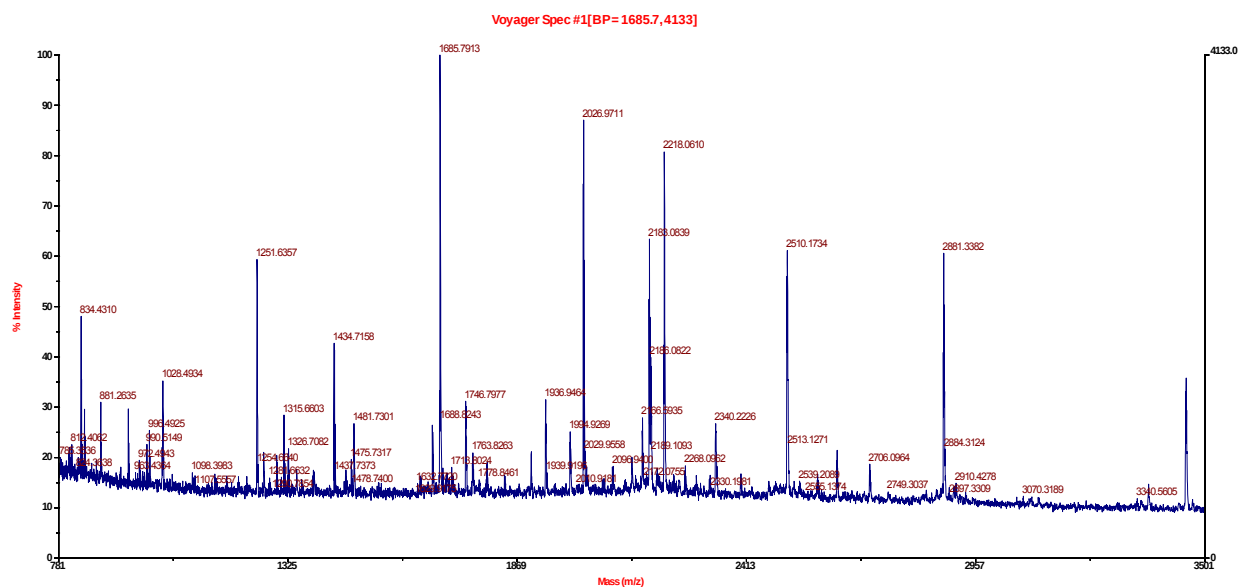


Figure 41: Spectre de masse MALDI-TOF de la bande de 70 kDa

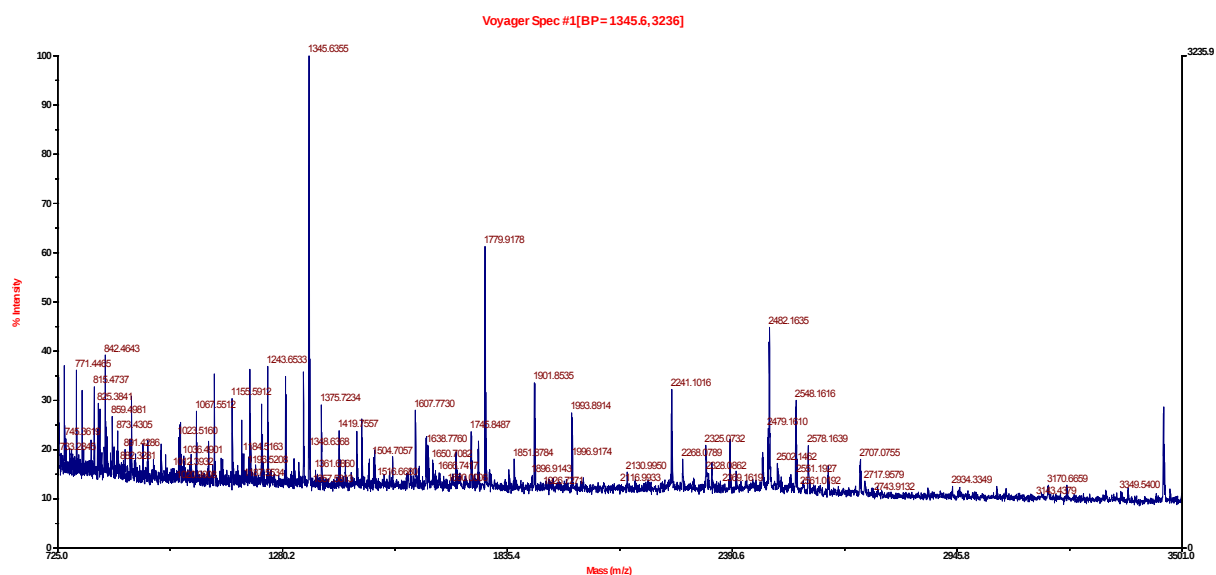


Figure 42: Spectre de masse MALDI-TOF de la bande de 85 kDa

Après analyse en MALDI-TOF, les échantillons ont été soumis à la LC/MS-MS. Les séquences des peptides obtenues sont comparées aux bases de données NCBI et UNIPROTKB. Le génome de l'organisme *B. aegyptiaca* n'étant pas encore séquencé, les séquences obtenues ont été confrontées aux bases de données par recherche d'homologie de séquences par blast. Les séquences ayant présenté des homologies à un pourcentage élevé (> 76 %) aux séquences peptidiques connues de certaines plantes ont été consignées dans le tableau 18.

Tableau 18: Séquences peptidiques et identification des types de protéases

Bande (kDa)	Séquences	Nom de la protéine	Nom de la plante	Numéro d'accension
85	LLKEFTSIASIDK	EC.3.4.19.1 endopeptidase de type Sérine	<i>Ricinus communis</i>	B9RTG2 (UniprotKB) XM002516985.1 (NCBI)
85	TYIGSMPGRLIEGLK	EC.3.4.21 endopeptidase de type Sérine	<i>Vitis vinifera</i>	D7TTJ0 (UniprotKB) CAN75012 (NCBI)
70	SFNLMPKYDVNVIPK	EC.3.4.16 Sérine-type carboxypeptidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FFB0 (UniprotKB) NP197689 (NCBI)
28	AAAAADDGAVVAR	Protéase à sérine	<i>Oryza sativa subsp.</i> japonica (Rice).	BAD37810 (NCBI)
38	VIHAPARNR	Endopeptidase de type aspartique	<i>Pisum sativum</i> (Garden pea).	Q6WAY3 (UniprotKB)

Les résultats des différents blasts consignés dans le tableau 18 indiquent que la bande de 38 kDa contient une séquence peptidique de 9 acides aminés, homologue d'une séquence peptidique contenue dans une protéase à acide aspartique de *Pisum sativum*.

Par ailleurs, les bandes de 28, 70 et 85 kDa ont des séquences peptides homologues à des protéases à sérine. La bande de 28 contient une séquence de 13 acides aminés, homologue à la séquence peptidique de la protéase à sérine d'*Oryza sativa subsp.* japonica; la bande à 70 kDa possède une séquence de 15 acides aminés qui est homologue à la protéase à sérine de *Arabidopsis thaliana*; pour la bande de 85 kDa, deux séquences de 13 et 15 acides aminés ont donné des homologies avec des protéases à sérine respectivement de *Ricinus communis* et de *Vitis vinifera*.

Ainsi, l'analyse par blast montre l'existence de deux groupes de protéases parmi les bandes isolées sur gel d'électrophorèse, à savoir: un groupe à sérine et un autre à aspartique.

6-3 Structures glycosidiques

6-3-1 structures glycaniques

De nombreuses protéases à acides aspartiques issues d'extraits végétaux ont été identifiées comme étant des molécules ayant un ou plusieurs sites de glycosylation (Costa *et coll.*, 1997). La glycosylation a été également détectée chez plusieurs sérine protéases de plantes comme la cucumisin, la taraxalisin, la cryptolepain, la milin et la wrightin (Yamagata *et coll.*, 1989; Rudenskaya *et coll.*, 1998; Pande *et coll.*, 2006; Yadav *et coll.*, 2006; Tomar *et coll.*, 2008). La partie glycosylée d'une glycoprotéine peut faire partie de l'architecture fonctionnelle de l'enzyme, et pourrait être responsable de sa stabilité thermique (Mohamed Ahmed *et coll.*, 2009_a).

La caractérisation des glycanes des protéases de l'extrait brut et de l'extrait purifié par chromatographie d'échanges d'ions sur Q-Sepharose à pH 7,6 (Pic 2) du fruit de *B. aegyptiaca* a été réalisée grâce à l'utilisation de lectines spécifiques qui permettent d'identifier la nature des carbohydrates qui constituent la partie glycosylée des glycoprotéines. Les différentes lectines spécifiques suivantes ont été utilisées: la Concanavaline A, la *Galanthus nivalis* agglutinine (GNA) l'*Aleuria aurantia* lectine (AAL), la *Wheat Germ* agglutinine (WGA), la *Peanut* agglutinine (PNA) et la *Datura stramonium* agglutinine (DSA).

La Concanavaline A (ConA) est une hémagglutinine qui se lie spécifiquement à l' α D-mannose ou au D-glucose avec une forte affinité. La figure 44 montre l'immunodétection par la ConA sur la membrane de PVDF. La réaction positive à la ConA indique la présence du mannose dans l'extrait. Par ailleurs, la ConA a été utilisée avec succès pour identifier les N-glycoprotéines de plusieurs complexes biologiques (Faïd *et coll.*, 2006; Ghosh *et coll.*, 2004).

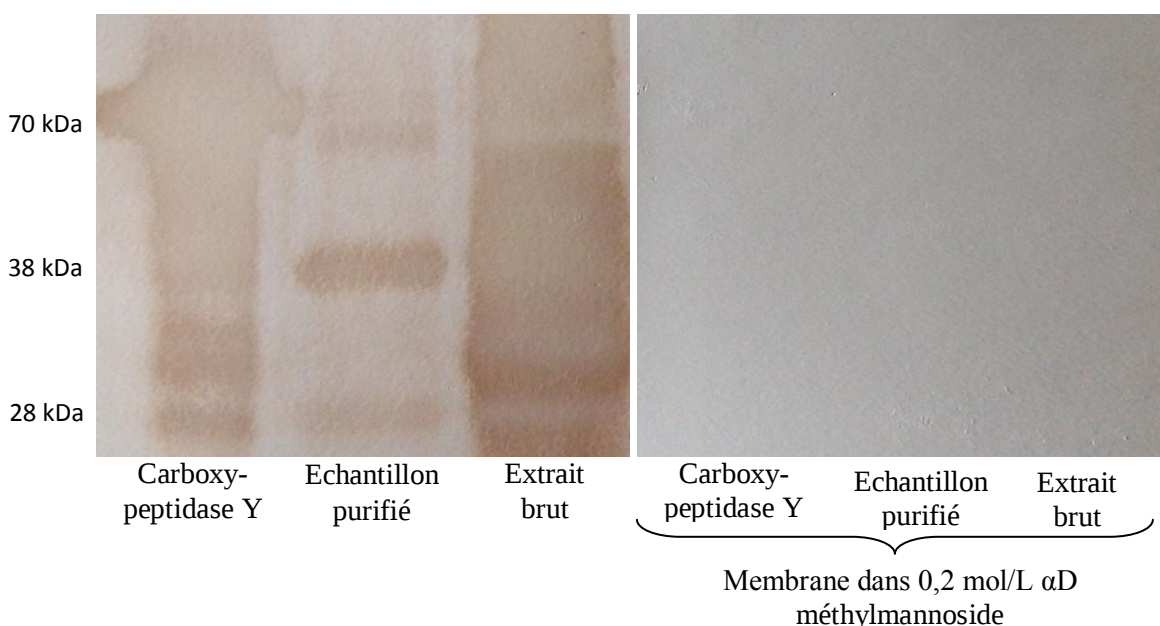


Figure 43: Immunodétection par la ConA sur PVDF

La bande de 38 kDa est la plus marquée et indique la présence de mannose alors que les bandes de 70 et 28 kDa ont une réaction plus ou moins positive pour l'échantillon purifié. La réaction totale de l'extrait brut se justifie par l'abondance ou la présence de glycoprotéines et de polysaccharides mal résolus en SDS-PAGE au cours de la migration. La réaction négative en présence du α D-méthylmannoside qui est le sucre compétiteur pour cette lectine confirme la présence du mannose dans cet extrait.

La *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) a été utilisée pour la détection des mannoses terminaux sur membrane de nitrocellulose (figure 44). La GNA reconnaît le mannose terminal et les mannoses liés en $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$ ou $\alpha(1-2)$. Elle permet d'identifier les N-glycanes de type oligomannosidiques ou les chaînes O-mannosylées (Shibuya *et coll.*, 1988a). Généralement, la GNA réagit uniquement avec les glycopeptides de type oligomannosidiques contenant la séquence Man($\alpha 1-3$)Man en position terminale. Les interactions avec cette lectine dépendent aussi du nombre d'unités de ce disaccharide. Cependant, les glycopeptides de type hybride possédant la séquence Man($\alpha 1-3$)Man, et possédant les résidus GlcNAc ne réagissent pas avec cette lectine (Shibuya *et coll.*, 1988a).

La réactivité du GNA sur l'échantillon brut indique une faible proportion de chaînes polysaccharidiques contenant des chaînes mannosylées ou des N glycoprotéines de haut poids moléculaire possédant des mannoses terminaux. En revanche, l'échantillon purifié a donné un résultat négatif. La non réactivité en présence du méthyl α -D mannopyrannoside (sucre compétiteur pour cette lectine), confirme la présence du mannose dans cet extrait même si le signal de la carboxypeptidase Y utilisé comme témoin ne soit pas complètement éteint par le compétiteur. Ce résultat indique que les protéases ne présentent pas de mannose en position terminale des chaînes glycaniques.

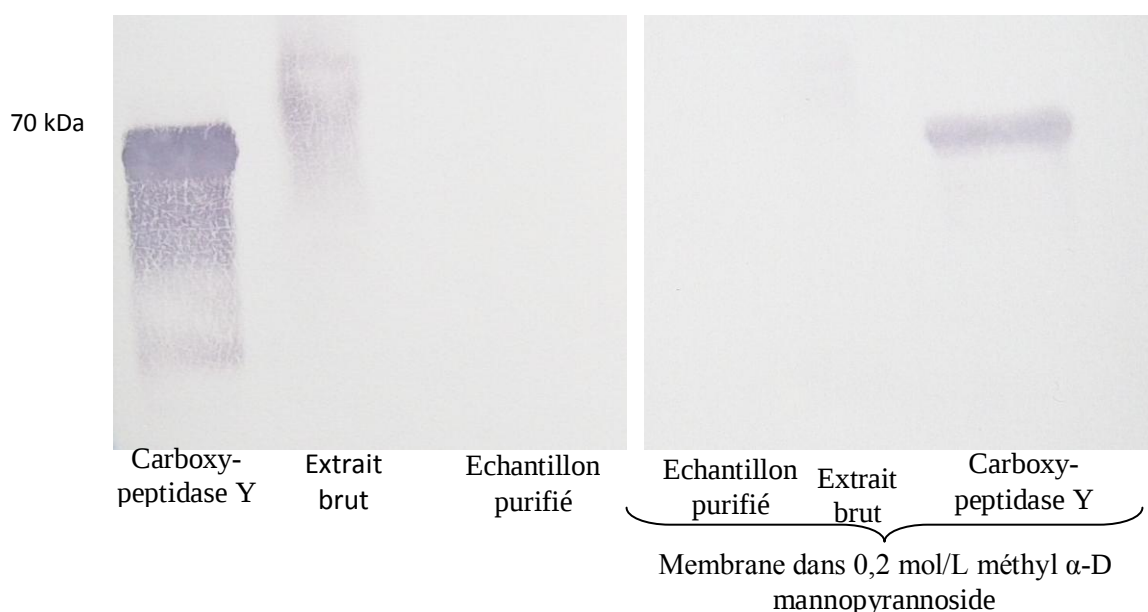


Figure 44: Immunodétection par le GNA sur nitrocellulose

L'immunodétection par la lectine *Aleuria* (AAL) sur PVDF a été utilisée pour mettre en évidence le fucose. En effet, la présence des liaisons α -1,6 et des résidus α -1,6- liés au fucose détermine la forte affinité de cette lectine aux glycanes (Debray et Montreuil, 1989). La réaction est positive avec *Aleuria* (figure 45). La forte réactivité de l'extrait brut indique la présence des glycoprotéines ou de polysaccharides fucosylés. La bande de 38 kDa a été plus réactive que les autres (70 et 28 kDa). Ce résultat indique la présence de fucose dans la partie glycosylée des protéases de *B. aegyptiaca*

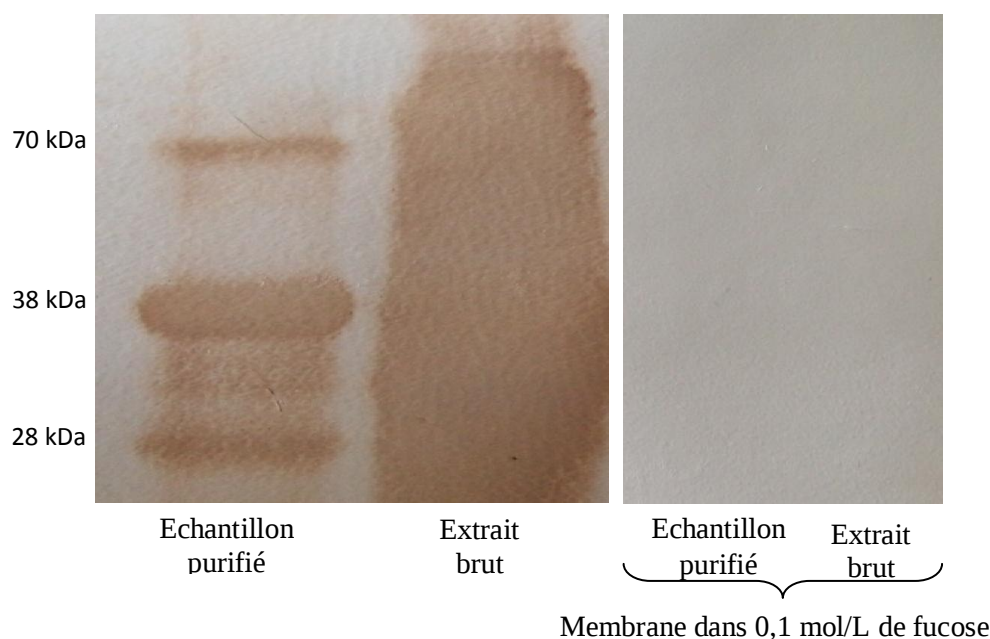


Figure 45: Immunodétection par *Aleuria* sur PVDF

Aucun résultat positif n'a été obtenu avec les lectines WGA, spécifique de la N-acétylglucosamine (Glc-NAc). De même, la PNA qui reconnaît le core disaccharidique galactose β (1-3) N-acetyl galactosamine et permet d'identifier les O-glycanes et la DSA qui reconnaît le disaccharide Gal-(1-4) GlcNAc dans les N-glycanes de type complexe et l'hybride dans les O-glycanes (Crowley *et coll.*, 1984) ont donné des résultats négatifs. De ce fait, l'absence de galactose et de N-acétylglucosamine dans les glycoprotéines de l'extrait est bien prouvée. Les principaux résultats sont récapitulés dans le tableau 19.

Cette analyse par les lectines nous permet de conclure que les protéases de l'extrait purifié sont glycosylées et leur partie glycanique serait composée essentiellement de mannose et de fucose.

Tableau 19: Détection des glycanes par des lectines spécifiques

Echantillons		GNA	ConA	AAL	WGA	PNA	DSA
Extrait brut		+ (70 kDa)	+++	+++	-	-	-
Extrait purifié	28 kDa	-	±	+	-	-	-
	38 kDa	-	++	++	-	-	-
	70 kDa	-	±	+	-	-	-
Témoin positif		Carboxypeptidase Y		ND	Asialofétuine		
		++	++		±	+	+
Spécificité		Mannose terminal	Mannose	Fucose	Glc-NAc terminal	Galactose terminal	Galβ(1-4)Glc-NAc

(+++): Réaction totale, (++) : Réaction très positive, (+): Réaction positive

(±): Réaction plus ou moins positive, (-): Réaction négative, ND: Non déterminé

6-3-2 Détermination de la composition en monosaccharides

Cette partie du travail a fait l'objet d'une publication dans « International Journal of Biological Macromolecules », (2011), **49**, 397– 401. Ce travail a essentiellement consisté à une analyse exploratoire des monosaccharides conjugués ou polymérisés des glycoprotéines de l'extrait purifié du mésocarpe des fruits de *B. aegyptiaca*.

Généralement, la partie carbohydre d'une protéase joue un rôle important dans la régulation de sa stabilité (Van Teeffelen *et coll.*, 2005). L'activité d'une protéase, sa solubilité et sa protection contre la dégradation, dépendent essentiellement de la nature des carbohydre constituant sa partie glycosylée (Pande *et coll.*, 2006). Il paraît donc intéressant de déterminer les carbohydre liés aux protéases de fruits *B. aegyptiaca*.

La méthode de dérivation par l'acide hepta fluorobutyrique anhydre (HFBA) précédée d'une étape de méthanolyse a été utilisée pour l'étude de la glycosylation des protéases de *B. aegyptiaca*. Dans le but de séparer les protéines et les polysaccharides des oligosaccharides libres non conjugués, l'extrait brut a subi une précipitation à l'acétone avant d'être analysé. Les hexoses, les déoxy-hexoses, les pentoses, les hexosamines, l'acide sialique et les acides uroniques sont les glyco-carbohydre constituant fréquemment la partie glycosylée des glycoprotéines. La chromatographie en phase gazeuse par détecteur à ionisation de flamme (GC/FID) et la chromatographie en phase gazeuse par impact d'électrons (GC/MS-EI) ont été utilisées pour analyser cet extrait.

La figure 46 montre les chromatogrammes GC/FID de l'extrait brut avec et sans précipitation des protéines à l'acétone. Ces chromatogrammes montrent l'intérêt de cette précipitation qui augmente considérablement la concentration en carbohydre de l'extrait dans le

précipité. L'intensité des pics sur ce chromatogramme traduit ainsi une forte présence de glycoprotéines et de polysaccharides dans l'extrait.

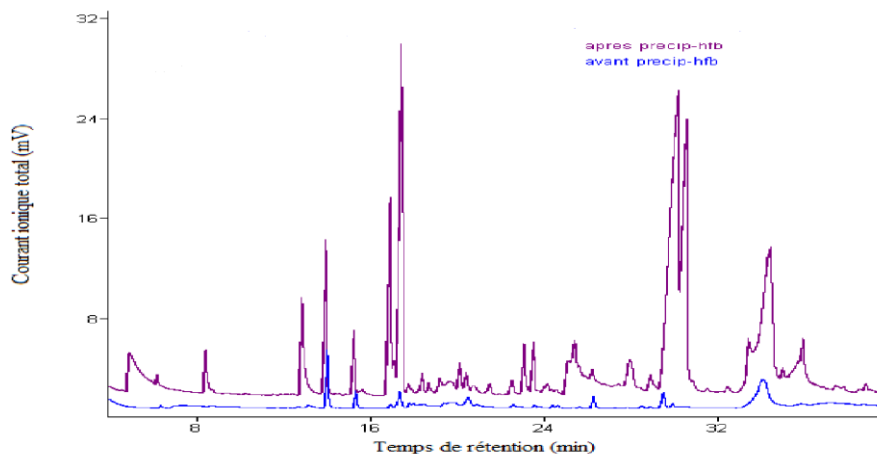


Figure 46: Chromatogrammes GC/FID de l'extrait brut avant et après précipitation des protéines

Pour identifier et quantifier les différents monosaccharides présents dans l'extrait de *B. aegyptiaca*, en comparant les profils et les temps de rétention après précipitation à l'acétone. La lysine a été utilisée comme étalon interne au cours de cette analyse. Les résultats de la figure 47 montrent que le galactose, l'arabinose, le rhamnose, le xylose, le mannose, le glucose et de l'acide glucuronique sont les principaux monosaccharides détectés dans l'extrait purifié des fruits de *B. aegyptiaca*.

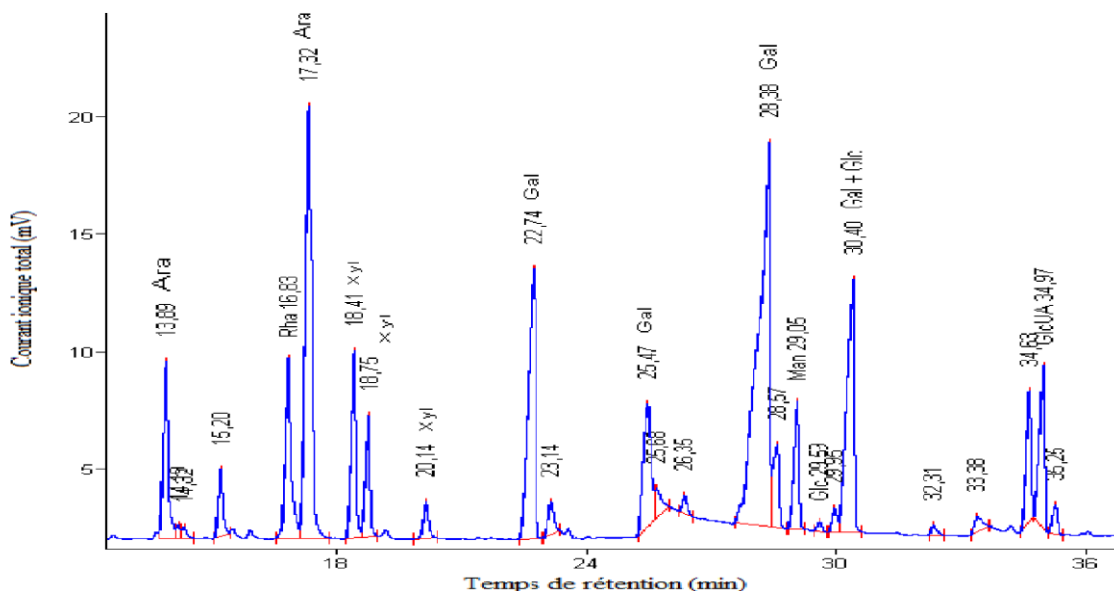


Figure 47: Chromatogramme GC/FID de l'extrait purifié après précipitation à l'acétone

Cependant, le galactose présent dans cet extrait n'est en position terminale de la chaîne glycanique ou n'est pas impliqué dans les motifs classiquement décrits de O-glycanes de types mucines ou des N-glycanes de type N-Acétyl-lactosaminique; en effet, malgré l'abondance du galactose détecté en GC/FID, celui-ci a donné un résultat négatif avec le PNA qui est sa lectine spécifique.

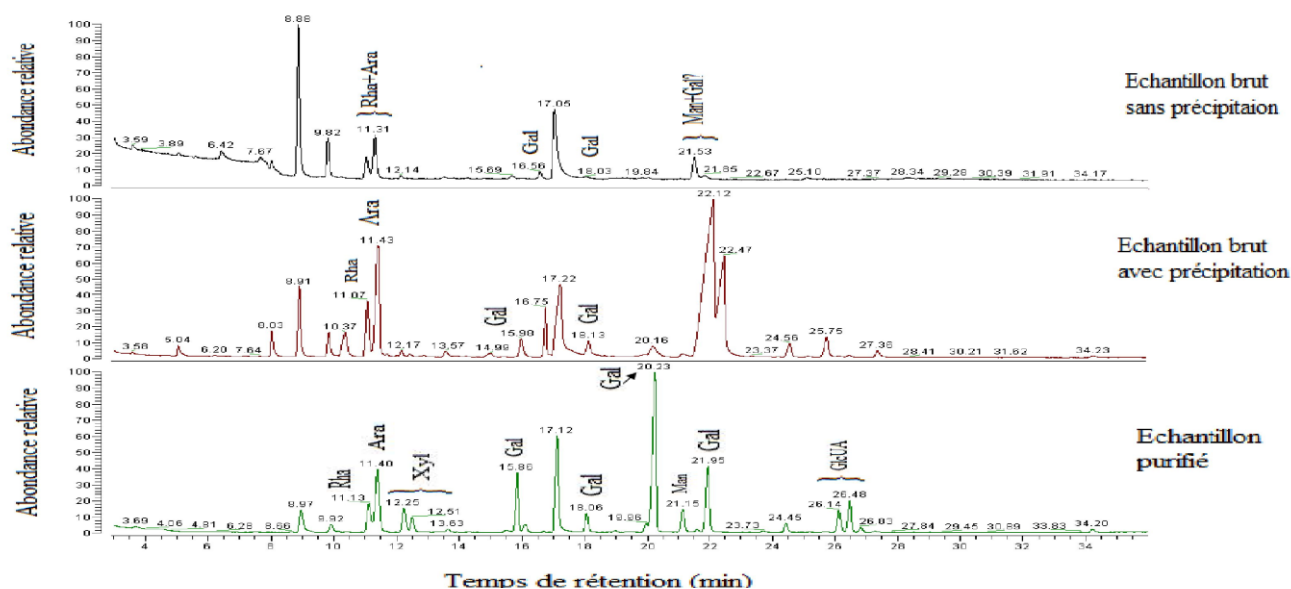


Figure 48: Chromatogrammes GC/MS-EI des extraits bruts et purifiés

Les analyses en GC/MS-EI (figure 48) montrent une fois de plus l'intérêt de la précipitation à l'acétone; cette opération permet d'enrichir l'extrait en glycoconjugué. En effet, l'abondance des monosaccharides est plus élevée lorsque l'extrait est précipité ou purifié. Le rhamnose, l'arabinose et le galactose sont présents aussi bien dans l'extrait brut comme dans les extraits précipités et purifiés. Par contre, le xylose, le mannose et l'acide glucuronique ont été détectés après purification de l'extrait.

La GC/MS-EI a été utilisée pour confirmer la présence des monosaccharides détectés en GC-FID, par leur fragmentation et l'apparition d'ions caractéristiques. La détection des monosaccharides a été faite en analysant les temps de rétention couplés aux ions spécifiques (m/z) caractéristiques de chaque monosaccharide (Tableau 20).

Les profils chromatographiques d'extraction des carbohydrates liés aux protéases de *B. aegyptiaca* ont été déterminés par la combinaison du signal (m/z) et du temps de rétention (figure 49) après dérivation des méthyl-glycosides par HFB. Cependant, la plupart des carbohydrates présents dans plusieurs extraits de plantes ont été déterminés par la méthode à l'acide phénol sulfurique mais avec le galactose comme standard. Dans cette méthode, les carbohydrates sont

détectés après coloration au réactif de Schiff après électrophorèse en SDS-PAGE (Hounsell *et coll.*, 1997).

Tableau 20: Ions caractéristiques des principaux monosaccharides de l'extrait par dérivation HFB en GC/MS-EI

Temps de rétention (min)	Ions caractéristiques spécifiques (m/z)	Ions spécifique observé (m/z)	Assignement du monosaccharide
21,14	509-519	509	Mannose
11,40	479-265-325	479	Arabinose
11,13	279-492	492	Rhamnose
12,25-12,51	479-265-325	479	Xylose
20,22	509-519	519	Galactose
26,17-26,49	323-537-597	537	Acide uronique
30,24	276-472-488-702	276	Glucosamine / Mannosamine

Le profil du courant ionique total (TIC) est assez significatif et révèle la présence des monosaccharides dans l'extrait de *B. aegyptiaca*. Cependant le signal correspondant à l'ion m/z 479 indique la présence des pentoses; l'ion m/z 492,0 indique la présence des deoxyhexoses; l'ion m/z 509,0 et/ou 519,0 indique la présence des hexoses, alors que l'ion m/z 537,0 indique les acides uroniques.

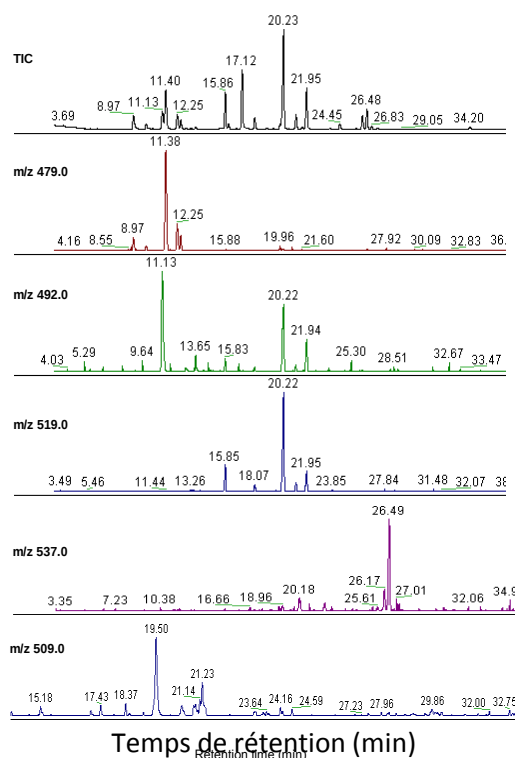


Figure 49: Profils chromatographiques d'extraction des ions caractéristiques en fonction des temps de rétention

La figure 50 indique le profil de détection de 2 hexoses dans l'extrait de la pulpe de *B. aegyptiaca*. Le premier hexose a été détecté après extraction de l'ion m/z 509,0 pour le galactose et m/z 519,0 pour le mannose respectivement aux temps de rétention 20,22 min et 21,14 min.

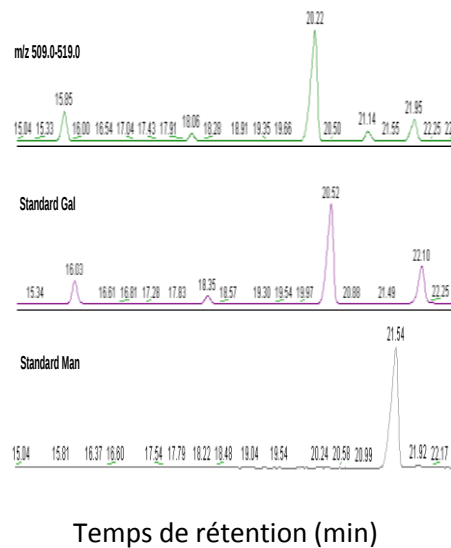


Figure 50: Profil d'extraction des hexoses (Gal et Man) en combinant les temps de rétention et les ions spécifiques

La figure 51 indique le profil de détection de 2 pentoses dans l'extrait de la pulpe de *B. aegyptiaca* par extraction de l'ion caractéristique m/z 479,0. Les temps 11,40 min et 12,25/12,51 min correspondent respectivement aux temps de rétention de l'Arabinose et du Xylose

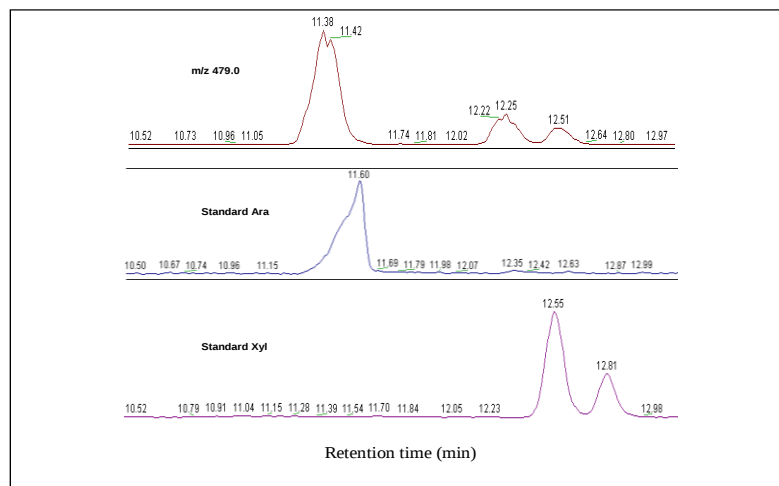


Figure 51: Profil d'extraction des pentoses (Ara et Xyl) en fonction des temps de rétention et des ions spécifiques

Le temps de rétention 11,13 min extrait en fonction de l'ion m/z 492,0 et du temps de rétention 26,17/26,49 min pour l'ion m/z 537 suggère la présence du rhamnose et de l'acide glucuronique dans l'extrait de *B. aegyptiaca* (figures 52 et 53)

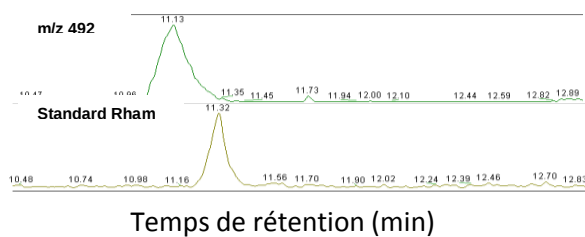


Figure 52: Profil d'extraction des deoxyhexoses (Rham) en fonction des temps de rétention et des ions spécifiques

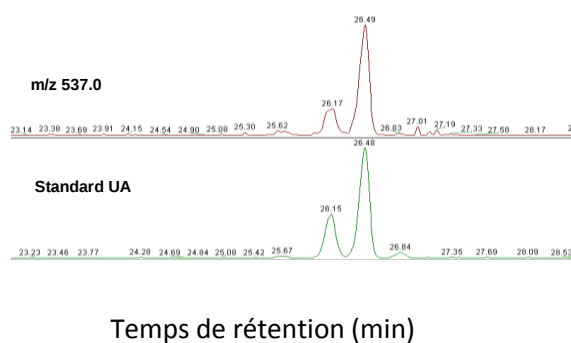


Figure 53: Profil d'extraction des acides uroniques (GluA) en fonction des temps de rétention et des ions spécifiques

Les monosaccharides précédemment détectés ont été confirmés et représentés dans les figures 54, 55, 56, 57.

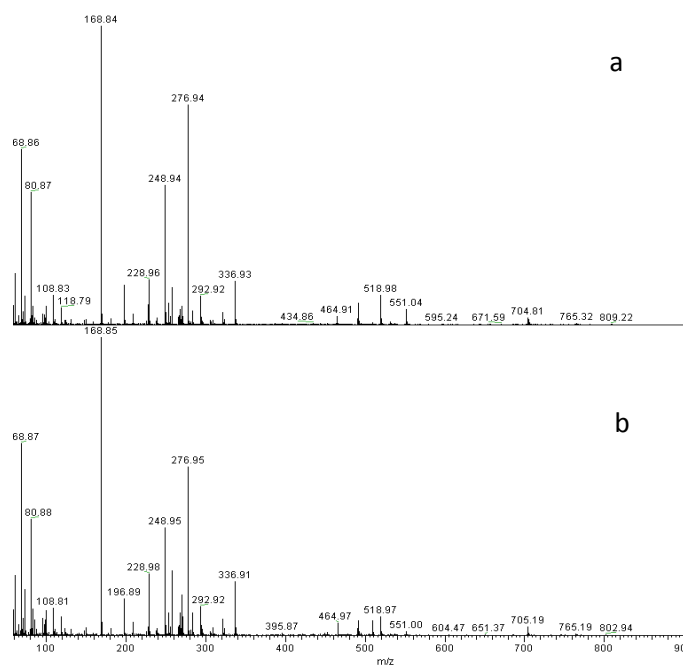


Figure 54: Spectre MS-EI des hexoses. a: spectre du Gal, b: spectre du Man

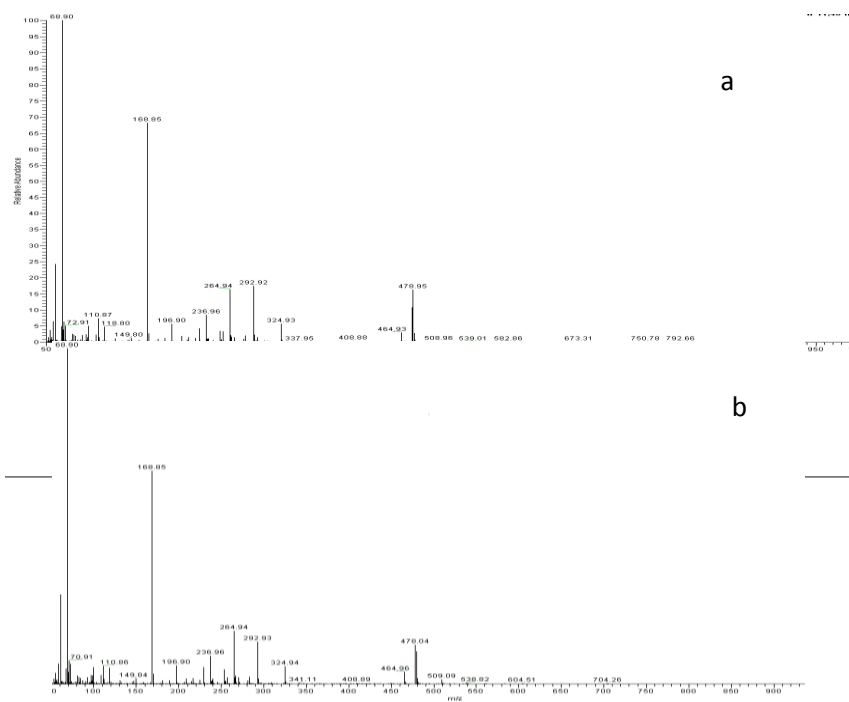


Figure 55: Spectre MS-EI du pentose. a: spectre de l'Ara b: spectre du Xyl

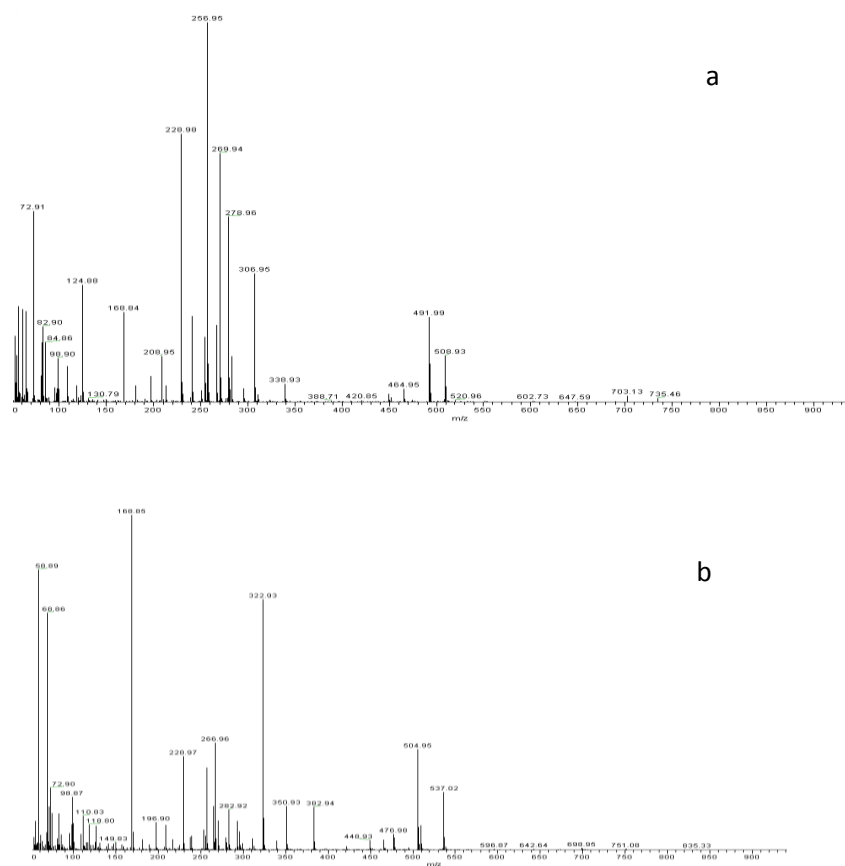


Figure 56: Spectre MS-EI des acides uroniques

Ces spectres indiquent la présence du galactose, de l'arabinose, du rhamnose, du xylose, du mannose et des acides uroniques notamment l'acide glucuronique (figure 56a) et acide galacturonique (figure 56b)

La présence des hexosamines a été également recherchée (figure 57). Pour évaluer la présence effective du GlcNAc et du ManNAc les spectres de masse en impact d'électron de l'extrait ont été comparés avec ceux des standards GlcNAc et ManAc.

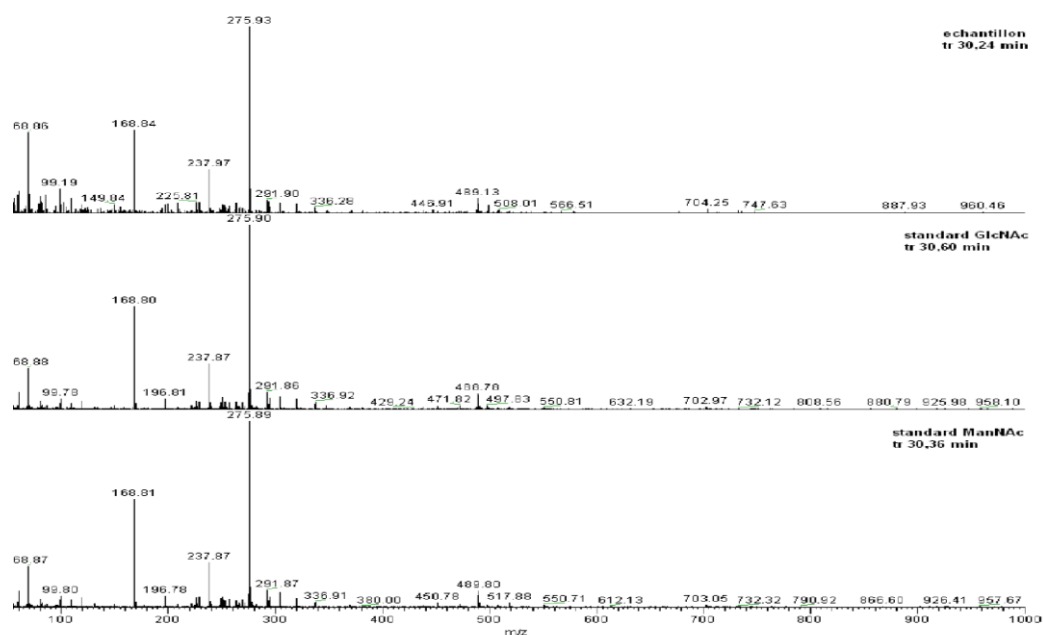


Figure 57: Comparaison des Spectres MS-EI de l'extrait et des standards ManNAc et GlcNAc

La figure 57 montre les spectres du pic élué à 30,24 min de l'extrait purifié de *B. aegyptiaca*. Ce spectre indique la présence du GlcNAc ou du ManNAc. Il n'est pas possible de différencier ces deux N-Acétyl hexosamines dérivées en HFB à partir de leurs spectres de masse très similaires, même en s'intéressant aux intensités relatives de certains massifs isotopiques ou en les fragmentant. Pour pouvoir caractériser avec certitude ce pic, il faudrait dériver l'échantillon avec une autre méthode telle que triméthylsilyl (TMS) ou itol-acétate, ce qui permettrait de les différencier. Cependant, il n'a pas été possible de vérifier la présence ou l'absence de GlcNAc.

Les protéines coagulantes étudiées sont des glycoprotéines portant du mannose et du fucose d'après les études effectuées avec les lectines spécifiques. Cependant, la présence du GlcNAc n'ayant pas été confirmée, l'abondance du galactose et le peu de références bibliographiques dans le domaine, ne nous permettent pas d'avancer d'hypothèses sur les détails de la structure des glycanes portés par ces protéines.

Conclusion partielle

Une synthèse des résultats obtenus (tableau 21) montre que dans l'extrait des fruits de *B. aegyptiaca* nous avons 2 protéases ayant des mécanismes d'action différents:

- une protéase de type Aspartique-protéase de masse moléculaire 38 kDa qui quelquefois est liée à la bande de 43 kDa
- une protéase de type Sérine-protéase constituée des bandes de 28, 70 et 85 kDa.

Le travail effectué jusqu'ici ne nous a pas permis d'aller plus loin dans la purification de ces deux protéases. Ainsi, il serait intéressant de continuer ce travail dans la perspective de séparer et de caractériser davantage les protéases contenues dans cet extrait coagulant.

Tableau 21: Récapitulatif des caractéristiques des protéases

Bandes	Purification	pH opt	pI	Activité enzymatique	Inhibition	Séquence peptidique	Structure glycanique
Protéase de type aspartique							
38 kDa	-Echange d'ions Q-Sepharose pH 7,6 et 8,1 -Affinité sur ConA-Sepharose à pH 6	5,5	5,2 et 5,5	-Gélatine à pH 5 -Hydrolyse caséines α , β , κ -Hydrolyse substrat à acide aspartique (H-Pro-Thr-Glu-Phe-para(NO ₂)-Phe-Arg-Leu-OH)	pepstatine (100 %)	9 AA, séquence aspartique de <i>Pisum sativum</i>	Mannose et fucose
43 kDa	-Echange d'ions Q-Sepharose pH 7,6 et 8,1		ND			ND	ND
Protéase de type sérine-protéase							
28 kDa	-Echange d'ions Q-Sepharose pH 7,6 et 8,1		4,55; 4,8; 5,4	-Gélatine à pH 5 et 7		13 AA, séquence sérine de <i>Oryza sativa</i>	Fucose
70 kDa	-Echange d'ions Q-Sepharose pH 7,6 et 8,1 -Chromatographie d'exclusion sur Superdex 75 à pH 8,1	7,5	ND	-Hydrolyse caséines α , β , κ -Hydrolyse Succinyl-dialanyl-prolyl-phenylalanyl-p-nitroanilide (N-Suc-Ala ₂ -Pro-Phe-pNa)	PMSF (100 %)	15 AA séquence sérine d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	Fucose
85 kDa	-Echange d'ions Q-Sepharose pH 7,6 et 8,1			- Type « chymotrypsine-like »		-13 AA, séquence sérine de <i>ricinus communis</i> -15 AA, séquence sérine de <i>Vitis vinifera</i>	ND

ND: Non déterminé

2^{ème} partie

APPLICATION EN FROMAGERIE

Dans le but de produire un extrait directement utilisable en fromagerie, des fruits de *B. aegyptiaca* ont été mis à macérer dans du NaCl 5 %. Le choix du NaCl se base sur les travaux antérieurs de certains auteurs qui ont montré que le NaCl permet d'améliorer l'extraction et l'activité coagulante de l'extrait de *Solanum dubium* (Yousif *et coll.*, 1996); Mohamed Ahmed *et coll.*, 2010). Pour la fabrication des fromages, le lait est souvent pasteurisé pour éliminer toute contamination. Afin que l'extrait de *B. aegyptiaca* soit un ingrédient en fromagerie, sa charge microbienne doit être maîtrisée. C'est ainsi que l'assainissement de l'extrait avant son utilisation comme agent coagulant revêt une importance technologique et alimentaire (Florez *et coll.*, 2006).

L'utilisation des extraits coagulants d'origine végétale en fromagerie peut être un élément fondamental pour amplifier la production fromagère en Afrique au sud du Sahara en général et au Cameroun en particulier. La présure est l'extrait communément utilisé pour la fabrication des fromages dans le monde, mais sa disponibilité et les contraintes liées à sa production, à son importation et à sa conservation au Cameroun demeurent une limite à son utilisation. Les extraits végétaux coagulants ont montré des potentialités coagulantes et peuvent être utilisés en fromagerie en remplacement de la présure. Les fromages produits grâce à ces extraits peuvent contribuer à combler le déficit en apport protéique chez les populations de l'Afrique au sud du Sahara (Silva et Malcata, 2005). Cependant, la majorité des extraits végétaux ont souvent montré une inadéquation dans la technologie fromagère car le produit obtenu présente un goût amer et une texture pâteuse (Roseiro *et coll.*, 2003). Ces paramètres sensoriels limitent l'acceptabilité de ces fromages par une catégorie de consommateurs. Lors de cette étude, les essais de fabrication des fromages ont été réalisés avec l'extrait de *B. aegyptiaca* comme enzyme coagulante en remplacement de la présure. Des études rhéologiques ont été menées pour apprécier le comportement textural du fromage fabriqué avec l'extrait en comparaison avec celui obtenu avec la présure. Les fromages obtenus ont été aromatisés avec les arômes végétales extraites de *Zingiber officinalis* (gingembre) et d'*Ocimum gratissimum* appelés localement "djindja" et "messepe" respectivement. Des analyses sensorielles ont été effectuées pour tester l'effet de l'aromatisation sur l'acceptabilité de ces fromages.

1-CARACTERISATION MICROBIOLOGIQUE ET ASSAINISSEMENT DE L'EXTRAIT

1.1-Caractérisation microbiologique de l'extrait

Le contrôle microbiologique de l'extrait de *B. aegyptiaca* a été effectué avant de l'utiliser comme coagulant en fromagerie. En effet, la qualité alimentaire et commerciale d'un fromage est tributaire de son hygiène microbiologique. Les analyses ont été faites en se basant sur les critères microbiologiques d'un fromage à base de lait thermisé suivant le règlement (CE) n° 2073/2005 du 15 novembre 2005 applicable dans la zone de la communauté européenne. La qualité microbiologique d'un fromage est très corrélée à la qualité microbiologique de l'extrait coagulant. C'est ainsi que la flore totale, les coliformes totaux et des germes spécifiques comme *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* (Salmonelles totales) et *Listeria monocytogenes* de l'extrait de *B. aegyptiaca* ont été recherchés et dénombrés sur la base des critères microbiologiques de la communauté européenne (tableau 22).

Tableau 22: Caractéristiques microbiologiques de l'extrait de *B. aegyptiaca*

Caractéristiques Microbiologiques	Contamination de l'extrait brut (ufc.mL ⁻¹)	Critères microbiologiques d'un fromage à base de lait thermisé
Coliformes totaux	4x10 ³	10 ² ufc.g ⁻¹ (<i>E. coli</i>)
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 10	10 ² ufc.g ⁻¹ (Staphylocoques à coagulase +)
<i>Salmonella</i>	Absence dans 10 mL	Absence dans 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 10 mL	Absence dans 25 g

ufc= unité formant colonies

L'analyse des résultats du Tableau 22 montre que dans 10 mL d'extrait, les bactéries de type Salmonelles et *Listeria monocytogenes* sont absentes. Ce volume d'extrait brut permet en effet d'obtenir 25 g de fromage (résultat discuté dans la partie fabrication fromagère). Par conséquent, ces résultats sont conformes aux critères microbiologiques qui précisent l'absence de ces deux bactéries dans 25 g de fromages.

Avec *Staphylococcus aureus*, moins de 10 cellules par millilitre ont été dénombrées soit au maximum 4 ufc de *Staphylococcus aureus* par gramme de fromage. Ce taux est très inférieur à la limite maximale de 10² ufc.g⁻¹ déterminée par les critères microbiologiques.

Par contre, la concentration en coliformes est de 4×10^3 ufc.mL⁻¹. Ce taux correspond à $1,6 \times 10^3$ ufc.g⁻¹ de fromage, ce qui est très supérieur à la valeur préconisée par les normes microbiologiques qui recommandent une concentration maximale de 10^2 ufc.g⁻¹ pour *E. coli*. Dans ces conditions, il n'est pas envisageable d'utiliser l'extrait tel quel.

La présence d'*E. coli* dans l'extrait de *B. aegyptiaca* est très certainement due aux contaminations par les déjections fécales des animaux et des hommes. En effet, l'arbre du *B. aegyptiaca* se développe dans un environnement de savane et de sahel très propice à l'élevage bovin. Les fruits arrivés à maturité tombent au sol et sont en contact avec des poussières contenant des déjections fécales principalement animales. Baumer (1995) souligne que les feuilles et jeunes rameaux de *B. aegyptiaca* sont très consommés par les vaches et Tubiana (1993) précise que la présence de cet arbre dans un milieu indique le surpâturage. D'autre part, les notions d'hygiène sont mal assimilées par les bergers et les populations des campements de savane et de sahel qui récoltent ces graines et les acheminent vers les marchés locaux. De plus, certains fruits utilisés pour l'obtention de cet extrait enzymatique présentaient un épicarpe cassé, ce qui a très certainement eu comme conséquence, une forte contamination du mésocarpe, siège de l'activité enzymatique. Ainsi, il est certainement préférable de trier les fruits au préalable afin de n'utiliser que des fruits intacts.

1.2 - Assainissement de l'extrait

Pour réduire le risque de contamination par *E. coli*, deux méthodes d'assainissement du fruit ont été utilisées. L'une des méthodes a consisté à effectuer un traitement thermique sur les graines avant leur utilisation. Ce traitement a été très efficace sur l'aspect microbiologique car l'extrait a été totalement assaini, mais l'activité enzymatique a été totalement perdue. Dans l'optique de procéder à l'assainissement tout en conservant l'activité coagulante de l'extrait, des filtres stérilisants (*Sartorius*, 0,22µm) ont été utilisés. Ici, l'assainissement a été complet et l'activité de l'enzyme a été préservée. Cependant, ce résultat bien que positif pose un problème. De fait, les filtres stérilisants sont très chers pour les fermiers africains. S'ils sont utilisés le prix de revient du produit final deviendrait très coûteux pour le consommateur.

Pour lever cette contrainte, l'assainissement à l'eau de javel et au métabisulfite de sodium a été utilisé par une application directe sur *E. coli* ou sur des graines fortement contaminées par cette même bactérie.

- **Traitement bactéricide sur *E. coli***

Des tests d'efficacité pour la destruction des coliformes (*E. coli* à 10^5 ufc.mL⁻¹) par le métabisulfite de sodium et l'eau de javel ont été effectués en tubes et les résultats sont présentés dans le Tableau 23. Les concentrations de 75, 150 et 300 ppm (dans le milieu réactionnel final)

utilisées pour ces deux bactéricides permettent de les considérer comme des agents désinfectants régulièrement employés pour la décontamination des végétaux (Fukuyama *et coll.*, 2009). Ils sont aussi considérés comme agents antibactériens de préservation alimentaire dans les industries de par leurs propriétés réductrices.

Tableau 23: Effet du métabisulfite de sodium et de l'eau de javel sur *E. coli*

Type de traitement	Concentration (ppm)	Temps de contact traitement- <i>E.coli</i> (min)	Coliformes (ufc.mL ⁻¹)	Décontamination (%)
Métabisulfite de Sodium	75	5	10 ⁵	0
		15		0
	150	5	10 ⁵	0
		15		0
	300	5	10 ⁵	0
		15		0
	75	5	10 ⁵	0
		15	0	100
Eau de javel	150	5	60	99,9
		15	0	100
	300	5	0	100
		15	0	100
	Témoin		10 ⁵	

Légende: ppm= partie par million, ufc= unité formant colonie

Le tableau 23 montre que le traitement au métabisulfite de sodium est inefficace sur *E. coli*. En effet, ce désinfectant a donné un taux de décontamination de 0 %. En revanche, le traitement à l'eau de javel est très efficace à des concentrations allant de 75 à 300 ppm. C'est ainsi que l'extrait a été complètement décontaminé à 75 ppm pendant 15 min de contact.

- **Traitement bactéricide sur des graines fortement contaminées par *E. coli***

Le traitement effectué directement sur *E. coli* s'étant révélé efficace avec de l'eau de javel, 4 lots de graines intactes (4 fruits par lot) ont été contaminés en les immergeant dans 100 mL d'une suspension cellulaire d'*E. coli* à 10⁶ ufc.mL⁻¹. Les graines contaminées ont été utilisées pour simuler les conditions réelles. Après un contact de 1 heure avec *E. coli*, les graines ont été prélevées

et ensuite rincées dans de l'eau stérile pendant 15 minutes. Ces graines débarrassées de leur épicarpe ont été macérées dans 5 % de NaCl. L'eau de rinçage et l'extrait brut résultant de la macération ont été analysés pour rechercher et dénombrer les coliformes (tableau 24).

Tableau 24: Effet de l'eau de javel sur les graines contaminées

Type de traitement sur les graines entières	Nombres de coliformes (<i>E. coli</i>) (ufc.mL ⁻¹)	
	Eau de rinçage des graines	Extrait brut
Pas de rinçage	-	6
Rinçage à l'eau stérile	138	0
Eau de javel à 75 ppm	0	0
Eau de javel à 150 ppm	0	0

Le tableau 24 confirme l'efficacité de l'eau de javel pour l'assainissement microbienne. Après un contact de 15 min avec seulement 75 ppm d'eau de javel, aucune colonie n'a été dénombrée dans l'eau de rinçage des graines et dans l'extrait après macération. L'eau de javel est ainsi une alternative sérieuse dans la mise au point d'un extrait végétal coagulant sain et propre. Il faut relever que ce traitement s'applique uniquement à la surface du fruit précisément sur l'épicarpe. Libouga *et coll.* (2006) ont montré que le mésocarpe est la partie du fruit contenant le principe actif coagulant. Ces résultats indiquent également que le rinçage abondant à l'eau potable est déjà très important car 138 ufc.mL⁻¹ sont dénombrées dans l'eau de rinçage des graines, alors qu'aucune colonie dans l'extrait obtenu après macération. Ainsi, un simple lavage ou rinçage des échantillons contaminés est efficace pour réduire la contamination par des coliformes. En effet, lors de la contamination du fruit, il est peu probable que les microorganismes traversent la coque dure (épicarpe) pour atteindre le mésocarpe utilisé pour la préparation de l'extrait. Par ailleurs, après macération des fruits n'ayant subi aucun rinçage, 6 ufc.mL⁻¹ ont été dénombrés dans l'extrait enzymatique. Bien que cette valeur soit faible, il est néanmoins préférable que l'extrait enzymatique utilisé pour la fabrication fromagère soit exempt de coliformes.

En récapitulant ces résultats, il peut être recommandé au minimum de simplement laver les fruits avant toute utilisation. Cependant, la combinaison lavage-assainissement des fruits doit être préconisée pour obtenir un extrait enzymatique microbiologiquement propre. Traités comme tel, les fruits de *B. aegyptiaca* représentent une source intéressante pour la préparation des extraits coagulants utilisable en technologie fromagère.

2 - FABRICATION DES FROMAGES

L'extrait enzymatique de *B. aegyptiaca* a fait coaguler le lait de zébu. Le coagulum blanc obtenu est comparé à celui obtenu avec la présure dans les mêmes conditions (figure 58).



Figure 58: Coagulum obtenus avec la présure et l'extrait végétal

Ce coagulum est un indicateur intéressant pour l'applicabilité de l'extrait de *B. aegyptiaca* en fromagerie. Le tableau 25 donne quelques caractéristiques des fromages.

Tout d'abord, 1L de lait entier coagulé par la présure a donné 403 g de fromage frais, alors qu'avec l'extrait de *B. aegyptiaca*, seulement 377 g de fromage frais sont obtenus. L'extrait sec total de $257,5 \text{ g.kg}^{-1}$ a été obtenu avec la présure contre $237,5 \text{ g.kg}^{-1}$ pour l'extrait de *B. aegyptiaca*. Les rendements fromagers bruts et secs avec la présure étaient respectivement de 39,9 % et 68,7 %, alors qu'avec l'extrait de *B. aegyptiaca* ils étaient de 37,3 % et 59,3 %. Ces rendements fromagers corroborent ceux obtenus avec les extraits coagulants des plantes. Cela s'explique par le fait que les extraits enzymatiques d'origine végétale possèdent une activité protéolytique très importante aboutissant généralement à des faibles rendements fromagers (Roseiro *et coll.*, 2003). Le rendement fromager est un facteur économique très important dans la production des fromages. C'est lui qui détermine la capacité marchande du produit. La matière grasse du fromage à l'extrait était plus élevée ($137 \pm 25 \text{ g.kg}^{-1}$) que celle du fromage à la présure ($123 \pm 20 \text{ g.kg}^{-1}$). Des observations sur la teneur élevée en matière grasse ont été rapportées par Osman Kheir *et coll.* (2011) pour les fromages obtenus avec les extraits de *Solanum dubium* et par Mohamed et O'Conner (1996) avec *Calotropis procera*.

Tableau 25: Caractéristiques des fromages

Caractéristiques	Fromage (présure)	Fromage (extrait végétal)
Masse de fromage pour 1l de lait (g)	403	377
Extrait sec total (g.kg ⁻¹)	257,5	237,5
Rendements fromagers bruts	39,9 %	37,3 %
Rendements matière sèche	68,7 %	59,3 %
Matières grasses (g. kg ⁻¹)	123 ± 20	137 ± 25

L'extrait de *B. aegyptiaca* a donné des fromages différents de ceux obtenus à la présure toutefois les deux produits restent comparables.

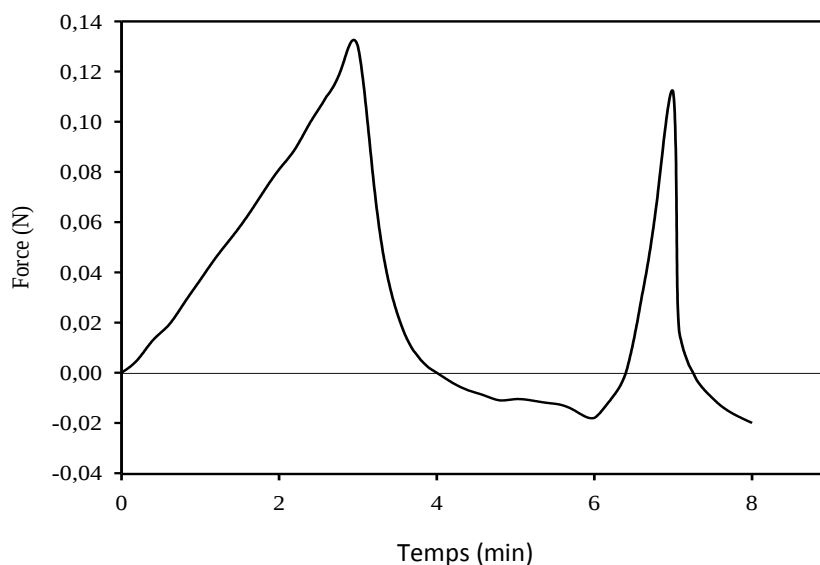
3- PROPRIETES TEXTURALES DES FROMAGES

Les fromages obtenus avec *B. aegyptiaca* comme extrait coagulant ont été soumis à une analyse instrumentale pour les propriétés texturales essentielles.

Les fromages ont été obtenus après coagulation du lait à 35 °C. Le coagulum s'est formé au bout de 4 h. Une équilibration à température ambiante a été effectuée pendant au moins 2 h. Pour comparer les deux fromages (coagulum présure et coagulum extrait végétal), les différents échantillons ont été soumis au test Texture Profile Analyser (TPA). Les analyses de texture en TPA utilisent un test universel à l'aide d'une machine qui s'apparente à la mastication des aliments par l'utilisation de grands cisaillements destructifs dans la cavité buccale (Van Hekken *et coll.*, 2004).

La figure 59 présente des courbes typiques de force-temps pour les échantillons de ces deux fromages obtenus à partir de ce test. La durée totale de l'essai est de 8 min. La première partie de la courbe correspond à la phase de compression lente (3 min) qui permet de visualiser l'homogénéité du fromage. Après la phase de décompression, une deuxième pression rapide est exercée pour montrer l'élasticité du fromage.

a) présure



b) extrait végétal

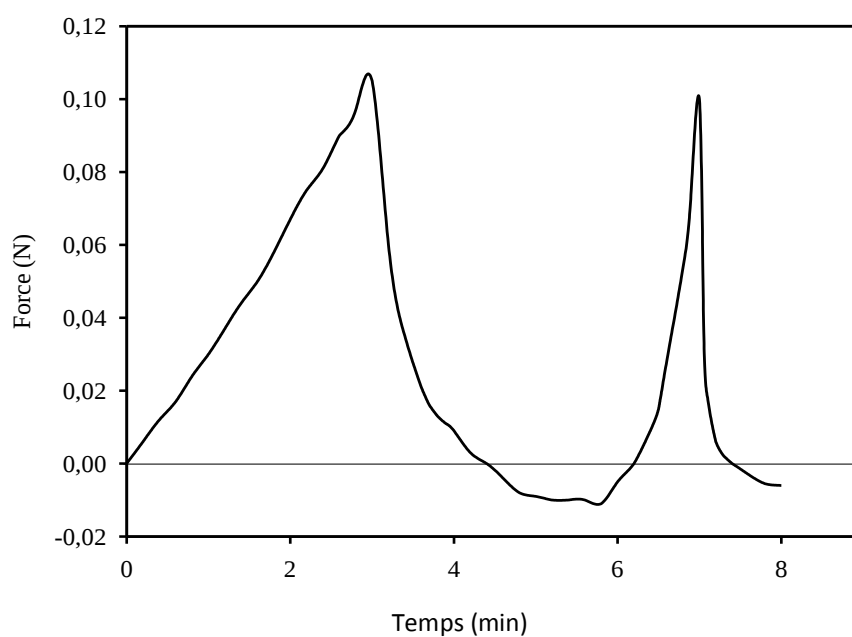


Figure 59: Profils obtenus lors du test TPA sur des fromages

Les profils obtenus pour les deux fromages sont très semblables et ne diffèrent pas des profils habituels des fromages. Lors de la phase de compression, aucune rupture de pente n'a été observée pour les deux fromages pendant les essais de ce test. Ceci indique que les fromages ont une texture homogène qui ne change pas au cours du test. La valeur nulle obtenue pour la fracturabilité confirme ce résultat (tableau 26).

Le tableau 26 présente les paramètres de texture des deux fromages, dérivés du test TPA. Les résultats obtenus montrent que les paramètres du fromage à l'extrait végétal sont également très semblables au fromage obtenu par la présure.

Tableau 26: Propriétés rhéologiques et texturales des fromages

Paramètres rhéologiques	Fromage (présure)	Fromage (extrait végétal)
Fracturabilité	absence	absence
Dureté (N)	0,130	0,105
Module de Young (Pa)	$3,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$
Force maximale d'adhésion (N)	0,020	0,012
Adhésivité (J)	$6,9 \times 10^{-8}$	$7,1 \times 10^{-8}$
Elasticité (-)	0,78	0,83

Légende: N= Newton, J= Joule, Pa=Pascal

Les valeurs basses de la dureté (la force nécessaire pour obtenir une déformation donnée, 40 % dans la présente étude) montrent que les deux fromages sont des pâtes molles. La dureté des fromages obtenus est inférieure à celle rapportée par Piska et Stetina (2004) pour le même type de fromage. Les valeurs obtenues (0,130 N et 0,105 N respectivement pour les fromages à la présure et à l'extrait végétal) sont de deux à trois ordres de grandeur plus faibles que la dureté d'autres types de fromages (Dimitreli et Thomareis, 2007; Blazquez *et coll.*, 2006), notamment les fromages fondus (Kealy, 2006), la mozzarella (Tunick, 2000; Van Hekken *et coll.*, 2007) et le cheddar (Chevanan *et coll.*, 2006). Park (2007) mentionnent que des essais de TPA peuvent être considérés comme empiriques. En effet, il n'y a pas de correction pour les modifications de la forme de l'échantillon. Le test TPA n'est pas très approprié pour les mesures des propriétés rhéologiques mais est très efficace pour comparer deux échantillons (Tunick et Van Hekken, 2002).

Les valeurs de la dureté et le module de Young (module d'élasticité) indiquent que le fromage obtenu avec l'extrait végétal est légèrement moins rigide que le fromage obtenu avec la présure. Il est à noter que la différence entre les deux modules de Young est en accord avec la variation de la matière sèche des deux fromages. Le fromage à la présure, le plus sec (68,7 %) est aussi le plus dur (0,130N) alors que le fromage à l'extrait de *B. aegyptiaca*, moins sec (59,3 %) est le moins résistant (0,105N).

Les valeurs de l'adhésion des deux fromages à la sonde sont assez faibles et moins fermes, mais la force maximale d'adhésion du fromage à la présure est supérieure au fromage à l'extrait végétal. L'adhésion est le travail nécessaire pour retirer la sonde de l'échantillon après avoir

appliqué une force de compression sur le fromage. C'est la partie descendante du premier pic (figure 59).

L'élasticité est une mesure du rétablissement de la forme initiale du fromage déformé après l'application d'une force de compression (Tunick, 2000; Chevanan *et coll.*, 2006). Le fait que la hauteur du deuxième pic de compression soit équivalente au premier pic, montre que les fromages ont plus ou moins repris leur forme entre les deux compressions. Les fromages obtenus ont donc un comportement élastique identique. Leur élasticité d'environ 0,8 est très proche de celles rapportées pour le cheddar (0,75-0,85) mais supérieur à celle de la mozzarella (0,6-0,7), des fromages fondus (0,3-0,6) ou d'autres types de fromages (0,3) (Chevanan *et coll.*, 2006; Van Hekken *et coll.*, 2007; Kealy, 2007; Blazquez *et coll.*, 2006).

Ainsi, le fromage obtenu avec l'extrait de *Balanites aegyptiaca* correspond tout à fait au fromage standard obtenu à la présure. Ce résultat montre un fort potentiel d'utilisation de cet extrait comme une véritable alternative à la présure.

4- AROMATISATION, DEGUSTATION ET ANALYSE SENSORIELLE

L'appréciation reste un facteur essentiel pour la vulgarisation d'un produit qui n'est pas ancré dans les habitudes alimentaires d'une population. C'est ainsi que les fromages obtenus avec l'extrait de *B. aegyptiaca* ont été soumis à un jury pour déterminer leur acceptabilité.

Les fromages ont été soumis à un groupe de 130 dégustateurs de caractéristiques socio-culturelles différentes. La région d'origine, le sexe, la nationalité et la profession des dégustateurs ont été considérés. Ainsi, les fromages à l'extrait végétal ont été aromatisés et comparés à ceux de la présure selon les paramètres hédoniques suivants: le goût, la texture, la couleur et l'arôme. L'appréciation générale du produit a été également donnée par ces dégustateurs.

Les huiles essentielles utilisées comme arômes proviennent de deux condiments couramment ajoutés dans l'art culinaire local. Il s'agit du *Z. officinalis* (gingembre ou "djindja") et d'*O. gratissimum* ("messep"). Le premier aromatiser souvent les boissons, les sauces et les gâteaux, alors que le second est très utilisé pour chasser les fortes odeurs de certaines viandes et poissons.

Les 5 fromages soumis aux dégustateurs étaient les suivants:

F1=fromage FBO (fromage aromatisé à l'*O. gratissimum*),

F2=fromage P (fromage à la présure),

F3=fromage FBOZ (fromage aromatisé à l'*O. gratissimum* et au *Z. officinalis*),

F4=fromage FBZ (fromage aromatisé au *Z. officinalis*),

F5=fromage FB (fromage non aromatisé).

La figure 60 montre la préférence générale des fromages en fonction des paramètres hédoniques et de l'appréciation générale. Il ressort que l'aromatisation des fromages a eu un impact sur l'appréciation des dégustateurs. En effet, le fromage aromatisé au "djindja" est mieux apprécié que le fromage à la présure suivi respectivement par les fromages à l'extrait végétal non aromatisés, puis par les fromages aromatisés aux deux arômes ("messep" et "djindja") et enfin par les fromages aromatisés au "messep".

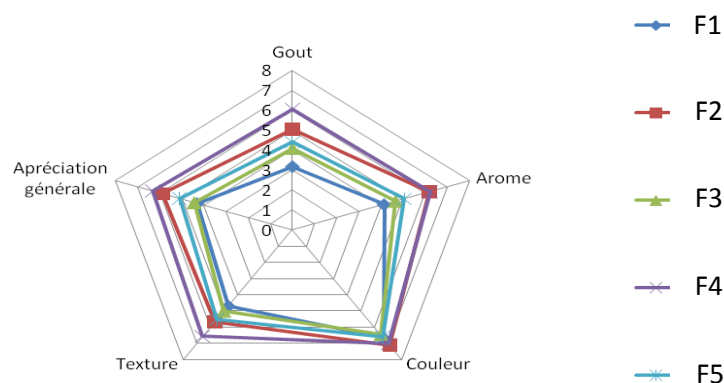


Figure 60: Préférence générale des fromages

F1=fromage FBO (fromage aromatisé à l'*O. gratissimum*), F2=fromage P (fromage à la présure), F3=fromage FBOZ (fromage aromatisé à l'*O. gratissimum* et au *Z. officinalis*), F4=fromage FBZ (fromage aromatisé au *Z. officinalis*), F5=fromage FB (fromage non aromatisé).

La classification de Duncan montre que les paramètres hédoniques varient d'un fromage à l'autre (tableau 27). Ces paramètres hédoniques ont été attribués à partir d'une échelle de notation de 1 à 9 points et les scores ont été déterminés à partir des moyennes obtenues après analyse sur Statgraphics plus et Xlstat.

Tableau 27: Acceptabilité des fromages

Paramètres sensoriels	Goût	Arôme	Couleur	Texture	Appréciation générale
Types de fromages					
F1	3,18 ± 1,97 ^a	4,14 ± 2,09 ^a	6,64 ± 1,91 ^a	4,69 ± 2,11 ^a	4,31 ± 2,32 ^a
F2	5,04 ± 1,67 ^b	6,16 ± 1,81 ^c	7,12 ± 1,38 ^b	5,67 ± 1,91 ^b	5,88 ± 1,84 ^c
F3	4,11 ± 2,11 ^b	4,66 ± 2,14 ^b	6,47 ± 1,72 ^a	5,02 ± 2,00 ^a	4,42 ± 1,86 ^a
F4	6,04 ± 1,97 ^c	6,22 ± 1,71 ^c	7,04 ± 1,47 ^b	6,58 ± 1,95 ^c	6,31 ± 2,07 ^c
F5	4,40 ± 2,17 ^b	5,05 ± 2,05 ^b	6,60 ± 1,57 ^a	5,52 ± 2,07 ^b	5,10 ± 2,16 ^b

Les valeurs dans la même colonne ayant les mêmes lettres en exposant (a, b, c) ne sont pas significativement différents au seuil de 5 %. F1=fromage FBO (fromage aromatisé à l'*O.*

gratissimum), F2=fromage P (fromage à la présure), F3=fromage FBOZ (fromage aromatisé à l'O. *gratissimum* et au *Z. officinalis*), F4=fromage FBZ (fromage arômatisé au *Z. officinalis*), F5=fromage FB (fromage non arômatisé).

L'appréciation du goût des fromages indique que le fromage aromatisé au djindja a le score le plus élevé ($6,04 \pm 1,97$). Il existe une différence statistiquement significative ($P < 0,05$) entre le fromage aromatisé au djindja et le fromage à la présure ($5,04 \pm 1,67$). Les fromages respectivement aromatisés avec la combinaison messep-djindja et non aromatisés ne sont pas statistiquement différents avec le fromage présure en termes de goût.

En ce qui concerne l'arôme, les dégustateurs n'ont pas trouvé de différence statistiquement significative entre les fromages présure et ceux aromatisés au djindja. La même observation est faite entre les fromages non aromatisés et ceux aromatisés par la combinaison djindja-messep. Les dégustateurs ont attribués le meilleur score ($6,22 \pm 1,71$) au fromage aromatisé au djindja.

La couleur du fromage présure n'est pas statistiquement différente ($P > 0,05$) de celle du fromage aromatisé au djindja. Par contre, il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre le fromage non aromatisé et le fromage présure. En effet celui-ci a obtenu le score le plus élevé ($7,12 \pm 1,38$).

Le meilleur score de la texture a été donné au fromage aromatisé avec le djindja ($6,58 \pm 1,95$). Le fromage à la présure et le fromage non aromatisé ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$). Pourtant, la différence est significative ($P < 0,05$) entre le fromage présure et le fromage aromatisé au djindja.

L'acceptabilité générale ne montre pas une différence significative ($p > 0,05$) entre les fromages présure et les fromages aromatisés au djindja.

En conclusion, l'utilisation de l'extrait purifié de *B. aegyptiaca* pour la coagulation du lait et l'aromatisation des coagulums obtenus par les huiles essentielles du djindja (gingembre) représentent la meilleure réponse combinée pour le remplacement de la présure.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La production de la présure au Cameroun est pratiquement impossible car la loi protégeant le cheptel interdit l'abattage des jeunes ruminants. Dans le cadre de la recherche d'un succédané, les fruits de *B. aegyptiaca* ont été utilisés. Pour préparer l'extrait coagulant à partir des fruits de *B. aegyptiaca*, la pulpe de ces fruits a été macérée dans une solution de NaCl 5 %, puis assainie. Cette préparation enzymatique a été concentrée, clarifiée par le charbon actif et par diafiltration, chromatographiée par échanges d'ions, gel filtration et affinité. Les essais de fabrication des fromages ont été réalisés avec cet extrait. Des comparaisons concernant quelques caractéristiques physico-chimiques, sensorielles et rhéologiques ont été effectuées entre ces fromages et ceux préparés avec la présure.

Dans la limite des essais menés lors de cette étude, les observations ci-après ont été faites:

- La solution 5 % de NaCl s'est avérée être le meilleur milieu d'extraction des protéases issues de la pulpe de fruits de *B. aegyptiaca*. Le lavage abondant à l'eau stérile d'une part et l'utilisation d'une solution d'eau de javel à une concentration de 75 ppm pendant 15 min d'autre part permettent d'assainir le fruit et d'obtenir un extrait conforme aux prescriptions des critères microbiologiques (CE) n° 2073/2005 du 15 novembre 2005 applicable dans la zone de la communauté européenne.

- L'utilisation du charbon actif en milieu acide a permis de clarifier l'extrait tout en conservant son activité coagulante, alors qu'en milieu basique, l'ultrafiltration a donné le même résultat.

- Une protéase de 38 kDa a été isolée en milieu acide et trois protéases de 28, 70 et 85 kDa en milieu basique. Les tests sur les inhibiteurs, les analyses en MALDI-TOF couplée à la LC-MS et la digestion du gel de gélatine montrent que la protéase isolée en milieu acide est une aspartique tandis que celles isolées en milieu basique sont des protéases à sérine. Ces protéases isolées sont capables d'hydrolyser les caséines alpha, beta et kappa.

- Les protéases isolées des fruits de *B. aegyptiaca* sont des glycoprotéines. L'analyse par les lectines montre que la partie glycosylée de ces protéases est constituée majoritairement du mannose et du fucose. Les analyses sur GC/FID et GC/MS-EI montrent que la partie glycosylée est constituée plutôt des monosaccharides tels que le galactose, l'arabinose, le rhamnose, le xylose, le mannose, l'acide glucuronique et les N-Acétyl hexosamines.

- La teneur en matière grasse du fromage au *B. aegyptiaca* est plus élevée que celle du fromage présure; de même, le rendement fromager du fromage présure est supérieur à celui du fromage au *B. aegyptiaca*. Toutefois, de l'extrait végétal à la présure ces résultats sont comparables par rapport à ces caractéristiques physico-chimiques.

- Le goût et la texture des fromages obtenus avec l'extrait de *B. aegyptiaca* ne sont pas significativement différents des fromages « présure ». L'aromatisation au djindja est un exhausteur de goût des fromages à l'extrait végétal, c'est ainsi qu'il est significativement différent du fromage « présure ».

- L'arôme et la couleur des fromages obtenus avec l'extrait végétal sont significativement différents des fromages « présure ». Cependant, les fromages aromatisés au djindja ne sont pas significativement différents des fromages « présure ».

- L'acceptabilité générale résume l'appréciation des dégustateurs, c'est ainsi qu'elle a été significativement différente entre les fromages à l'extrait végétal et les fromages « présure ». Toutefois, l'aromatisation au djindja rattrape cette différence.

- Les paramètres texturaux comme la dureté, l'adhésivité et l'élasticité sont du même ordre de grandeur. Ainsi les fromages au *Balanites aegyptiaca* restent comparables au fromage « présure » sur le plan textural.

Cette étude ne prétend pas avoir abordé toutes les orientations scientifiques concernant les extraits de *Balanites aegyptiaca* comme succédané à la présure. C'est ainsi qu'en perspectives, il reste à aborder:

- La cinétique de protéolyse des extraits de *Balanites aegyptiaca* sur la caséine bovine, ovine et caprine comparés à celle de la présure afin de déterminer la vitesse d'hydrolyse de ces substrats intervenant dans la coagulation des différents laits.

- Le mécanisme d'action des protéases de *Balanites aegyptiaca* sur des substrats spécifiques comme l'insuline et l'hémoglobine pour déterminer la spécificité de la protéolyse et de prédire l'exploitation de cet extrait dans d'autres secteurs de la technologie alimentaire.

- La détermination de la séquence peptidique des protéases, ce qui représente la base pour la connaissance de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire.

- L'influence de la quantité de l'extrait de *Balanites aegyptiaca* sur les caractéristiques physico-chimiques, organoleptiques et microbiologiques du fromage pour la maîtrise des procédés de fabrication des fromages par les fermiers.

- Des méthodes de conservation de l'extrait pour améliorer sa stabilité, sa disponibilité et le rendre commercialisable.

- L'optimisation des conditions d'affinage du fromage au *Balanites aegyptiaca* pour améliorer la conservation et la maîtrise de la technologie.

- Une évaluation de l'intérêt économique de la fabrication des fromages avec l'extrait de *Balanites aegyptiaca* à l'échelle artisanale.

Toutefois, les résultats de ce travail montrent que l'extrait de *Balanites aegyptiaca* contient des protéases capables de remplacer la présure. La vulgarisation de cet extrait coagulant auprès des intervenants de la filière agro-pastorale devient un impératif pour la transformation et la conservation du lait de zébu pendant les périodes de forte production.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACDIC, 2006.** Rapport d'enquête sur les habitudes de consommation des produits alimentaires au Cameroun, mai 2006.
- Adetunji V. O., Alonge D. O., Singh R. K., Chen J., 2008.** Production of wara, a West African soft cheese using lemon juice as a coagulant. *Lebensmittel - Wissenschaft*, **41**, 331-336.
- Adrian J., 1973.** Valeur alimentaire du lait. La maison rustique, Paris pp 229.
- AFNOR (Association Française de normalisation), 1980.** Lait et produits laitiers – Méthodes d'analyses. Recueil des normes françaises, Afnor (Ed). Paris, France. pp. 21-80.
- Agabriel C., Coulon J. B., Journal C., Sibra C., Albouy H., 1999.** Variabilité des caractéristiques des fromages saint-nectaire fermiers: relations avec la composition du lait et les conditions de production. *Le Lait*, **79**, 291-302.
- Alais C., Linden G., 1997.** Laits et produits laitiers. Abrégé de biochimie alimentaire, Masson 4^{ième} édition. Paris, pp. 167-212.
- Alais C., 1975.** Principe des techniques laitières. *Science du lait*. La maison Rustique, Paris pp. 616-639.
- Anastasiou R., Aktypis A., Georgalaki M., Papadelli M., De Vuyst L., Tsakalidou E., 2009.** Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under conditions mimicking Kasseri cheese production and ripening. *International Dairy Journal*, **19**, 330-335.
- Antao C. M., Malcata F. X., 2005.** Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**, 637-650.
- Arima K., Yu J., Iwasaki S., 1970.** Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In *Methods in enzymology* (E. G. Pearlman, and L. Lorand (Eds.), New York: Academic Press, pp. 446-459.
- Arnold H. J., 1983.** The composition of milk. In *Fundamentals of dairy chemistry* (Webb B. H., Johnson A. H., Alford J. A. (Eds). Westport, pp. 1-57.
- Asakura T., Watanabe H., Abe K., Arai S., 1997.** Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization, and application to milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1070-1075.
- Asif-Ullah M., Kim K. S., Yu Y. G., 2006.** Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi. *Phytochemistry*, **67**, 870-875.
- Aworh O. C., Muller H. G., 1987.** Cheese-making properties of vegetable rennet from Sodom apple (*Calotropis procera*). *Food Chemistry*, **26**, 71-79.

- Aworh O. C., Nakai S., 1986.** Extraction of milk clotting enzyme from Sodom apple (*Calotropis procera*). *Journal of Food Science*, **51**, 1569-1570.
- Babweteera F., Savill P., Brown N., 2007.** "Balanites wilsonia: Regeneration with and without elephants". *Biological conservation*, **134**, 40-47.
- Banks J M., Roa I., Muir D. D., 1998.** Manipulation of the texture of low-fat cheddar using a plant protease extracted from *Cynara cardunculus*. *Australian Journal of Dairy Technology*, **53**, 105.
- Banon S., Hardy J., 1991.** Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection. *Journal of Dairy Research*, **58**, 75-84.
- Barbosa M, Valles E, Vassal L. Mocquot G., 1976.** L'utilisation d'extrait de *Cynara cardunculus* L. comme agent coagulant en fabrication de fromages à pâte molle et à pâte cuite. *Le Lait — Mémoires Originaux*, **551**, 1-17.
- Barbosa M., 1983.** O Cardo (*Cynara cardunculus*) como coagulante vegetal. *DTIA, no 9. Comunicações e Conferências-9, Lisboa*.
- Barbosa M., Corradini C., Battistotti B., 1981.** Cheesemaking experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from Cardo (*Cynara cardunculus* L.). *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, **32**, 203-221.
- Barros R. M., Ferreira C. A., Silva S. V., Malcata F. X., 2001.** Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought about by cardosins precipitated by ammonium sulfate. *Enzyme and Microbial Technology*, **29**, 541-547.
- Baumer M., 1995.** Arbres, arbustes et arbrisseaux nourriciers en Afrique Occidentale, Enda, Dakar, Sénégal. 260 p.
- Baumer M., 1997.** Agroforesterie et désertification. CTA, Wengeningen, 260 p.
- Blazquez C., Downey G., O'Callaghan D., Howard V., Delahunty C., Sheehan E., Everard C., O'Donnell C. P., 2006.** Modelling of sensory and instrumental texture parameters in processed cheese by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Research*, **73**, 58-69.
- Blum M., Cunningham A, Bendiner M., Hofmann T., 1985.** Penicillopepsin, the aspartic proteinase from *Penicillium janthinellum*: substrate-binding effects and intermediates in transpeptidation reactions. *Biochem. SOC. Trans*, **13**, 1044-1046.
- Bonfoh B., Zinsstag J., Farah Z., Simbé C. F., Alfaroukh I. O., Aebi R., Badertscher R., Collomb M., Meyer J., Rehberger B., 2005.** Raw milk composition of Malian Zebu cows (*Bos indicus*) raised under traditional system. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 29-38.
- Boutrou R, Mollé D., Léonil J., 2003.** C-terminal end of κ -casein is hydrolysed before renneting during soft cheese manufacture. *Le Lait*, **83**, 335-341.

- Bradford M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brulé G., Lenoir J., Remeuf F., 1997.** La micelle de caséine et la coagulation du lait, *In Le Fromage*, (Eck A., Gillis J.C. (Eds.), Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 7-41.
- Burnette W. N., 1981.** “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytic Biochemical*, **112**, 195-203.
- Cáceres Arriba P., Fernández Jiménez I., 2000.** Proceso de obtención de extractos en polvo de un coagulante de leche procedente de las flores del cardo *Cynara* sp. *Patente Espanhola ES 2 139 550 A1*.
- Caron A., St-Gelais D., Pouliot Y., 1997.** Coagulation of milk enriched with ultrafiltered or diafiltered microfiltered milk retentate powders. *International Dairy Journal*, **7**, 445.
- Cattaneo T M P, Nigro F, Messina G., Giangiacomo R., 1994.** Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Milchwissenschaft*, **49**, 269-272.
- Cayot P, Lorient D., 1998.** Structure et fonction des protéines du lait. Technique et documentation. Lavoisier, Paris, 363p.
- Chapagain B. P., Wiesman Z., 2005.** Larvicidal effects of aqueous extracts of *Balanites aegyptiaca* (desert date) against the larvae of *Culex pipiens* mosquitoes. *African Journal of Biotechnology*, **4**, 1351-1354.
- Chapagain B. P., Wiesman Z., 2007.** “Determination of saponins in the kernel cake of *Balanites aegyptiaca* by HPLC-ESI/MS”. *Phytochemistry Analytic*, **18**, 354-362.
- Chazarra S., Sidrach L., Lopez-Molina D., Rodriguez-Lopez J. N., 2007.** Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. *International Dairy Journal*, **17**, 1393-1400.
- Cheftel J. C., Cuq J. L., Lorient D., 1985.** Protéines alimentaires, biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimiques. Techniques et documentation Lavoisier, Paris, p. 38.
- Chevanan N., Muthukumarappan K., Upreti P., Metzger L. E., 2006.** Effect of calcium and phosphorus residual lactose and salt-to-moisture ratio on textural properties of cheddar cheese during ripening. *Journal of Texture Studies*, **37**, 711-730.
- Chitipityol S., Crabbe M. J. C., 1998.** Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, **61**, 395-418.
- Christen C., Virasoro E., 1935a** Présures végétales. Extraction et propriétés (1). *Le Lait—Mémoires Originaux*, 354-363.

- Christen C., Virasoro E., 1935b.** Présures végétales. Extraction et propriétés (fin). *Le Lait—Mémoires Originaux*, 496-505.
- Church F. C., Swaisgood H. E., Porter D. H., Catignani G. L., 1983.** Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, **66**, 1219-1227.
- Cordeiro M. C., Xue Z. T., Pais M. S., Brodelius P. E., 1993.** Proteases from cell suspension cultures of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, **33** (6), 1323-1326.
- Cordeiro M. C., Xue Z. T., Pietrzak M., Pais M. S., Brodelius P. E., 1994.** Isolation and characterization of an cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant Molecular Biology*, **24**, 733-741.
- Costa J., Ashford D. A., Nimtz M., Bento I., Frazao C., Esteves C. L., Faro C. J., Kervinen J., Pires E., Verissimo P., Wlodawer A., Carrondo M. A., 1997.** The glycosylation of the aspartic proteinases from barley (*Hordeum vulgare* L.) and cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *European Journal of Biochemistry*, **243**, 695-700.
- Coulon J. B., Gasqui P., Barnouin J., Ollier A., Pradel P., Pomiès D., 2002.** Effect of mastitis type and germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Animal Research*, **51**, 383-393.
- Curioni P. M. G., Bosset J. O., 2002.** Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, **12**, 959-984.
- Crosby W. H., Munn J. I., Furth F. W., 1954.** Standardizing a method for clinical hemoglobinometry. *U S Armed Forces Medical Journal*, **5**, 693-703.
- Crowley J. F., Goldstein I. J., Arnap J., Lönngren J., 1984.** Carbohydrate binding studies on lectin from *Datura stramonium* seeds. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, **231**, 524-533.
- Dalgleish D. G., 1993.** The enzymatic coagulation of milk, *In Cheese: Chemistry, physics and microbiology: General aspects*, Fox P.F. (Ed.), Vol. 1, , Chapman and Hall, London, pp. 69-100.
- Daviau C., Famelart M. H., Alice P., Goudédranche H., Maubois J. L., 2000.** Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: Effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Le Lait*, **80**, 397-415.
- Debray H., Montreuil J., 1989.** Aleuria Aurantia Agglutinin: a new isolation procedure and future study of its specificity towards various glycopeptides and oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, **185**, 15-26.
- Desmazeand M., Spinnler E., 1998.** Enzymes en agro-alimentaire. Lait et produits laitiers. Lavoisier, Paris, p. 336.

- Dimitreli G., Thomareis A. S., 2007.** Texture evaluation of block-type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity. *Journal of Food Engineering*, **79**, 1364-1373.
- Drohse H. B., Foltmann B., 1989.** Specificity of milk-clotting enzymes towards bovine κ -casein, *Biochimical and Biophysica Acta*, **995**, 221-224.
- Dunn B. M., 2002.** Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Review*, **102**, 4431-4458.
- Dunn B. M., Kammerman B., McCurry K. R., 1984.** The synthesis, purification, and evaluation of a chromophoric substrate for pepsin and other aspartyl proteases: design of a substrate based on subsite preferences. *Analytical Biochemistry*, **138**, 68-73.
- Dupriez H., De Leener P., 1987.** Jardin et verger d'Afrique. Terre et vie. L'Harmattan-Apica-Enda. CTA. 354p.
- Edima C. H., 2007** *Carnobacterium maltaromaticum*: Caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère, Thèse de Doctorat INPL-Nancy
- Egito A. S., Girardet J.-M., Laguna L.E., Poirson C., Mollé D., Miclo L., Humbert G., Gaillard J.-L., 2007.** Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and *Albizia* seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. *International Dairy Journal*, **17**, 816-825.
- El-Bendary M. A., Moharam M. E., Ali, T. H., 2007.** Purification and characterization of milk clotting enzyme produced by *Bacillus sphaericus*. *Journal of Applied Sciences Research*, **3**, 695-699.
- Elgorashi E. E., Taylor J. L., Maes A., De Kimpe N., Van Staden J., Verschaeve L., 2002.** "The use of plants in traditional medicine: potential genotoxic risks." *South African journal of botany*, **68**, 408-410.
- Elo G. O., Courdjo R. L., 2005.** Propriétés physico-chimiques et réactivité comparées des agents coagulants végétaux dans la fabrication du fromage frais wagasi. *Journal des Recherches Des Sciences Universitaire*, Lomé (Togo) Série A, **7**, 159-164.
- Encyclopédie Encarta, 2009.** http://www.ciao.fr/Microsoft_Encarta_Encyclopedia_Standard. consulté le 30 août 2010. Mise à jour en juin 2010.
- Eyog M. O., Gandé G. O., Dossou B., 2000.** Programme de ressources génétiques forestières en Afrique au sud du Sahara. Compte rendu de la première réunion. Ouagadougou, Réseau "Espèces Ligneuses Alimentaires": 243p.
- Faïd V., Evjen G., Tollersrud O. K., Michalski J. C., Morelle W., 2006.** Site-specific glycosylation analysis of the bovine lysosomal α -mannosidase. *Glycobiology*, **16**, 440-461.
- FAO/OMS, 1990.** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Rome, Italie, 70 pages.

- Faro C., Ramalho-Santos M., Vieira M., Mendes A., Simoes I., Andrade R., 1999.** Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 28724-28729.
- Fernández-Salguero J., Tejada L., Gómez R., 2002.** Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 464-468.
- Florez A. B., Hernandez-Barranco A. M., Marcos I., Mayo B., 2006.** Biochemical and microbiological characterization of artisan kid rennet extracts used for Cabrales cheese manufacture. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology*, **39**, 605-612.
- Fontanini D., Jones B. L., 2002.** SEP-1-a subtilisin-like serine endopeptidase from germinated seeds of *Hordeum vulgare* L. cv. Morex. *Planta*, **215**, 885-893.
- Fortin D. L., Maynard G., 1988.** Plantes médicinales du sahel. Laval.
- Fox P.F., 1987.** Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology edition, Volumes 1 and 2, Elsevier, London.
- Fox P. F., 1989.** Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, **72**, 1379-1400.
- Fukuyama S., Watanabe Y., Kondo N., Nishinomiya T., Kawamoto S., Isshiki K., Mirata M., 2009.** Efficiency of sodium hypochlorite and calcinated calcium in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* attached to freshly shredded cabbage. *Bioscience Biotechnology Biochemical*, **73**, 9-14.
- Garg S. K., Johri B. N., 1994.** Rennet: current trends and future research. *Food Reviews International*, **10**, 313-355.
- Ghosh D., Krokhin O., Antonovici M., Ens W., 2004.** Lectin affinity as an approach to the proteomic analysis of membrane glycoproteins. *Journal of Proteome Research*, **3**, 841-850.
- Gnoula C., Megalizzi V., De Neve N., Sauvage S., Ribaucour F., Guissou P., Duez P., Dubois J., Ingrassia L., Lefranc F., Kiss R., Mijatovic T., 2008.** Balanitin-6 and -7: Diosgenyl saponins isolated from *Balanites aegyptiaca* Del. display significant anti-tumor activity in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*, **32**, 5-15.
- Green M. L., Grandison A. S., 1993.** Secondary (nonenzymatic) phase of rennet coagulation and postcoagulation phenomena, In: Cheese: *Chemistry, physics and microbiology*, Fox P.F. (Ed.), Vol. 1, general aspects, Chapman and Hall, London, pp. 101-140.
- Gret, 1994.** Créer une petite fromagerie. Expériences et procédés, Lavoisier, Paris. 96 p.
- Guevara M. G., Daleo G. R., Oliva C. R., 2001.** Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiologia Plantarum*, **112**, 321-326.

- Guïama V. D., Libouga D. G., Ngah E., Beka R. G., Ndi K. C., Maloga B., Bindzi J. M., Donn P., Mbofung C. M., 2010** Milk-clotting potential of fruit extracts from *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* L. and *Solanum melongena*. *African Journal of Biotechnology*, **9**, 1797-1802.
- Gupta C. B., Eskin A. M., 1977.** Potential use of vegetable rennet in the production of cheese. *Food Technology-Chicago*, **5**, 62-65.
- Hamadou S., 2001.** Un nouveau cadre de l'exercice des activités de santé animale au Cameroun. *Afrique Agriculture*, **294**, 30-31.
- Hamdy A. M., Sheded M. A., Elkoussy L. A., Foda E. A., 1976.** Preparation of milk clotting enzymes from plant sources, I. Coagulating enzyme extract from *Solanum torvum*. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **4**, 121-128.
- Hamilton J. G., El Naiem D. A., 2000.** Sugars in the gut of the sandfly *Phlebotomus orientalis* from Dinder National Park, Eastern Sudan. *Medical Veterinary Entomology*, **14**, 64-70.
- Hardman R., Sofowara E. A., 1971.** Effect of enzymes on the yield of steroidal sapogenin from the epicarp and mesocarp of *B. aegyptiaca* fruit. *Planta Med.*, **20**, 124-130.
- Harris E. L. V., Angal S., 1989.** Protein purification methods. A practical approach IRL Press at Oxford University Press. U.K. p 156.
- Heimgartner U., Pietrzak M., Geertsens R., Brodelius P., Da Silva Figueredo A. C., Pais M. S. S., 1990.** Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, **29**, 1405-1410.
- Hounsell E. F., Davies M. J., Smith K. D., 1997.** Chemical Methods of Analysis of Glycoprotein, in the Protein Protocols Handbook: J.M. Walker (Ed.), Humana Press, Totowa, pp. 633-634.
- Hurault J., 1975.** Surpâturage et transformation du milieu physique. Formation végétales, hydrologie de surface, géomorphologie, l'exemple des hauts plateaux de l'Adamaoua (Cameroun), Institut Géographique National, Paris, France.
- Ibiama E., Griffiths M. W., 1987.** Studies on a milkcoagulating enzyme, 'Calotropain', obtained from Sodom apple (*Calotropis porcera*). *Journal of Food Agriculture*, **1**, 157-162.
- Julliard V., Spinnler H. E., Desmazeaud M. J., Boquien C.Y., 1987.** Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le Lait*, **67**, 149.
- Kamel M. S., Koskinen A., 1995.** Pregnane glycosides from fruits of *Balanites aegyptiaca*. *Phytochemistry*, **40**, 1773-1775.
- Kaneda M., Sobue A., Eida S., Tominaga N., 1986.** Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of snake-gourd fruit. *Journal of Biochemical*, **99**, 569-577.

- Kaneda M., Tominaga N., 1977.** Isolation and characterization of a proteinase from white gourd. *Phytochemistry*, **16**, 345-346.
- Kapseu C., Mbofung C. M. F., Kayem G. J., 1997.** Fatty acids and triglycerides of fruits oils from *Cyperus esculentus* and *Balanites aegyptiaca*. *Sciences des Aliments*, **17**, 531-537.
- Kealy T., 2006.** Application of liquid and solid rheological technologies to the textural characterisation of semi-solid foods. *Food Research International*, **39**, 265-276.
- Kèkè M., 2005.** Contribution à l'amélioration de la technologie de production du fromage peulh appelé warangashi. Mémoire de maîtrise; Faculté des Sciences et Techniques (FAST)/ Université d'Abomey-Calavi (UAC).
- Kim S. Y., Gunasekaran S., Olson N. F., 2004.** Combined use of chymosin and protease from *Cryphonectria parasitica* for control of meltability and firmness of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **87**, 274-283.
- Koko W. S., Abdalla H. S., Galal M., Khalid H. S., 2005.** Evaluation of oral therapy on *Mansional Schistosomiasis* using single dose of *Balanites aegyptiaca* fruits and praziquantel. *Fitoterapia*, **76**, 30-34.
- Koko W. S., Galal M., Khalid H. S., 2000.** Fasciolicidal efficacy of *Albizia anthelmintica* and *Balanites aegyptiaca* compared with albendazole. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**, 247-252.
- Köster E. P., 1990.** Les épreuves hédoniques. Dans *Evaluation sensorielle - Manuel méthodologique* Société Scientifique d'Hygiène Alimentaire (SSHA) et Institut Scientifique d'Hygiène Alimentaire Coordinateurs (ISHAC). Techniques et Documentation Lavoisier, Paris, France.
- IDF, 1992.** Bovine rennets. Determination of total milk-clotting activity. IDF standard). Brussels, Belgium: *International Dairy Federation*, **157**.
- Laemmli U. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Letouzey R., 1968.** Les Botanistes au Cameroun. Tome 7. Flore du Cameroun; Aubreville A. Muséum National d'Histoire Naturelle Laboratoire de Phanérogamie; Paris, France p 79.
- Letouzey R., 1982.** Manuel de botanique forestière, Afrique tropicale. Tome 2A. Centre Technique Forestier Tropical, Paris, France. 210p.
- Libouga D. G., 2004.** Edibility of cheese manufactured using *Ongokea gore* extract *Tropical Sciences*, **44**, 180–183.
- Libouga D. G., Vercaigne-Marko D., Sana Longa D., Iliassou Choukambou., Ebangi A. L., Messine Ombionyo, Beka R. G., Guillochon D., 2006.** Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*. *Tropicultura*, **24**, 229-238.

- Libouga D. G., Jiwoua Ngounou C. N., Kouebou C. P., 2001.** Etude du lait de zébu (*Bos indicus*) obtenu à Ngaoundéré (Adamaoua, Nord Cameroun). *Cameroon Journal of Academic Science*, **1**, 14-19.
- Liu H-W., Nakanishi K., 1982.** "The structures of balanitins, potent molluscicides isolated from *Balanites aegyptiaca*." *Tetrahedron*, **38**, 513-519.
- Llorente B. E., Brutti C. B., Caffini N. O., 2004.** Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 8182-8189.
- Lo Piero A. R., Puglisi I., Petrone G., 2002.** Characterization of "Lettucine", a Serine-like Protease from *Lactuca sativa* Leaves, as a Novel Enzyme for Milk Clotting. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **50**, 2439-2443.
- Lopes A., Teixeira G., Liberato M. C., Pais M. S., Clemente A., 1998.** New vegetal source for milk clotting enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **5**, 63-68.
- Mariela Bruno A., Cristian Lazza M., Maria Errasti E., Laura Lopez M. I., Nestor Caffini O., Marcelo Pardo F., 2010.** Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *Food Sciences and Technology*, **43**, 695-701.
- Mather I. H., Keenan T. W., 1998.** Origin and secretion of milk lipids. *Journal of Mamalian Gland Biology Neoplasia*, **3**, 259-273.
- Von-Maydell H. J., 1983.** Arbres et arbustes du Sahel, leurs caractéristiques et leur utilisation. *Eschborn* (Allemagne), G.T.Z., 531p.
- McMahon D. J., Brown R. J., 1985.** Effects of enzyme type on milk coagulation. *Dairy Science*, **68**, 628-632.
- McSweeney P. L. H., Olson N. F., Fox P. F., Healy A., Hojrup P., 1993.** Proteolytic specificity of chymosin on bovine α 1-casein. *Journal of Dairy Research*, **60**, 401-412.
- Milewski A. V., Madden D., 2006.** "Interactions between large African browsers and thorny Acacia on a wildlife ranch in Kenya." *African Journal of Ecology*, **44**, 515-522.
- MINEPIA, 2008.** Schéma directeur pour le développement des filières de l'élevage au Cameroun: diagnostic des filières d'élevage, la filière lait, Octobre 2008.
- MINEPIA, 2006.** Ministères de l'Elevage des Pêches et des Industries Animales: La stratégie sectorielle de l'élevage des pêches et des industries animales, Cameroun, octobre 2006.
- Mohamed A. M., O'Conner C. B., 1996.** Milk coagulation by *Calotropis procera* juice. Effect of juice storage time and temperature trail for cheese making. *International Journal of Dairy Science*, **49**, 277-285.

- Mohamed Ahmed Isam A., Elfadil Babiker E., Nobuhiro Mori, 2010.** pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *Food Science and Technology*, **43**, 759-764.
- Mohamed Ahmed Isam A., Morishima Isao, Babiker Elfadil E., Mori Nobuhiro, 2009_a.** Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. *Phytochemistry*, **70**, 483-491.
- Mohamed Ahmed Isam A., Morishima Isao, Babiker Elfadil E., Mori Nobuhiro, 2009_b.** Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. *Food Chemistry*, **116**, 395-400.
- Mohammed A. M., Wolf W., Spiess W. E., 2002.** Physical, morphological and chemical characteristics, oil recovery and fatty acid composition of *Balanites aegyptiaca* Del. Kernels. *Plant Food Human Nutrition*, **57**, 179-189.
- Mullin W. J., Wolfe F. H., 1973.** Disc gel electrophoresis of caseins treated with proteolytic and glycolytic enzymes. *Journal of Dairy Science*, **57**, 9-14.
- Ndambi O. A., Hemme T., Latacz-Lohmann U., 2007.** Dairying in Africa - Status and recent developments. *Livestock Research for Rural Development*, **19**, Art. 111
- Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M. M., Dadié A., 2009.** Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheese in Algeria. *Journal of Food Technology*, **7**, 20-29.
- Oliveira A., Pereira C. Costa D. S., Teixeira J., Fidalgo F., Pereira S., Pissarra J., 2010.** Characterization of aspartic proteinases in *C. cardunculus* L. callus tissue for its prospective transformation. *Plant Science*, **178**, 140-146.
- Oner M., Akar B., 1993.** Separation of the proteolytic enzyme from fig tree latex and its utilisation in gaziantep cheese production. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, **26**, 318-321.
- Osman Kheir S. E., Osman El Owni O. A., Abdalla M. O. M., 2011.** Comparison of Quality of Sudanese White Cheese (*Gibna bayda*) Manufactured with *Solanum dubium* Fruit Extract and Rennet. *Pakistan Journal of Nutrition*, **10**, 106-111.
- Otani H., Iwagaki M., Hosono A., 1991_a.** The screening of trees having milk clotting activity. *Animal Science and Technology*, **62**, 417-423.
- Otani H., Matsumori M., Hosono A., 1991_b.** Purification and some properties of a milk clotting protease from the young seeds of *Albizia julibrissin*. *Animal Science and Technology*, **62**, 424-432.
- Padmanabhan S., Chitre A., Shastri N., 1993.** Milk clotting protease isolated from *Dieffenbachia maculata*. *Die Nahrung*, **37**, 99-101.

- Padmashali B., Vaidya V. P., Vagdevi H. M., Satyanarayana N. D., 2006.** "Antifertility Efficacy of the Plant *Balanites Roxburghii* (Balanitaceae) in Female Rats." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **68**, 347-51.
- Pande M., Dubey V. K., Yadav S. C., Jagannadham M. V., 2006.** A novel serine protease cryptolepain from *Cryptolepis buchanani*: purification and biochemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 10141-10150.
- Park H., Yamanaka N., Mikkonen A., Kusakabe I., Kobayashi H., 2000.** Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **64**, 931-939.
- Park Y. W., 2007.** Rheological characteristics of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research*, **68**, 73-87.
- Parry R. M. Jr., 1983.** Milk coagulation and proteins denaturation. In *Fundamentals of Dairy Chemistry* (Webb B. H., Johnson A. H., Alford J. A. (Eds), Westport, USA. pp. 662-771.
- Piska I., Stetina J., 2004.** Influence of cheese ripening and rate of cooling of the processed cheese mixture on rheological properties of processed cheese. *Journal of Food Engineering*, **61**, 551-555.
- Rabilloud T., Chevallet M., 2000.** Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods in: Rabilloud, T. (Ed.), *Springer-Verlag*, Berlin, pp. 9-29.
- Ramet J. P., 1997.** Technologie comparée des différents types de caillé, dans: Eck A., Gillis J.C. (Éds.), *Le fromage*, Lavoisier, Paris, pp. 334-364.
- Ramet J. P., Weber F., 1980.** Contribution à l'étude de l'influence des facteurs du milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le Lait*, **60**, 1-13.
- Raposo S., Domingos A., 2008.** Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process Biochemistry*, **43**, 139-144.
- Reid J. R., Coolbear T., Ayers J. S., Coolbear K. P., 1997.** The action of chymosin on κ -casein and its macropeptide: effect of pH and analysis of products of secondary hydrolysis. *International Dairy Journal*, **7**, 559-569.
- Remeuf F., Cossin V., Dervin C., Lenoir J., Tomassone R., 1991.** Relations entre les caractères physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Le Lait*, **71**, 397-421.
- Reps A., Jedrychowski L., Wisniewska K., Jankowska A., 2006.** Application of a coagulating preparation obtained with *Rhizomucor miehei* in cheesemaking. *Pakistan Journal of Nutrition*, **5**, 97-101.
- Robert Jenness, 1999.** Composition of Milk. In: *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 3rd edn. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc. pp. 1-38.

- Robinson R. K., Wilbey R. A., 1998.** *Cheesemaking Practice*, 3rd edn. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Roseiro M. L. B., 1990.** *Traditional Ewe's milk cheesemaking and the production of Requeijão*. MSc Thesis, Department of Food Science and Technology, The University of Reading.
- Roseiro M. L. B., 1991.** Ewe's milk cheesemaking in Portugal using a vegetable rennet. A review. *Sheep Dairy News*, **8**, 74-75.
- Roseiro L. B., Barbosa M., Ames J. M., Wilbey A., 2003.** Cheesemaking with vegetable coagulants-The use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheese. *International journal of Dairy Technology*, **56**, 76-85.
- Rudenskaya G. N., Bogacheva A. M., Preusser A., Kuznetsova A. V., Dunaevsky Ya. E., Golovkin B. N., Stepanov V. M., 1998.** Taraxalisin a serine protease from dandelion *Taraxacum officinale*. Webb s.l. *FEBS letters*, **473**, 237-240.
- Salvador S. M., Novo C., Domingos A., 2006.** Evaluation of the presence of aspartic proteases from *Centaurea calcitrapa* during seed germination. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 893-898.
- Sanni A. I., Onilude A. A., Momoh M. O., 1999.** Selection of starters and a starter-mediated novel procedure for production of wara, a West African soft cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 325-333.
- Sarath G., De La Motte R., S., Wagner F. W., 1989.** Protease assay methods. In *Proteolytic Enzymes: a Practical Approach* (R. J. Beynon, and J. S. Bond (Eds)., Oxford: IRL Press, UK, pp 25-55.
- Sarmiento A. C., Lopes H., Oliveira C. S., Vitorino R., Samyn B., Sergeant K., Debyser G., Beeumen J. V., Domingues P., Amado F., Pires E. M., Rosário M., Domingues, Barros M. T., 2009.** Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus L.* *Planta*, **230**, 429-439.
- Schultz M. M., Hansen L. B., Steuernagel G. R., Kuck A. L., 1990.** Variation of milk fat, protein and somatic cells for dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, **73**, 484-493.
- Sedmak J. J., Grossberg S. E., 1977.** A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G 250. *Analytical Biochemistry*, **79**, 544-552.
- Sharma A., Kumari M., Jagannadham M. V., 2009.** Benghalensin, a Highly Stable Serine Protease from the Latex of Medicinal Plant *Ficus benghalensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 11120-11126.
- Shibuya N., Goldstein I. J., Van Damme E. J., Peumans W. J., 1988_a.** Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 728-734.

- Sidrach L., Garcia-Canovas F., Tudela J., Rodriguez-Lopez J. N., 2005.** Purification of cynarase from artichoke (*Cynara scolymus* L.): Enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, **66**, 41-49.
- Silva S. V., Malcata F. X., 2005.** Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, **89**, 19-26.
- Silva S. V., Malcata F. X., 1999.** On the activity and specificity of cardosin b, a plant proteinase on ovine caseins. *Food Chemistry*, **67**, 373-378.
- Sousa M. J., Malcata F. X., 1998.** Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extract from flowers of *Cynara cardunculus* L. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 305-314.
- Sousa M. J., Malcata F. X., 2002.** Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait*, **82**, 151-170.
- Takahashi K., Niwa H., Yokota N., Kubota K., Inoue H., 2008.** Widespread tissue expression of nepenthesin-like aspartic protease genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiological and Biochemical*, **46**, 724-729.
- Tamer, I. M., 1993.** Identification and partial purification of a novel milk enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Letters*, **15**, 427-432.
- Tavaria F., Sousa M. J., Domingos A., Malcata F. X., Brodelius P., Clemente A., Pais M. S., 1997.** Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 3760-3765.
- Tavaria F. K., Tavares T. G., Silva-Ferreira A. C., Malcata F. X., 2006.** Contribution of coagulant and native microflora to the volatile-free fatty acid profile of an artisanal cheese. *International Dairy Journal*, **16**, 886-894.
- Taylor J. L. S., Elgorashi E. E., Maes A., Van Gorp U., De Kimpe N., Van Staden J., Verschaeve L., 2003.** "Investigating the safety of plants used in South African traditional medicine: Testing for genotoxicity in the micronucleus and alkaline comet assays." *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **42**, 144-154.
- Tomar R., Kumar R., Jagannadham M.V., 2008.** A staple serine protease, Wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb) R. Br.: purification and biochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1479-1487.
- Trujillo A. J., Buenaventura G., Laencina J., Lopez M. B., 2000.** Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. *Food Chemistry*, **71**, 449-457.
- Tubiana M.J., 1993.** Un arbre pour le Sahel? Tchad et Culture, *Revue Bimestrielle* N° 131: 18-19. Ndjamen, Tchad.

- Tunick M.H., 2000.** Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal of Dairy Science*, **83**, 1892-1898.
- Tunick M.H., Van Hekken D.L., 2002.** Torsion gelometry of cheese. *Journal of Dairy Science*, **85**, 2743-2749.
- Uchikoba T., Horita H., Kaneda M., 1990.** Proteases of the sarcocarp of yellow snake-gourd. *Phytochemistry*, **29**, 1879-1881.
- Uchikoba T., Yonezawa H., Kaneda M., 1998.** Cucumisin-like protease from sarcocarp of *Benincasa hispida* var. Ryukyu. *Phytochemistry*, **49**, 2215-2219.
- Umar Dahot M., Yakoub Khan M., Memon A. N., 1990.** Screening of some Pakistani plants for milk clotting activity. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, **3**, 284-286.
- Vairo Cavalli S., Claver S., Priolo N., Natalucci C., 2005.** Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research*, **72**, 271-275.
- Van Hekken D. L., Tunick M. H., Park Y. W., 2004.** Rheological and proteolytic properties of Monterey Jack goat milk cheese during 6 months aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 5372-5377.
- Van Hekken D. L., Tunick M. H., Malin E. L., Holsinger V. H., 2007.** Rheology and melt characterization of low-fat and full fat Mozzarella cheese made from microfluidized milk. *LWT*, **40**, 89-98.
- Van Teeffelen M. M. A., Broersen K., Jongh D. E. H. J., 2005.** Glucosylation of α -lactoglobulin lowers the capacity change of unfolding; a unique way to affect protein thermodynamics. *Protein Science*, **14**, 2187-2194.
- Veringa H. A., 1961.** Rennet substitutes - a review. *Dairy Science Abstract*, **23**, 197-200.
- Verissimo P., Esteves C., Faro C., Pires E., 1995.** The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*, **17**, 621-626.
- Verissimo P., Ramalho-Santos M., Faro C., Pires E., 1998.** A comparative study on the aspartic proteinases from different species of *Cynara*. In *Aspartic proteinases* N. M. G. James (Ed.), New York, NY, USA: Plenum Press, pp. 459-463.
- Vetier N., 1998.** Contribution à l'étude structurale et rhéologique de la coagulation du lait par action conjuguée d'un agent acidifiant et d'une enzyme protéolytique, thèse, Institut national polytechnique de Lorraine, Nancy, France.
- Vetier N., Banon S., Ramet J.P., Hardy J., 2000.** Hydratation des micelles de caséine et structure fractale des agrégats et des gels de lait. *Le Lait*, **80**, 237-246.

- Vetier N., Desobry-Banon S., Ould eleya M.M., Hardy J., 1997.** Effect of temperature and acidification rate on the fractal dimension of acidified casein aggregates. *Journal of Dairy Sciences*, **80**, 3161-3166.
- Vieira de Sá F., Barbosa M., 1970.** Activité coagulante comparée d'une présure végétale extraite du chardon (*Cynara cardunculus*) et de la présure animale. *Proceedings XVIII International Dairy Congress, Sydney*, **1**, 292p.
- Vieira de Sá F., Barbosa M., 1972.** Cheese-making with a vegetable rennet from Cardo (*Cynara cardunculus*). *Journal of Dairy Research*, **39**, 335-343.
- Vieira M., Pissara J., Verissimo P., Castanheira P., Costa Y., Pires E., 2001.** Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology*, **45**, 529-539.
- Wasonga V. O., Ngugi R. K., Nyariki D. M., Kironchi G., Njoka T. J., 2003.** "Effect of *Balanites glabra* canopy cover on grass production, organic matter and soil moisture in a southern Kenyan rangeland". *African Journal of Range and Forage Science*, **20**, 259-264.
- Yadav S. C., Pande M., Jagannadham M. V., 2006.** Highly stable glycosylated serine protease from medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochemistry*, **67**, 1414-1426.
- Yamagata H., Ueno S., Iwasaki T., 1989.** Isolation and characterization of a possible native cucumisin from developing melon fruits and its limited autolysis to cucumisin. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**, 1009-1017.
- Yousif B. H., McMahon D. J., Shammet K. M., 1996.** Milk-clotting Enzyme from *Solanum dobium* Plant. *International Dairy Journal*, **6**, 637-644.
- Zanetta J-P., Timmerman P., Leroy Y., 1999.** Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology*, **3**, 255-266.

ANNEXE 1

Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*

D.G. Libouga^{1*}, Dominique Vercaigne-Marko², Sana Longa Djangal¹, Iliassou Choukambou¹, A.L. Ebangi³, Messine Ombionyo³, R.G. Beka¹, T.M. Aboubakar⁴ & D. Guillochon²

Keywords: Appreciation- *Balanites aegyptiaca*- Milk clotting- Toxicity- Cameroon

Résumé

Au Cameroun, l'interdiction d'abattre les veaux de zébu (*Bos indicus*) rend difficile l'approvisionnement en abomasum, ce qui empêche la fabrication de la présure. Dans le but de conserver le lait grâce à la fabrication de fromages, un extrait coagulant le lait a été produit à partir des fruits de *Balanites aegyptiaca*. *B. aegyptiaca* est un arbre répandu dans le Cameroun septentrional. Ses fruits ont été récoltés à Pitoa (9°23' latitude Nord et 13°32' longitude Est). Le fruit est une drupe formé d'un épicarpe, un mésocarpe et un endocarpe. Seul un extrait de mésocarpe est capable de coaguler le lait. Dans un premier temps, le procédé d'extraction a été optimisé grâce à un dispositif expérimental de type split plot: (5 × 4 × 4): 5 concentrations de mésocarpe, 4 températures et 4 durées de macération ont été étudiées. L'extrait a été caractérisé par son temps de coagulation du lait, déterminé selon la méthode de Berridge, sa teneur en protéines par dosage avec l'acide bicinchoninique. L'extraction optimale est obtenue en macérant 50 g de mésocarpe dans 100 ml d'eau à 4 °C pendant 9 h. La flore microbienne est composée de coliformes, dénombrés sur gélose au désoxycholate lactose, et de germes aérobies mésophiles dénombrés sur PCA. Aucun germe sulfite-réducteur n'a pu être mis en évidence. Dans un deuxième temps, des fromages frais ont été fabriqués avec le lait de zébu en utilisant soit la présure soit l'extrait de mésocarpe. La toxicité du produit a été testée en nourrissant des souris avec ces fromages puis avec l'extrait brut de mésocarpe et en étudiant leur poids, celui de leur foie et leur hématocrite. Ni l'extrait brut, ni les fromages fabriqués avec cet extrait n'ont été toxiques pour les souris. Une analyse sensorielle a été menée sur un jury de dégustateurs qui a apprécié ces fromages. En conclusion, l'extrait des mésocarpes des fruits de *B. aegyptiaca* est bien utilisable en fromagerie. Une analyse préliminaire par électrophorèse en présence du SDS et en milieu réducteur ou non, a montré que l'extrait de mésocarpe contient principalement 5

Summary

Study of a Suitable Cheese Making Milk-clotting Agent from *Balanites aegyptiaca* Fruits

As slaughtering of zebu (*Bos indicus*) calves in Cameroon is forbidden, calf abomasa are rare on markets so it is difficult to prepare rennet. The aim of this study was to look for other sources of milk clotting extracts, especially from *Balanites aegyptiaca* fruits. *B. aegyptiaca* is a widespread tree in northern Cameroon. Its fruit is pulpy with a thin and hard epicarp, a dark brown mesocarp and a hard endocarp enclosing an oil seed. The fruits of *B. aegyptiaca* were harvested at Pitoa (9°23' N, 13°32' E). Milk clotting, determined by the Berridge method, was only obtained with mesocarp extracts. The experimental design of the extraction was a split-plot (5 × 4 × 4) with 5 mesocarp concentrations, 4 temperatures and 4 maceration times. Optimum extraction was performed when macerating 50 g mesocarp in 100 ml water at 4 °C during 9 h. Protein content (91 ± 14 mg. ml⁻¹) was determined by bicinchoninic acid assay. Five proteins of respective molecular masses 27, 30, 42, 44 and 90 kg.mole⁻¹ were observed by SDS-PAGE under reducing conditions. The force of the extract was determined by comparing its milk clotting time to that obtained with rennet. Proteolytic activity of the extract was measured by hydrolysis of bovine haemoglobin and titration of free NH₂ using l'-o-phthaldialdehyde reagent. Counting of coliforms was carried out on DCL gelose, that of the total aerobic mesophil flora on PCA and that of the sulfite-reducing flora on TSN. The extract only contained coliforms and aerobic mesophil flora. Fresh cheese was made with zebu milk using rennet or *B. aegyptiaca* mesocarp extract. Indemnes of Specific Pathogen Organism mice were fed with these cheeses then with crude *B. aegyptiaca* mesocarp extract. No abnormality, nor toxicity were observed on mice. A panel was allowed to appreciate these cheeses. Statistical analysis was

*Adresse de correspondance: D.G. Libouga, Laboratoire de Biophysique et Biochimie Alimentaires, Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro Industrielles, Université de N'Gaoundéré, B.P. 455, N'Gaoundéré, Cameroun. Tél/Fax: +237 225.27.51 e-mail: libouga@yahoo.fr

¹Laboratoire de biophysique et biochimie alimentaires, Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro Industrielles, Université de N'Gaoundéré, B.P. 455, N'Gaoundéré, Cameroun. Tél/Fax: +237 225.27.51 e-mail: libouga@yahoo.fr

²Laboratoire de Technologie des Substances Naturelles, IUT «A» -Département Génie biologique, Boulevard Paul Langevin - Cité Scientifique - B.P. 179, F-59653 Villeneuve D'Ascq, Cedex -France.

³Institut de la Recherche Agricole pour le Développement, B.P. 65, N'Gaoundéré, Cameroun.

⁴Faculté des Sciences Exactes et Appliquées, Université de N'Djamena, B.P. 1027, N'Djamena, République du Tchad.

protéines de masse moléculaire respectivement 27, 30, 42, 44 et 90 kg $\times$ mole⁻¹. La caractérisation de la protéase responsable de l'activité coagulatrice est actuellement en cours.

conducted using SAS® software. It was concluded that *B. aegyptiaca* mesocarp extract is suitable for cheese manufacture.

Introduction

L'amélioration des techniques d'élevage au Cameroun permet aux éleveurs des provinces de l'extrême nord, de l'Adamaoua et du nord ouest de produire davantage de lait. Cette production laitière est encore fortement liée aux aléas climatiques: faible production pendant la saison sèche au cours de laquelle les zébus (*Bos indicus*) ne se nourrissent que des jeunes pousses apparaissant après les feux de brousse puis forte production laitière pendant la saison des pluies au cours de laquelle ces animaux ont à leur disposition de grandes quantités de fourrage et d'eau (24). Ce lait est soit consommé en l'état (*Biradam*) soit transformé en lait fermenté comme le *pendidam* et le *kindirmou* (26). Il devient de plus en plus nécessaire de fabriquer des produits à plus longue durée de vie tels que les fromages.

L'importation de présure est difficile du fait de son coût élevé, et des problèmes de transport qui génèrent un produit défectueux à l'arrivée. Sa production sur place se heurte à une législation qui interdit l'abattage des veaux de zébu. L'expérience empirique a conduit certaines populations à coaguler le lait en utilisant soit les écorces des arbres (*Acacia albida*) soit leur sève (*Calotropis procera*). Ces pratiques contribuent à fragiliser l'écosystème local qui est déjà très menacé par le surpâturage et la pratique des feux de brousse (16). Dans ces régions, les fruits sont mieux indiqués pour servir de matière première à la fabrication des extraits coagulants. Les fruits d'un certain nombre de plantes ont déjà donné des extraits provoquant le caillage du lait: *Adenolichos anchietae* (27), *Albizia*

julibrissin (30, 31), *Cynara cardunculus* (7, 15, 26), *Droogmansia megalantha*, différentes espèces d'Eriosema (*E. shirensse*, *E. ellipticum*, *E. pauciflorum*, *E. gossweilleri*, *E. psoraleoides*) (27), le melon (37), *Onopordum turcicum* (36), *Solanum dobium* (38).

Jusqu'à présent, les chercheurs ne se sont pas intéressés aux potentialités coagulantes des fruits de *Balanites aegyptiaca*. Cet arbre, cultivé depuis la plus haute antiquité en Egypte, se rencontre du Sénégal à la Mauritanie jusqu'à la Mer Rouge mais aussi dans les régions chaudes du Congo ex-belge et de l'Angola. Il est répandu dans le Cameroun septentrional au sud du lac Tchad et au nord de la Bénoué. C'est un petit arbre atteignant environ une dizaine de mètres de haut, à fût tortueux et à cime sphérique. Il est très résistant à la sécheresse et pousse sur tous les types de sol (12). Ses racines et son écorce sont riches en saponines (28), le bois est réputé résistant aux termites et aux insectes xylophages. Le fruit est une drupe (fruit charnu à noyau) qui présente un épicarpe jaunâtre mince et dur, un mésocarpe brun foncé et charnu et un endocarpe très épais, (Figure 1). Le mésocarpe contient des sapogénines stéroïdiques (13) et des prégnanes glycosidiques (16) alors que ses extraits aqueux sont anthelminthiques (17, 18). L'endocarpe contient une graine oléagineuse (29) donnant une huile comestible (8). La pulpe des fruits est sucrée et est consommée par les insectes (13) et par l'homme (6). Le but de ce travail est d'obtenir à partir des fruits de *B. aegyptiaca*, un agent coagulant utilisable en fromagerie.

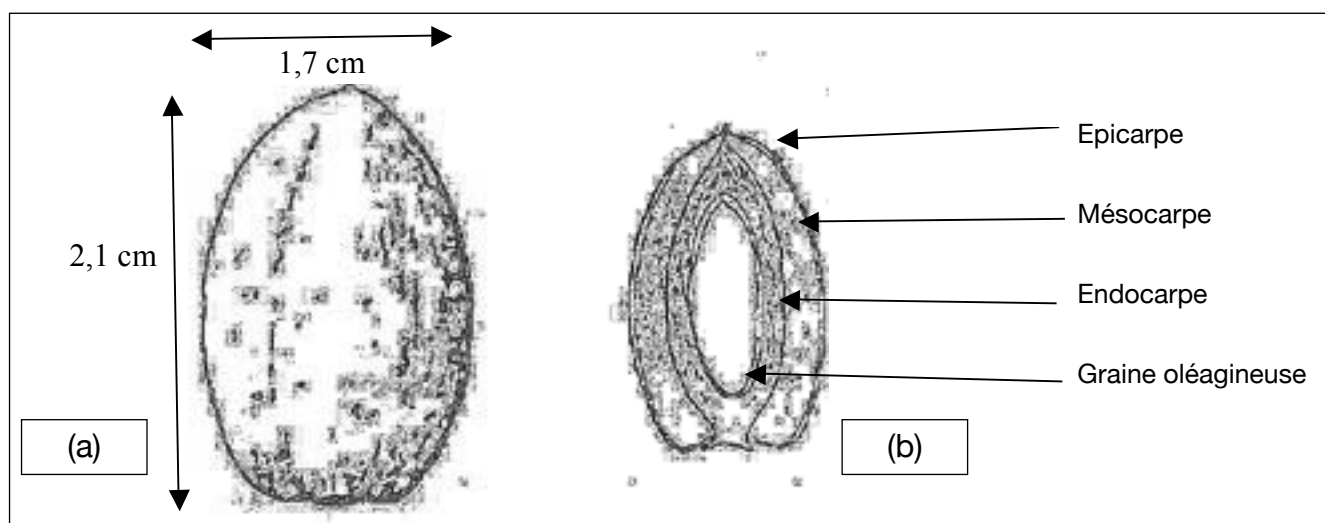


Figure 1: Schéma du fruit de *Balanites aegyptiaca*: (a) vue de profil et (b) coupe transversale.

Matériel et méthodes

1. Site de récolte

Les fruits mûrs de *B. aegyptiaca* ont été récoltés en décembre à Pitoa, agglomération du nord Cameroun située à 9°23' latitude nord et 13°32' longitude est (21).

2. Préparation et caractérisation de l'extrait coagulant

Le mésocarpe des fruits est prélevé puis macéré sous agitation périodique dans de l'eau distillée pendant des temps et des températures variables. La pâte obtenue est essorée à l'aide d'une toile; le liquide obtenu constitue l'extrait coagulant.

Cinq concentrations du mésocarpe (0,1- 0,2- 0,5- 0,7 et 1 g.ml⁻¹), 4 températures (4, 20, 30 et 40 °C) et 4 durées de macération (3, 5, 9 et 12 h) ont été expérimentées. Le dispositif expérimental est de type «split plot» (5 × 4 × 4).

La masse volumique de l'extrait coagulant a été déterminée par pesée à la température ambiante (25 °C) et sa matière sèche par dessiccation à l'étuve à 105 °C jusqu'à poids constant (5 h).

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de l'acide bicinchoninique (Pierce) en utilisant du sérum d'albumine bovine pure comme standard.

3. Détermination du temps de coagulation

Le temps de coagulation est déterminé par la méthode de Berridge (2) en incubant 10 ml de lait frais de zébu (23) dans un tube à essai plongé dans un bain marie à 30 °C et 0,5 ml d'extrait coagulant des fruits de *B. aegyptiaca* ou 0,5 ml de présure (Carlin, Texel, Groupe Rhône-Poulenc France) diluée, de force 1/10 000. Le tube à essai est soumis à un mouvement de rotation lente. On mesure le temps qui s'écoule entre l'introduction de l'extrait coagulant et le moment où un mince film commence à se former à l'intérieur des parois du tube à essai.

4. Dénombrement des germes

Le dénombrement des coliformes a été fait sur DCL-gélose (milieu lactosé au désoxycholate de sodium) à 37 °C pendant 24 heures, celui de la flore aérobique mésophile totale sur PCA (Plate Count Agar)

à 30 °C pendant 72 heures et celui des germes sulfito-réducteurs sur gelose TSN (Trypticase Sulfite Néomycine) à 44 °C pendant 48 heures selon Guiraud et Galzy (11).

5. Détermination de la force de l'extrait coagulant

La force des extraits coagulants a été calculée en utilisant la formule suivante:

$$F_x \times C_x \times t_x = F_s \times C_s \times t_s$$

où: F_x , C_x et t_x sont respectivement la force, la dilution et le temps de floculation de la présure de référence.

F_s , C_s et t_s la force, la dilution et le temps de floculation de la solution inconnue.

6. Fabrication des fromages et calcul du rendement fromager

Un litre de lait de zébu, provenant de plusieurs animaux, est pasteurisé en vrac puis laissé à maturer par la flore banale pendant 4 h à la température ambiante. Il est ensuite additionné soit de 100 ml de présure (Carlin, Texel) diluée (1/300) soit de 200 ml de l'extrait des fruits de *B. aegyptiaca*. La durée de la coagulation est de 6 h. Après un léger tranchage et 2 h d'égouttage, le caillé est lissé à l'aide d'un robot (Moulinex). Ce fromage n'est ni sucré, ni aromatisé.

Le rendement fromager brut (R_{BR}) est le pourcentage de la masse totale de fromage par rapport à la masse initiale du lait. Le rendement fromager en matière sèche (R_{MS}) est le pourcentage de matière sèche totale récupérée dans le fromage par rapport à la matière sèche totale initiale du lait.

Les matières grasses du lait et du fromage sont mesurées par extraction éthero-ammoniacale selon la méthode de Röse Gottlieb en utilisant le butyromètre de Pien selon le recueil des normes Afnor (33).

7. Traitement des souris

Les souris mâles IOPS (Indemnes d'Organismes Pathogènes Spécifiques) âgées de 3 à 4 semaines ainsi que leurs aliments de base sont achetés au Laboratoire National Vétérinaire (BP 503, Garoua, Cameroun). Les souris sont réparties en deux séries (1 et 2) de deux lots (A, B, C et D) de 10 souris chacun.

Tableau 1
Composition des aliments des souris

Ingrédients	Pourcentage (g × 100. g ⁻¹)
Mil	54
Tourteau de coton	18
Maïs	16
Poisson fumé	8
Polyvitaviaire (mélange des vitamines, nutriments, amino acides, selsetc)	1,85
Farine d'os	1,2
Huile des graines de coton	0,7
Sel (NaCl)	0,2
Olivitasol (mélange des vitamines, amino acides, sels ...etc)	0,05

Lors de la première expérience (série 1), les souris témoin (lot A) sont nourries avec un aliment de base dont la composition est donnée dans le tableau 1. Les souris test (lot B) sont nourries avec le même aliment auquel sont incorporés 24,5 g de matière sèche de mésocarpe par kg de granulés.

Dans une deuxième expérience (série 2), les souris sont nourries avec des granulés dans lesquels la farine de poisson est remplacée par du fromage préparé respectivement à l'aide de présure (lot C) ou d'extrait de mésocarpe (lot D).

L'hématocrite des souris a été dosé. Pour cela, le bout de la queue des souris est sectionné à l'aide de ciseaux et le sang est recueilli dans des tubes capillaires héparinés de 32 µl puis centrifugés à 1200 tours. min⁻¹ pendant 5 min. La lecture se fait à l'aide d'un micro-haematocrit reader (Hawksley, Grande Bretagne) et le résultat est exprimé en pourcentage du volume sanguin.

8. Analyse sensorielle

Une analyse sensorielle a été effectuée avec un jury, une épreuve et un questionnaire.

Le jury

Les 397 dégustateurs sont, pour la plupart, des étudiants et des enseignants ayant plus ou moins voyagé et ayant plus ou moins mangé des fromages. Leur âge varie entre 17 et 40 ans. Ils sont tous originaires du Cameroun et sont répartis selon 3 régions géographiques: 1 - Adamaoua, nord et extrême nord; 2 - le centre, est et sud littoral et 3 - nord-ouest, ouest et sud-ouest.

L'épreuve

L'épreuve se fait 1 à 2 heures après le déjeuner. Elle comporte deux étapes: un test triangulaire et un test hédonique (19).

Au cours du test triangulaire, le dégustateur compare trois échantillons de fromage dont deux sont identiques. Chaque échantillon est représenté par un code à trois chiffres. La réussite à ce test est essentielle pour l'étape suivante.

Pendant le test hédonique, les échantillons sont présentés de façon monadique pour être appréciés sur une échelle de cotation à 9 points. Chaque échantillon de fromage frais est présenté simultanément avec un fromage frais non aromatisé

Tableau 2
Questionnaire de l'analyse sensorielle

Analyse sensorielle			
Code	Nationalité	Province d'origine	
Age		Date et heure	
Profession		Sexe	
Consommez-vous du fromage?			
Très souvent	Souvent	Rarement	Pas du tout
Avez-vous séjourné plus de 3 mois hors de votre province			
oui		de votre pays	
non		oui non	
(Barrez la mention inutile)			
Trois échantillons de fromage vous sont proposés; cochez celui que vous percevez différent des deux autres			
583	249	476	
Deux échantillons de fromage vous sont présentés, l'un est aromatisé tandis que l'autre ne l'est pas. Exprimez votre appréciation du fromage aromatisé suivant l'échelle ci-dessous:			
1. déteste extrêmement			
2. déteste beaucoup			
3. déteste modérément			
4. déteste un peu			
5. n'aime pas, ne déteste pas			
6. aime un peu			
7. aime modérément			
8. aime beaucoup			
9. aime extrêmement			
Goût	Couleur	Texture	Appréciation générale
Que suggériez-vous pour améliorer ce fromage ?			
Merci pour votre collaboration			

appelé «blanc». Celui-ci est la référence qui permettra de mieux apprécier les propriétés sensorielles de l'échantillon à tester; il est dégusté en premier. Chaque dégustation est suivie d'un gargarisme à grande eau afin d'éviter toute interférence.

Le questionnaire

Le questionnaire (Tableau 2) comporte trois sections: une section de renseignements sur le dégustateur, une section pour le test triangulaire et une section pour le test hédonique.

9. Analyse statistique

Toutes les mesures ont été répétées au moins trois fois. L'analyse statistique a été faite à l'aide du logiciel de statistique SAS®(34).

9.1. Le temps de coagulation

Diverses modèles mathématiques ont été utilisés, notamment un modèle linéaire, pour tester l'impact de la concentration du mésocarpe, la durée et la température de macération sur le temps de coagulation du lait. Le modèle utilisé était le suivant:

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + T_j + M_k + (C*T)_{ij} + (C*M)_{ik} + (T*M)_{jk} + (C*T*M)_{ijk} + e_{ijkl}$$

où:

Y_{ijklm} est l'effet du $i^{\text{ème}}$ concentration, du $j^{\text{ème}}$ température et de la $k^{\text{ème}}$ durée de macération sur le temps de coagulation du lait,

μ est la moyenne générale du temps de coagulation.

Les paramètres ci-dessous sont les effets sur le temps de coagulation du lait:

C_i l'effet de la $i^{\text{ème}}$ concentration ($i = 0,1 - 0,2 - 0,5 - 0,7$ et $1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

T_j l'effet de la $j^{\text{ème}}$ température ($j = 4, 20, 30$ et 40°C).

M_k l'effet la $k^{\text{ème}}$ durée de macération ($k = 3, 5, 9$ et 12 h).

$(C*T)_{ij}$ l'effet de l'interaction entre la $i^{\text{ème}}$ concentration et la $j^{\text{ème}}$ température.

$(C*M)_{ik}$ l'effet de l'interaction entre la $i^{\text{ème}}$ concentration et la $k^{\text{ème}}$ durée de macération.

$(T*M)_{jk}$ l'effet de l'interaction entre la $j^{\text{ème}}$ température et la $k^{\text{ème}}$ durée de macération.

$(C*T*M)_{ijk}$ l'effet de l'interaction entre la $i^{\text{ème}}$ concentration, la $j^{\text{ème}}$ température et la $k^{\text{ème}}$ durée de macération.

e_{ijkl} l'effet de l'erreur sur le temps de coagulation du lait de la $i^{\text{ème}}$ concentration, la $j^{\text{ème}}$ température, la $k^{\text{ème}}$ durée de macération, l'interaction entre la $i^{\text{ème}}$ concentration et la $j^{\text{ème}}$ température, l'interaction entre la $j^{\text{ème}}$ température et la $k^{\text{ème}}$ durée de macération, l'interaction entre la $i^{\text{ème}}$ concentration, la $j^{\text{ème}}$ température et la $k^{\text{ème}}$ durée de macération.

9.2. Etude du poids des souris

Le modèle linéaire de formule suivante a été utilisé pour le poids des souris

$$W_{abc} = \mu + L_a + T_b + (L*T)_{ab} + e_{abc}$$

où: W_{abc} est le poids de la $c^{\text{ème}}$ souris du $a^{\text{ème}}$ lot après le $b^{\text{ème}}$ temps.

μ la moyenne générale du poids des souris.

L_a l'effet du $a^{\text{ème}}$ lot ($a = 1, 2$ et 3) sur le poids des souris.

T_b l'effet du $b^{\text{ème}}$ temps ($b = 15, 30, 45$ et 60 jours) sur le poids des souris.

$(L*T)_{ab}$ l'effet de l'interaction entre le $a^{\text{ème}}$ lot et le $b^{\text{ème}}$ temps.

e_{abc} l'effet sur le poids des souris de l'erreur sur la $c^{\text{ème}}$ souris du $a^{\text{ème}}$ lot après le $b^{\text{ème}}$ temps.

L'effet du lot sur le poids des souris, sur l'hématocrite et le poids du foie a été évalué en utilisant un modèle linéaire simple

$$W = \mu + L$$

où: W est le poids des souris,

μ est la moyenne générale du poids des souris.

L le lot ou l'hématocrite ou le poids du foie.

9.3. Analyse sensorielle

Un modèle linéaire avec analyse des variantes multiples a été utilisé pour étudier l'effet de la «province» (P), la «région» (R), la «profession» (Pr), le «sexe» (S), le «séjour hors province» (SHP) et le «séjour hors pays» (SHPA) sur le goût, l'âge, la texture et l'appréciation générale. La relation générale est la suivante:

$$Y_{ijklmn} = \mu + P_i + R_j + Pr_k + S_l + SHP_m + SHPA_n + e_{ijklmn}$$

où: Y_{ijklmn} est l'effet du $i^{\text{ème}}$ sexe de $j^{\text{ème}}$ provenance, de $k^{\text{ème}}$ région de $l^{\text{ème}}$ profession, du $m^{\text{ème}}$ séjour hors de la province et du $n^{\text{ème}}$ séjour hors du pays sur le goût, l'âge, la texture et l'appréciation générale.

μ est la moyenne générale.

Les paramètres ci-dessous sont les effets sur l'âge, le goût, la texture et l'appréciation générale, pour:

P_i est l'effet du $i^{\text{ème}}$ province ($i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ et 10).

R_j est l'effet de la $j^{\text{ème}}$ région ($j = 1, 2, 3$ et 4).

Pr_k est l'effet de la $k^{\text{ème}}$ profession ($k = \text{étudiant, fonctionnaire}$).

S_l est l'effet du $l^{\text{ème}}$ sexe.

SHP_m est l'effet du $m^{\text{ème}}$ séjour hors province.

$SHPA_n$ est l'effet du $n^{\text{ème}}$ séjour hors pays.

e_{ijklmn} étant l'effet sur l'âge, le goût, la texture et l'appréciation générale de l'erreur sur la $i^{\text{ème}}$ province, la $j^{\text{ème}}$ région, la $k^{\text{ème}}$ profession, le $l^{\text{ème}}$ sexe, le $m^{\text{ème}}$ séjour hors province et le $n^{\text{ème}}$ séjour hors pays.

10. Détermination de l'activité protéasique

Le substrat est une solution d'hémoglobine dénaturée à $0,02 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ dans du tampon HEPES (acide N-2 hydroxyethylpiperazine - N' - ethanesulfonique) (Merck) $0,2 \text{ M}$ pH $7,5$ et contenant de l'urée $5,3 \text{ M}$ (33). Cinq ml de ce substrat sont incubés avec 1 ml d'extrait de mésocarpe à 40°C pendant $1 \text{ h } 30$. La réaction est arrêtée par précipitation avec 10 ml d'acide trichloroacétique à $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Le filtrat

est isolé et l'azote aminé du blanc et de l'essai est dosé par la méthode à l'o-phthaldialdéhyde (5). Une gamme étalon de leucine permet de déterminer la concentration en NH_2 libres. Le calcul du nombre de fonctions NH_2 libérées permet de calculer le degré de l'hydrolyse.

11. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Environ 50 μg de protéines de mésocarpe de *B. aegyptiaca* sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en gradient de 5 à 30%, en présence de dodécylsulfate de sodium selon la technique de Laemmli (19). L'échantillon, dilué au demi avec du tampon d'échantillon avec ou sans β mercaptoéthanol, est chauffé au bain-marie à 100 °C pendant 3 min. La migration est réalisée à une intensité constante de 35 mA jusqu'à ce que le témoin de migration parvienne au bas du gel. La coloration du gel se fait dans la solution de bleu de Coomassie R250. Des protéines de masses moléculaires connues (Sigma) ont été utilisées comme protéines de référence.

Résultats

1. Caractérisation préliminaire de l'extrait de mésocarpe

Les fruits de *B. aegyptiaca* pèsent en moyenne $5,9 \pm 1,2$ g l'unité. Les essais de macération de l'épicarpe puis du mésocarpe dans l'eau, ont montré que seuls les extraits de mésocarpe ont donné des temps de coagulation appréciables (20 à 30 min). La teneur en matière sèche du mésocarpe est en moyenne de 734 ± 5 g.kg⁻¹.

Le tableau 3 montre les combinaisons des conditions expérimentales testées pour obtenir une concentration du mésocarpe donnant des temps de coagulation les plus courts. L'analyse statistique a montré qu'il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre 9 et 12 h de macération. Les conditions optimum d'extraction sont donc 50 g de mésocarpe macérés dans 100 ml d'eau pendant 9 heures à 4 °C. Ces conditions conduisent à un extrait coagulant de force 1/200 comparé à la présure témoin.

Le pH de l'extrait est de $5,0 \pm 0,2$. Sa charge microbienne comporte des germes aérobies mésophiles (3.10^5 UFC.ml⁻¹) et des coliformes (5.10^2 UFC.ml⁻¹) mais pas du tout de spores de germes sulfito-réducteurs.

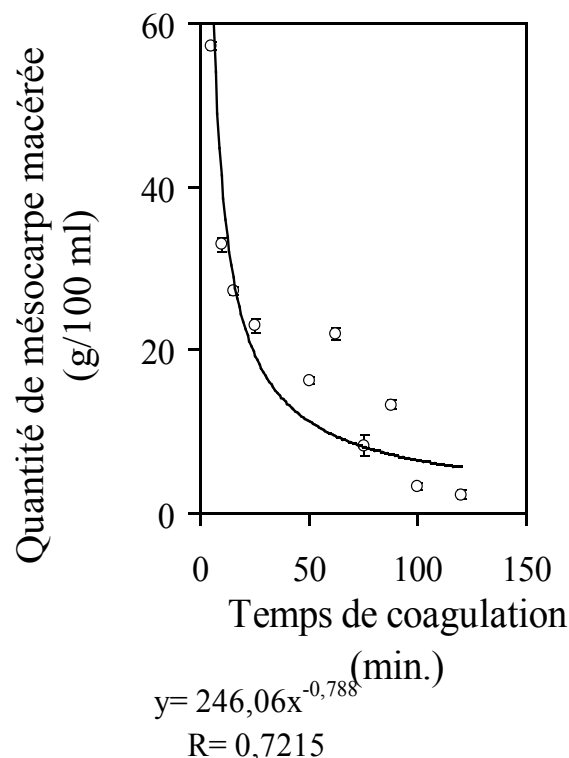


Figure 2: Electrophorèse de l'extrait brut de mésocarpe des fruits de *Balanites aegyptiaca*.

(Les puits A, B, D et E contiennent des protéines de référence; les puits C et F contiennent respectivement l'extrait brut de mésocarpe en l'absence puis en présence du β mercaptoéthanol. A droite les valeurs des masses moléculaires.

La figure 2 montre les variations du temps de coagulation du lait en fonction des quantités de mésocarpe macéré; ce temps diminue avec l'augmentation de la quantité de mésocarpe macéré passant de 57 min pour une concentration de mésocarpe de 0,05 g.ml⁻¹ à 2,3 min pour une concentration de 1,20 g.ml⁻¹.

La teneur moyenne en protéines des extraits aqueux ainsi obtenus est de 91 ± 14 mg.ml⁻¹. Ces extraits hydrolysent l'hémoglobine bovine en libérant 10 μM de $\text{NH}_2 \times \text{g}^{-1}$ d'hémoglobine $\times \text{g}^{-1}$ de protéine du mésocarpe. Cinq protéines majoritaires (Figure 3) ayant respectivement des masses moléculaires de 27, 30, 42, 44 et 90 kg $\times \text{mole}^{-1}$ ont pu être mises en évidence par électrophorèse en présence de SDS.

2. Fabrication des fromages

La masse volumique du lait de grand mélange de zébu est de 1.011 ± 10 g.l⁻¹ et sa matière sèche de 151 g.l⁻¹ (22). Pour les fabrications de fromage à l'aide de la présure, à partir d'un litre de lait, 403 g de fromage frais sont obtenus en moyenne, avec

Tableau 3
Meilleures conditions d'extraction de l'agent coagulant

Quantité de mésocarpe (g/ml)	Température de macération (° C)	Temps de coagulation (min)
0,5	4	$10,67 \pm 1,06$
0,7	4	$8,00 \pm 1,06$
1	20	$8,00 \pm 1,06$
1	40	$12,33 \pm 1,06$

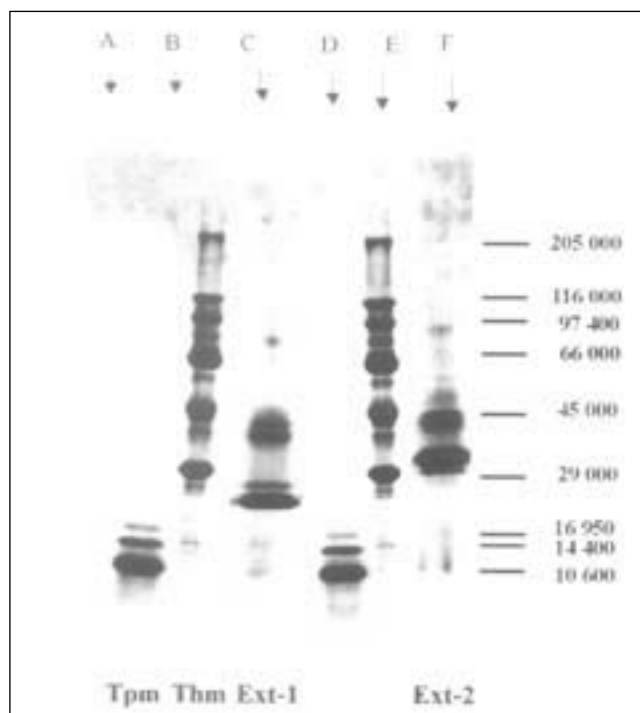


Figure 3: Variation du temps de coagulation du lait en fonction de la quantité de mésocarbe macérée.

un extrait sec total de 257,5 g.kg⁻¹. Les rendements fromagers bruts (R_{BR}) et en extrait sec total (R_{MS}) sont de 39,9% et 68,7%.

Avec les extraits de *B. aegyptiaca*, seulement 377 g de fromage sont fabriqués avec un extrait sec total de 237,5 g.kg⁻¹. Les rendements R_{BR} et R_{MS} sont respectivement de 37,3% et 59,3%.

Les fromages fabriqués à l'aide de la présure contiennent 123 ± 20 g de matières grasses par kg de fromage contre 137 ± 25 g.kg⁻¹ pour ceux fabriqués avec les extraits de mésocarbe de *B. aegyptiaca*.

3. Etude de la toxicité de l'extrait sur les souris

Ces souris consomment 16,8 g de granulés par jour,

ce qui correspond, dans la première expérience, à 0,4 g de matière sèche de mésocarbe.

En supposant qu'une personne adulte de 70 kg consomme 500 g de fromage frais par jour, et que, dans 1 kg de fromage toute la matière sèche provenant du mésocarbe (195 g) soit retrouvée, on peut calculer que la dose de mésocarbe ingérée est de 1,4 g par jour et par kg de poids vif. Ainsi, les souris du lot B ont été nourries avec un aliment contenant pratiquement 10 fois cette dose.

Le comportement des souris des lots B (test) n'a pas changé par rapport aux souris du lot A (témoin). L'évolution du poids des souris des différents lots est indiquée dans le tableau 4. Après 45 jours, pour les souris B, nourries avec les granulés contenant des extraits de mésocarbe, le poids moyen des souris a augmenté de 23 à 32 g alors que celui des souris témoin est passé de 21 à 34 g.

D'autre part, pour les souris nourries avec les granulés contenant des fromages, ce poids est passé de 26 à 35 g pour le lot C et de 26 à 33 g pour le lot D (test). D'après le tableau 5, aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les poids moyens des souris des deux lots, ceux de leur foie et l'hématocrite n'a pu être notée après 45 jours.

4. Analyse sensorielle

Dix-neuf personnes n'ont pas été admises au test triangulaire, ce qui représente 4,79% de la population totale.

Il y a une différence significative ($p < 0,05$) entre les dégustateurs qui ont réussi le test triangulaire et ceux qui ne l'ont pas réussi. De toutes les sources étudiées (province, région, profession, sexe, séjour hors de la province d'origine et séjour hors du pays), les seules variables dépendantes où l'analyse statistique a montré une différence significative ($p < 0,05$) à l'intérieur de la source, sont la «texture» et

Tableau 4
Evolution des poids des souris

Série 1: Souris nourries aux granulés contenant les extraits de mésocarbe de *B. aegyptiaca*.

Temps (jours)	Poids des souris (g)	
	Lot A (témoin)	Lot B (test)
0	21,42 $\pm$ 0,87a	23,09 $\pm$ 0,87a
45	34,00 $\pm$ 0,87a	31,99 $\pm$ 0,87a

Série 2: Souris nourries aux granulés contenant du fromage fabriqué avec soit de la présure, soit les extraits de mésocarbe de *B. aegyptiaca*.

Temps (jours)	Poids des souris (g)	
	Lot C (+ présure)	Lot D (+ extrait)
0	25,97 $\pm$ 0,73a	25,94 $\pm$ 0,73a
15	31,28 $\pm$ 0,73a	30,32 $\pm$ 0,73a
30	32,02 $\pm$ 0,73a	33,29 $\pm$ 0,73a
45	34,21 $\pm$ 0,73a	32,90 $\pm$ 0,73a

La même lettre placée à côté d'un chiffre indique qu'il n'y pas de différence significative ($p < 0,05$) entre les valeurs de la même période.

Tableau 5
Poids moyens des souris, de leur foie et hématocrite après 45 jours

Série 1: Souris nourries avec des granulés contenant des extraits de mésocarpe de *B. aegyptiaca*.

	Lot témoin (A)	Lot test (B)
Poids (g)	31,30 ± 0,91	31,40 ± 0,91
Hématocrite (ml.100 ml ⁻¹)	58,80 ± 1,67	57,30 ± 1,67
Poids du foie (g)	2,43 ± 0,11	2,35 ± 0,11

Série 2: Souris nourries avec des granulés contenant du fromage.

	Lot témoin (C)	Lot test (D)
Poids (g)	27,97 ± 0,61a	29,08 ± 0,61a
Hématocrite (ml×100 ml ⁻¹)	55,60 ± 1,40a	55,40 ± 1,40a
Poids du foie (g)	1,92 ± 0,09a	1,66 ± 0,09a

Les lettres identiques placées à côté des chiffres indiquent qu'il n'y a pas de différences significatives ($p < 0,05$) entre les valeurs du même paramètre des lots témoin et essai.

«l'appréciation générale» pour la province d'une part, et le goût et la profession d'autre part. Pour toutes les autres variables dépendantes, il n'y pas de différence significative à l'intérieur de la source.

La figure 4 montre les notations moyennes des «texture» et «appréciation générale» en fonction des origines provinciales des dégustateurs. Il existe une différence significative ($p < 0,05$) pour ces deux variables dépendantes à l'intérieur de la source «province». Parmi ces dégustateurs; 4,5% ont souhaité que la consistance de ce fromage soit augmentée.

De plus, cette analyse statistique a montré que la profession avait un effet sur l'appréciation du goût du fromage. Ainsi, les étudiants ont attribué une note de $2,8 \pm 0,4$; et les employés $3,9 \pm 0,7$; c'est dire que les étudiants apprécient modérément ce fromage alors que les employés ne l'apprécient que peu. La plupart des dégustateurs (61,5%) a souhaité que ce fromage soit sucré et aromatisé (43,75%). De plus, certains (3,75%) ont décelé une amertume dans le fromage; celle-ci proviendrait des mésocarpes.

Discussion

L'étude de la coagulation du lait provoquée par différents extraits du fruit de *Balanites aegyptiaca* a montré qu'un agent coagulant peut diffuser à partir du mésocarpe du fruit et non de l'épicarpe. Puisque les temps de coagulation du lait varient avec les concentrations de mésocarpe dans les solutions mises à macérer, il est probable que cet agent soit de nature enzymatique.

L'extrait de ce mésocarpe a un pH d'environ 5,0 ($\text{pH} = 5,0 \pm 0,2$); cette acidité entre bien dans la fourchette de pH 4,5 à 5,5 prônée par Gorreta (9). Sa charge microbienne est relativement importante puisque l'extrait coagulant ne devrait contenir ni germes aérobies mésophiles, ni coliformes (9). Une contamination d'origine extérieure peut donc être mise en cause. En effet, l'épicarpe est mince et

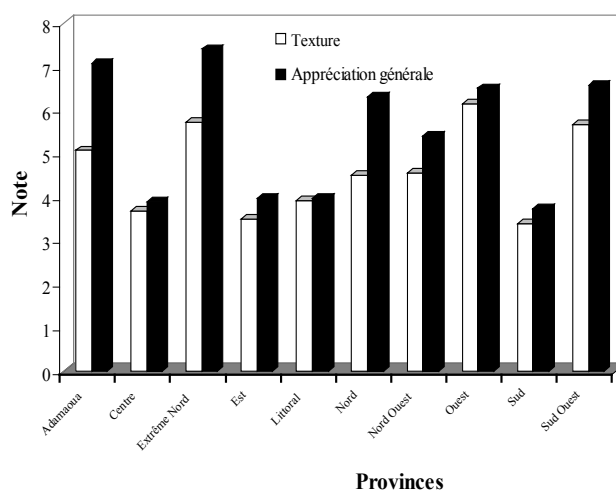


Figure 4: Appréciation des fromages selon les origines provinciales des dégustateurs.

dur mais peut se rompre au cours de la cueillette et du transport des fruits, laissant ainsi s'infiltrer des germes de contamination dans le mésocarpe. Une attention particulière devrait être portée sur la sélection des fruits devant servir de matière première pour la fabrication des extraits coagulants. Une étape d'assainissement pourrait être incorporée dans le procédé de fabrication. Elle consisterait à baisser pendant quelques instants le pH de l'extrait à des valeurs acides (pH 2) puis à le remonter à la valeur initiale comme cela est fait pour la présure (1). Cependant, l'extrait ne présente pas de germes sulfito-réducteurs, ainsi il n'y a pas de risque pour que le fromage présente des trous dus à la production de CO_2 .

Cependant, ni la charge microbienne, ni le milieu relativement acide de l'extrait ne suffisent à expliquer la coagulation du lait en des temps relativement courts (2 à 3 min). Puisque le mésocarpe contient la substance qu'il faudrait économiser, la meilleure combinaison est de laisser macérer 50 g de mésocarpe dans 100 ml d'eau à 4 °C entre 9 h et 12 h. Dans ces conditions, l'extrait de mésocarpe des

fruits de *B. aegyptiaca* obtenu a une force de 1/200. Cette force s'intègre dans le cas général des extraits coagulants d'origine végétale qui ont très souvent une faible activité coagulante par rapport à la présure (23, 31).

La teneur en protides de l'ensemble de la graine est de 0,32 g à 0,37 g.g⁻¹ (4, 28). Cette forte teneur en protide a fait penser à la préparation des concentrés protéiques (28). Le mésocarpe est riche en protéines (9,2%). Certaines de ces protéines ont une activité anthelmintique (16). D'autres auraient une activité protéasique. Par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, cinq bandes (A, B, C, D et E) sont visualisées. Elles correspondent respectivement à des protéines de masses moléculaires 90, 44, 42, 27 et 22 kg.mole⁻¹. Il est à noter que la protéine E présente une migration différente en présence de β mercaptoéthanol, migration correspondant à sa masse réelle de 30 kg.mole⁻¹. Il est probable qu'elle contienne de nombreux ponts disulfure qui perturberaient sa migration en milieu non réducteur. Les protéines B, C, D et E est pondéralement plus importantes alors protéine A est en faible quantité.

L'utilisation des extraits de mésocarpe de *B. aegyptiaca* donne des rendements en fromagerie plus faibles que la présure. Cette particularité est bien connue pour les extraits coagulants d'origine végétale (8, 23). Elle est due à la protéolyse plus poussée des caséines avec des pertes de matière sèche dans le lactosérum.

Il n'y pas eu de retard de croissance des souris, pas de nécrose ni d'hypertrophie des foies et pas de modification des fonctions hématopoïétiques même chez les souris nourries avec 10 doses de mésocarpe (ce qui correspondrait à la consommation de 5 kg de fromage par jour par un homme de 70 kg pendant 45 jours). L'effet antinutritionnel des sapogénines rencontrées dans les mésocarpes (13) est minimisé par le facteur de dilution. En effet, compte tenu de «l'emprésurage» (200 ml d'extrait par l de lait) du volume du lactosérum et de la masse du fromage, la quantité résiduelle de l'extrait de *B. aegyptiaca* dans le fromage est moins de 2,8 ppm. On peut conclure à la non toxicité des extraits de *B. aegyptiaca* incorporé dans le fromage. Ceci est conforté par une observation banale: par les populations locales qui

consomment couramment des pulpes des fruits de *B. aegyptiaca*, appelés également «date du désert» (21). Les résultats de l'analyse sensorielle ont montré qu'il n'y pas de différence significative à l'intérieur des sources (séjour hors province, hors pays,...etc) alors que l'on s'attendait à ce que les voyages aient un effet sur les habitudes alimentaires et que les filles aient un sens gustatif plus développé que les garçons. Par contre, la profession (étudiants ou fonctionnaires) a une influence sur l'appréciation du goût du fromage. Les notes relativement faibles attribuées par les étudiants (3, déteste modérément) puis les fonctionnaires (4, déteste peu) peuvent s'expliquer par l'absence du sucre et d'arôme dans les fromages. Quant à l'incidence des origines provinciales, globalement les notations se classent en deux groupes. Le premier groupe correspond aux dégustateurs provenant des provinces du centre, de l'est, du littoral et du sud: ils ont donné des notes de 3 et 4 respectivement pour la «texture» et «l'appréciation générale» indiquant par là qu'ils ont détesté peu ou modérément les fromages; il s'agit des populations vivant dans la forêt tropicale où l'élevage bovin est quasi inexistant tout comme la consommation des produits laitiers locaux. Ensuite le deuxième groupe est formé des dégustateurs des provinces de l'Adamaoua de l'extrême nord de l'ouest et du sud ouest: ils ont attribué des notes variables entre 5 et 7 pour la «texture» et «l'appréciation générale» indiquant ainsi qu'ils ont aimé le produit. Il s'agit des populations provenant des zones d'élevage bovin et où la consommation des produits laitiers est courante.

Il semble donc que l'extrait de mésocarpe des fruits de *Balanites aegyptiaca* puisse être utilisé comme agent coagulant en vue de fabriquer des fromages sans effet toxique sur la santé. Cependant des améliorations de l'aromatisation des fromages ainsi que de leur texture sont encore nécessaires avant leur commercialisation.

Des essais de purification de l'agent coagulant, en vue de sa caractérisation physico-chimique, sont actuellement en cours.

Remerciements

Les auteurs remercient Dr. M.D. Achukwi et Mme N.H. Fukamchwi pour l'analyse à l'hématocrite et R. Golsia pour l'assistance dans le traitement des souris.

Références bibliographiques

1. Anifantakis E. & Green M.L., 1980, Preparation and properties of rennets from lamb's and kid's abomasa. J. Dairy Res. 47, 221-230.
2. Berridge N.J., 1952, An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. J. Dairy Res. 19, 328-329.
3. El Khindar O.A., Gumaa A.Y., Fangali O.A.I. & Badir N.A., 1983, The use of *Balanites* kernel cake in a diet for fattening sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 9, 301-306.
4. Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H. & Catignani G.L., 1983, Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J. Dairy Sci. 66, 1219-1227.
5. Cook J.A., Vander Jagdt D.J., Pastuszyn A., Mounkaila G., Glew R.S. & Glew R.H., 1998, Nutrient content of two indigenous plant foods of the western Sahel: *Balanites aegyptiaca* and *Maerua crassifolia*. J. Food Comp. Anal. 11, 221-230.
6. Cordeiro M.C., Pais M., Salome & Brodelius P.E., 1994, Tissue specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. Physiologia-Plantarum, 92, 645-653.
7. Dupriez H. & Leener P., 1987, Jardins et vergers d'Afrique, Editions Harmattan, Paris, France.
8. Ernstrom C.A. & Wongt N.P., 1983, Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In: Webb B.H., Johnson A.H., Alford J.A. (Eds) Fundamentals of Dairy Chemistry, Westport, USA, pp. 662-771.
9. Gorreta L.J., 1980, Coalho e coagulantes. Revista do Instituto de

- lactícinos Cândido Tostes, 35, 17-21.
10. Guiraud J. & Galzy P., 1980, L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Collection Génie alimentaire, L'Usine Nouvelle (Ed.), Paris, France.
 11. Hall J.B., 1992, Ecology of a key African multipurpose tree species, *Balanites aegyptiaca* (Balanitaceae): the state-of-knowledge. Forest Ecol. Manag. 50, 1-30.
 12. Hamilton J.G. & El Naiem D.A., 2000, Sugars in the gut of the sandfly *Phlebotomus orientalis* from Dinder National Park, Eastern Sudan. Med. Vet. Entomol. 14, 64-70.
 13. Hardman R. & Sofowora E.A., 1971, Effect of enzymes on the yield of steroidal sapogenin from the epicarp and mesocarp of *B. aegyptiaca* fruit. Planta Med. 20, 124-130.
 14. Heimgartner U., Pietrzak M., Geersten R., Brodelius P., da Silva Figueiredo A.C. & Pais M.S.S., 1990, Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. Phytochemistry, 29, 1405-1410.
 15. Hurault J., 1975, Surpâturage et transformation du milieu physique. Formation végétales, hydrologie de surface, géomorphologie, l'exemple des hauts plateaux de l'Adamaoua (Cameroun), Institut Géographique National, Paris, France.
 16. Kamel M.S. & Koskinen A., 1995, Pregnane glycosides from fruits of *B. aegyptiaca*. Phytochemistry, 40, 1773-1775.
 17. Koko W.S., Galal M. & Khalid H.S., 2000, Fasciolicidal efficacy of *Albizia anthelmintica* and *B. aegyptiaca* compared with albendazole. J. Ethnopharmacol. 71, 247-252.
 18. Koko W.S., Abdalla H.S., Galal M. & Khalid H.S., 2005, Evaluation of oral therapy on Mansonial Schistosomiasis using single dose of *Balanites aegyptiaca* fruits and praziquantel. Fitoterapia, 76, 30-34.
 19. Köster E.P., 1990, Les épreuves hédoniques, in: Technique et Documentation Lavoisier (Ed.). Evaluation sensorielle. Manuel méthodologique, Paris, France.
 20. Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
 21. Letouzey R., 1968, Les botanistes au Cameroun Tome 7 in: Flore du Cameroun. Aubreville A. Muséum National d'Histoire Naturelle Laboratoire de Phanérogamie, Paris.
 22. Libouga D.G., Jiwoua Ngounou C.N. & Kouebou C.P., 2001, Etude du lait de zébu (*Bos indicus*) obtenu à N'Gaoundéré (Adamaoua, nord Cameroun). J. Cameroon Acad. Sci. 1, 14-19.
 23. Libouga D.G., Women H.M. & Mbofung C.M.F., 2004, A milk clotting agent from the bark of *Ongokea gore* tree. Trop. Sci. 44, 101-104.
 24. Libouga D.G., Essia Ngang J.J. & Halilou H., 2005, Qualités de quelques laits fermentés camerounais. Sci. Aliment, 25, 53-66.
 25. Llorente B.E., Brutti C.B. & Caffini N.O., 2004, Purification and characterization of a milk clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). J. Agric. Food Chem. 52, 8182-8189.
 26. Lopes A., Teixeira G., Liberato M.C., Pais M.S. & Clemente A., 1998, New vegetal sources of milk clotting enzyme. J. Mol. Catal. B-Enzym. 5, 63-68.
 27. Mohamed A.M., Wolf W. & Spiess W.E., 2000, Recovery and characterization of *B. aegyptiaca* Del. kernel proteins. Effect of defatting, air classification, wet sieving and aqueous ethanol treatment on solubility, digestibility, amino acid composition and sapogenin content. Nahrung, 44, 7-12.
 28. Mohamed A.M., Wolf W. & Spiess W.E., 2002, Physical, morphological and chemical characteristics, oil recovery and fatty acid composition of *B. aegyptiaca* Del. Kernels. Plant Food Hum. Nutr. 57, 179-189.
 29. Otani H., Iwagaki M. & Hosono A., 1991, The screening of trees having milk clotting activity, Anim. Sci. Technol. 62, 417-423.
 30. Otani H., Matsumori M. & Hosono A., 1991, Purification and some properties of a milk clotting protease from the young seeds of *Albizia julibrissin*, Anim. Sci. Technol. 62, 424-432.
 31. Parry R.M. Jr, 1983, Milk coagulation and protein denaturation pp. 662-771. In: Webb B.H., Johnson A.H., Alford J.A. (Eds), Fundamentals of Dairy Chemistry, Westport, USA.
 32. Recueil des normes françaises, 1980, Lait et produits laitiers. Méthodes d'analyse, Afnor (Ed.), Paris, France.
 33. Sarath G., De La Motte R. & Wagner F.W., 1989, Protease assay methods pp. 25-55. In: Beynon R.J. and Bond J.S. (Eds) Proteolytic enzymes: a practical approach, Oxford University Press UK.
 34. SAS Statistical Analysis Systems, 1991, Guide for personal computer. Vers. 603 Cary, NC, USA Institute Inc.
 35. Tamer I.M., 1993, Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. Biotechnol. Lett. 15, 427-432.
 36. Uchikoba T. & Kaneda M., 1996, Milk clotting activity of cucumisin, a plant serine protease from melon fruit. Appl. Biochem. Biotechnol. 56, 325-330.
 37. Yousif B.H., McMahon D.J. & Shammet K.M., 1996, Milk clotting enzyme from *Solanum dobium* plant. Int. Dairy J. 20, 637-644.

D. Libouga, Camerounais, DESS de laiterie, Doctorat 3^{ème} Cycle à l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Doctorat Nouveau Régime à l'Institut National de la Recherche Agronomique. B.P. 281, N'Gaoundéré, Cameroun.

Dominique Vercaigne-Marko, Française, Thèse d'Etat ès Sciences Naturelles, Option Chimie, Professeur de Biochimie à l'IUT «A» de Lille 1, Laboratoire de Technologies des Substances Naturelles, BP 179, F-59653, Villeneuve d'Ascq, Cedex- France.

Sana Longa Djangal, Camerounaise, Maîtrise en Biologie, Faculté des Sciences, Université de Ngaoundéré, BP 455, Ngaoundéré, Cameroun.

Choukambou Iliassou, Camerounaise, Maîtrise en Biologie, Faculté des Sciences, Université de Ngaoundéré, BP 455, Ngaoundéré, Cameroun.

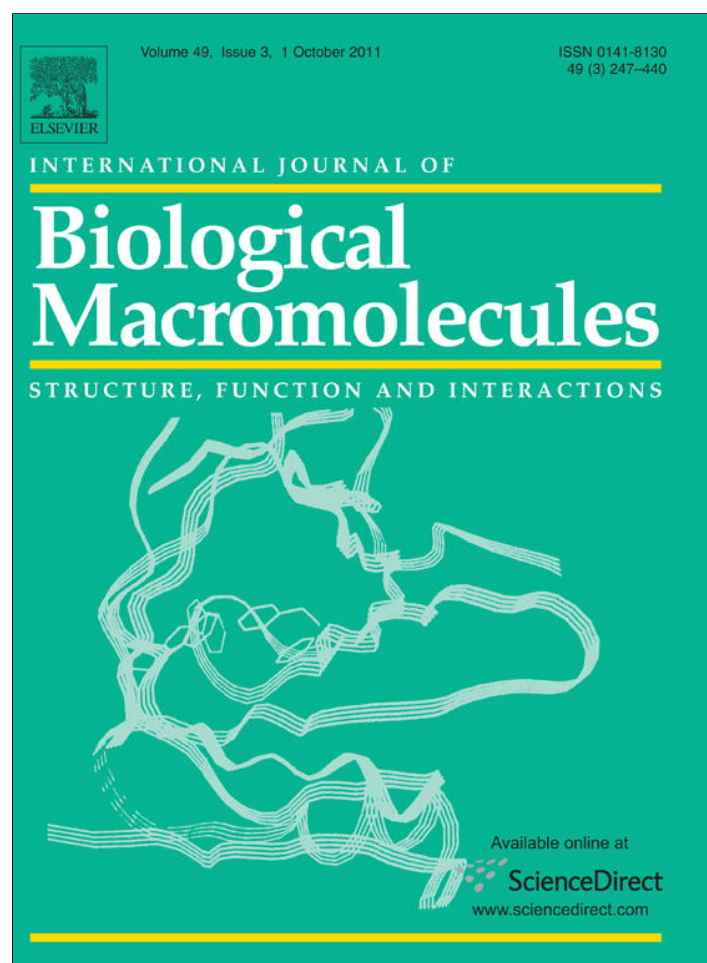
A.L. Ebang, Camerounais, B.Sc., Maîtrise, M.Sc., Ph.D. Animal Breeding and Genetics, Maître de Recherche (IRAD).

M. Ombionyo, Camerounais, Licence, Maîtrise, D.E.A., M.Sc., Ph.D. (Zootechnie).

R.G. Beka, Camerounais, Maîtrise de Biologie option zoologie, ENSAI de l'Université de Ngaoundéré, BP 455, Ngaoundéré, Cameroun.

D. Guillochon, Français, Maîtrise de Biochimie, DEA de Chimie Organique Structurale, Directeur du Laboratoire de Technologie des Sciences Naturelles, Université des Sciences et Technologies de Lille, Phyttech'Lille (Aile CIAAL); Boulevard Paul Langevin, Cité Scientifique, 59655 F-Villeneuve d'Ascq, Cedex- France.

ANNEXE 2



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

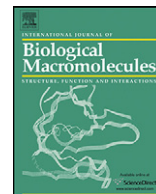
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomacGlycosyl part identified within *Balanites aegyptiaca* fruit proteaseR.G. Beka^{a,b,*}, V.D. Guiama^a, A. Delmont^c, P. Donn^a, M.-C. Slomianny^c, D.G. Libouga^a, C.M. Mbofung^a, D. Guillochon^b, D. Vercaigne-Marko^b^a Laboratoire de Biophysique et de Biochimie Alimentaire et Nutrition, Université de Ngaoundéré, BP 455-ENSAI-Ngaoundéré, Cameroun^b Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT "A", Polytech'Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille1, 59650 Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq, France^c Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF-UMR CNRS/USTL 8576, Batiment C9, Université des Sciences et Technologies de Lille1, 59650 Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2011

Received in revised form 3 May 2011

Accepted 19 May 2011

Available online 27 May 2011

Keywords:

Monosaccharides

Protease

B. aegyptiaca

Chromatography

Mass spectrometry

ABSTRACT

The many milk-clotting proteases from plant are glycosylated; attachment of monosaccharides to enzyme is an advantage for its activity and stability. In this study, gas chromatography coupled to mass spectrometry-electrospray ionization was used to identify glycans bond to proteases purified from *Balanites aegyptiaca* fruits pulp through cation exchange chromatography. Carbohydrates were identified according to the retention time and the ion at m/z after derivation by heptafluorobutyric acid. The chromatograms obtained from monosaccharides analysis revealed the presence of galactose, mannose, arabinose, xylose, rhamnose and glucuronic acid. The mass spectrometry-electrospray ionization spectra corroborated these findings.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Many African plants have known a growing interest due to their nutritional, medicinal and technological functions. Concerning technology, plant enzymes are mostly used in food manufacturing. Many of these enzymes break peptidic linkages; they are called proteases; whereas some have two parts: one protein and other non-protein which may be often glycosylated. In this case, proteases belong to the glycoprotein group. Glycoproteins are constituted by protein chain covalently linked to carbohydrates; they may contribute to the thermal stability, solubility and functional architecture of protease [1]. That is very significant in food technology.

Balanites aegyptiaca (Zygophyllaceae family, genus *Balanites*) is a widespread tree in arid and semi-arid zones of tropical Africa. However, it is mainly distributed in Middle East area [2]. According to the part of tree harvested, it is used as food and medicines. Its fruit is pulpy with a thin and hard epicarp, a dark brown mesocarp and a hard endocarp enclosing an oil seed. The pulp is bitter-sweet and edible [3]. That sweet taste reveals the presence

of carbohydrates, particularly oligosaccharides: glucose, galactose and rhamnose which are neutral monosaccharides largely found in plant extract [4,5].

More recently, the pulp of these fruits has shown the ability to clot milk due to their proteases [6]. Proteases, as other biological molecules (proteins and metabolites) are extrapolated as glycosylated within cells [7]. Identification of attached glycosylated types is therefore an important step in the study of these proteases structure and activity. However, there was no report focused on the glycosyl part of protease extracted from *B. aegyptiaca* pulp. This paper reports the purification of protease extracted from *B. aegyptiaca* fruits, then the identification of monosaccharides linked to protease.

2. Materials and methods

2.1. Materials

B. aegyptiaca fruits were obtained from Pitoa locality, North Region, Cameroon (9°23'N, 13°32'E). They were collected during the dry season, coat has been removed and flesh was used as pulp for preparation of extract. Standard proteins for sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) were from Fermentas (Life sciences, European Union). Chemicals used in this work are of reagent grade. All aqueous solutions were prepared using ultra-pure water.

* Corresponding author at: Laboratoire de Biophysique et de Biochimie Alimentaire et Nutrition, Université de Ngaoundéré, BP 455-ENSAI-Ngaoundéré, Cameroun. Tel.: +237 77 08 55 08.

E-mail address: bekarobertger2004@yahoo.fr (R.G. Beka).

2.2. Extract preparation

The extracts were prepared by macerating (180 g) of *B. aegyptiaca* fruits in 500 mL of 50 mM, pH 3 sodium citrate buffer overnight at 4 °C. The extract was then filtered through a folded standard filter paper to remove most of the solid residues. It was centrifuged at 4 °C for 30 min at 10,000 × g to eliminate the insoluble materials. The supernatant was concentrated approximately three times through a 10,000 Da cut off membrane (Millipore). The concentrated solution was then diafiltered against 50 mM, pH 4.5 acetate sodium buffer. The result treated for 10 min with 10% (w/v) of activated charcoal; mixtures were kept on ice for 30 min and centrifuged at 10,000 × g for 60 min at 4 °C according to Llorente et al. [8]. The supernatant resulting was crude extract.

2.3. Cation exchange chromatography of *B. aegyptiaca* crude extracts

Supernatant purification was carried out by high cation exchange chromatography Sulfohexyl (SP-Sepharose Fast Flow column) on a Flow Pressure Liquid Chromatography (FPLC) system (Pharmacia Uppsala, Sweden). The column was equilibrated and washed with 50 mM acetate sodium buffer, pH 4.5, and bound material eluted (0.5 mL min⁻¹) at 280 nm with a linear gradient of sodium chloride (0.15–1 M) in the same buffer. Eluted fractions (2 mL each) were collected and used to make experiments. Fractions containing purified extract kept at –20 °C until analysis.

2.4. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

B. aegyptiaca extracts were first electrophoretically separated using 12.5% SDS–PAGE according to Laemmli [9]. SDS–PAGE of enzyme samples was performed in a Miniprotean II cell (Bio-Rad). Samples were treated in denaturing buffer with SDS and β-mercaptoethanol and boiled for 5 min before SDS–PAGE. Electrophoresis was run at 100V until the bromophenol blue dye marker disappeared from the separating gel. Proteins were stained with 0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue in methanol/acetic acid/water (5:1:4) and destained by repeated washing in a methanol/acetic acid/water (2.5:1:6.5) solution.

2.5. Monosaccharides identification

Aliquots of 100 µg of proteases was methanolysed with 0.5 mL methanolic HCl 0.5 M for 16 h at 80 °C. After evaporation under a stream of nitrogen, the released methyl glycosides were dissolved in 200 µL anhydrous acetonitrile, and peracylated by adding 25 µL heptafluorobutyric (HFB) anhydride, the reaction was conducted at 150 °C for 30 min. After evaporation under a stream of nitrogen, the perheptafluorobutyl-1-*O*-methylglycosides was resulted, and they were dissolved in anhydrous acetonitrile. Samples were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry electrospray ionisation (GC/MS-EI) on a Thermo Scientific Quantum (TSQ) with triple quadrupole mass detector, equipped with a 30 m × 0.25 mm SGE Forte SolGel-1/MS capillary column (dimethyl polysiloxan, non-polar) and 0.25 µm film phases; after ionisation through electron impact. The analysis of samples followed a linear gradient of 1.2 °C min⁻¹ from 100 to 140 °C, then a gradient of 4 °C min⁻¹ until 240 °C [10].

3. Results and discussion

3.1. Purification of protease extracted from *B. aegyptiaca* fruits

Protease from the *B. aegyptiaca* fruits was purified by a simple procedure involving cation-exchange chromatography. Crude

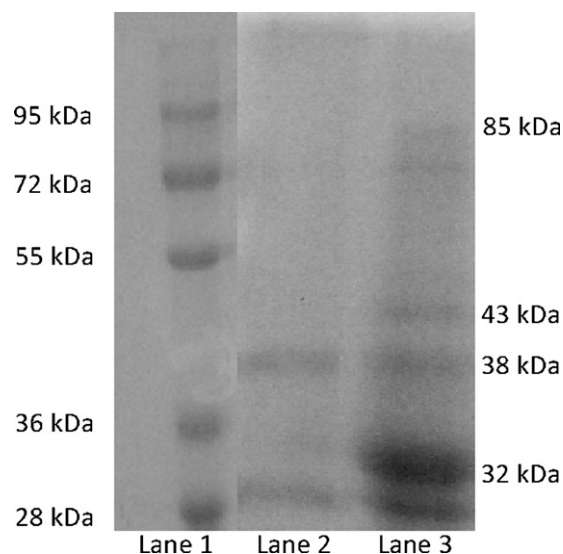


Fig. 1. SDS–PAGE pattern of purified enzyme from *Balanites aegyptiaca* fruits. Lane 1, molecular markers; lane 2, purified enzyme; lane 3, crude enzyme.

extract was applied to a SP-Sepharose Fast Flow column. The bound proteins were eluted with a linear gradient of 0.15–1 M NaCl. Eluted fraction having caseinolytic activity (data not shown), was submitted to SDS–PAGE; and resulted in two bands, which are distinctly different in molecular size (Fig. 1). Lane 2 corresponding to purified extract which exhibited two different bands in molecular mass, respectively estimated to 28 kDa and 38 kDa.

These results can be compared with protease from *Jacaratia corumbensis* which revealed a protein with a molecular mass of approximately 33 kDa [11]. Another study conducted for purification of extract from *Cynara cardunculus* flowers by ion exchange chromatography showed bands with molecular mass 30–15 kDa on purified extract [12]; while work on *Lactuca sativa* leaves gave a single band with an apparent molecular weight of 40 kDa [13].

3.2. Detection of glycosyl part attached to protease

Generally, carbohydrate moieties attached to the protease surface are an important tool to regulate its stability [14]. They also have an important role in the activity, solubility and protect them from degradation [15]. Glycosylated part of proteases from *B. aegyptiaca* fruits was detected against lysine used as internal standard. Fig. 2 exhibited some peaks which suggested the presence of glycosylated carbohydrates according to retention time.

The GC/MS-EI chromatogram of methylglycosylated sample is depicted in Fig. 3 and shows profile according to signal (*m/z*) and retention time. Total ionic current profile was significant to reveal monosaccharides. Therefore, signal corresponding to the ion at *m/z* 479.0 indicated the presence of pentosyl group; that of the ion at *m/z* 492.0 indicated the presence of deoxyhexose; while the ion at *m/z* 509.0 or 519.0 indicated the presence of hexosyl group, and ion at *m/z* 537.0 indicated uronic acid. In this work the attached monosaccharides to protease was detected by GC/MS-EI. However, carbohydrates content of many protease plant extract was determined by the phenol sulphuric acid method with galactose as standard, and confirmed by staining with Schiff's reagent after SDS–PAGE [16]. To the best of our knowledge, this is the first report that identified the glycosyl part of protease extracted from *B. aegyptiaca* fruits.

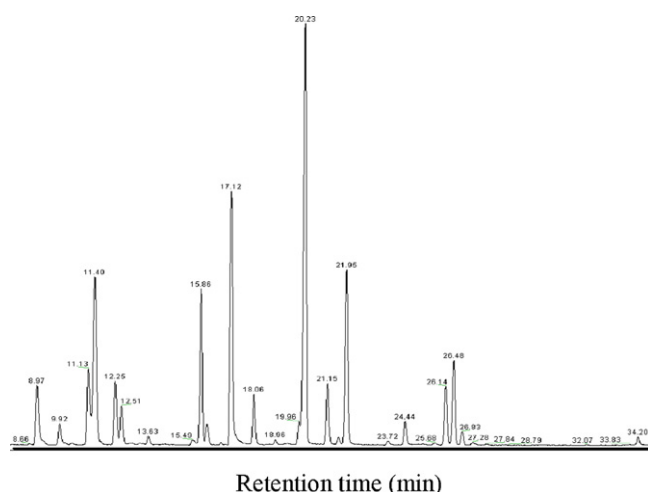


Fig. 2. Chromatogram obtained by gas chromatography–mass spectrometry–electrospray ionisation. Mass detector was triple quadrupole TSQ Quantum gas chromatography of Thermo Scientific. Stationary phase was non polar with dimethyl polysiloxan in SolGel matrix. Lysine was used as internal standard. Retention time indicated the presence of some monosaccharides.

3.3. Identification of monosaccharides

Hexoses, deoxyhexoses, pentoses, hexosamines, sialic and uronic acids are glycoconjugates that constitute the glycosylated part of glycoprotein. It is too fascinating to find exactly which of that carbohydrate linked to protease extracted from *B. aegyptiaca* fruits. Total ionic current (Fig. 3a), ions at m/z combined with retention time allowed to identify some monosaccharides attached to the glycoprotein of *B. aegyptiaca* extract.

3.3.1. Hexoses

Two hexoses were identified according to retention time and the ions at m/z (Fig. 3d and f). First was identified at retention time of 20.22 min and to the ion at m/z 519.0, which suggested the pool of galactose (Fig. 3d). Second hexose was found at retention time of 21.14 min and to the ion at m/z 509.0, which indicated the presence of mannose (Fig. 3f). These results were specified by MS–EI spectra from (Fig. 4a). Proteases from *B. aegyptiaca* fruits having glycosylated part which may be galactose or mannose.

3.3.2. Pentoses

Fig. 3b shows the presence of two pentoses. Peak retained at 11.40 min and to the ion at m/z 479.0 signal the presence of arabinose. Xylose profile gave two peaks with retention time of 12.25 and 12.51 min for the same ions at m/z . MS–EI spectra from precised that arabinose and xylose being in the glycosylated part of proteases (Fig. 4b).

3.3.3. Deoxyhexose

Identification of deoxyhexosyl part was shown in Fig. 3c. The retention time of 11.13 min and to the ions at m/z 492.0 sug-

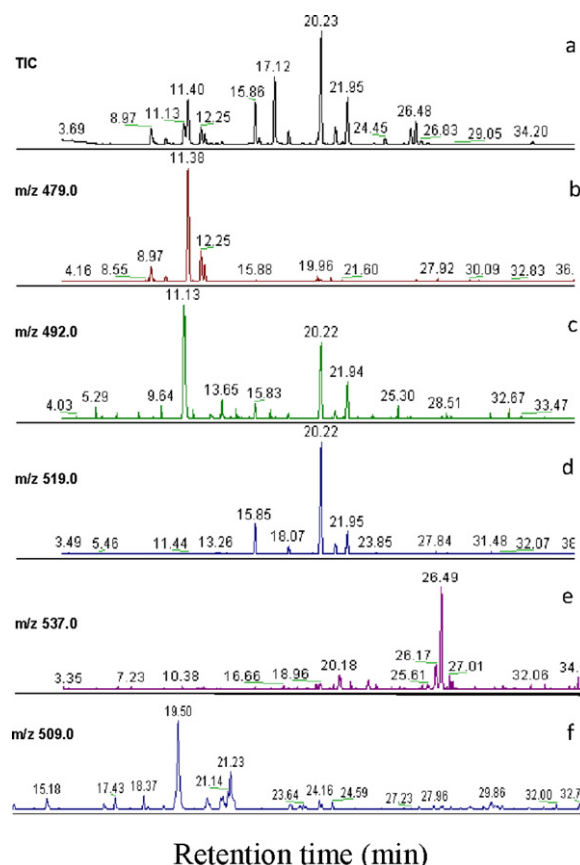


Fig. 3. Comparison of chromatogram according to signal (m/z) and retention time. Gas chromatography coupled to mass spectrometry–electrospray ionisation. (a) TIC: total ionic current; ions at m/z combined with retention time allowed to identify some monosaccharides families. Therefore, (b) m/z 479.0 corresponds to pentoses (xylose and arabinose); (c) m/z 492.0 corresponds to deoxyhexose (rhamnose); (d and f) m/z 509.0–519.0 corresponds to hexoses, respectively to mannose and galactose. (e) m/z 537.0 corresponds to uronic acid (glucuronic acid).

gested the presence of rhamnose. MS–EI spectrum corroborated that rhamnose is one of the monosaccharide being in the carbohydrate part of proteases (Fig. 4c).

3.3.4. Uronic acid

Uronic acid group consists of two acids: glucuronic and galacturonic. According to retention time and the ions at m/z uronic acid was identified. Chromatogram profile from Fig. 3e indicated the presence of glucuronic acid with two peaks, at 26.17 and 26.49 min as retention time and to the ions at m/z 537.0. This result is consistent with MS–EI spectrum (Fig. 4d).

It is obvious that proteases from *B. aegyptiaca* fruits are glycosylated. GC/MS–EI through HFB derivation was allowed to identify galactose, mannose, arabinose, xylose, rhamnose and glucuronic acid as glycosylated part of protease (Table 1). However, glucose,

Table 1

GC–MS analysis of glycosyl part of proteinase extracted from *Balanites aegyptiaca* fruits through HFB derivation.

Retention time (min)	Characteristic fragment ions (m/z)	Specific observed ions (m/z)	Monosaccharide assignment
21.14	509–519	509	Mannose
11.40	479–265–325	479	Arabinose
11.13	279–492	492	Rhamnose
12.25–12.51	479–265–325	479	Xylose
20.22	509–519	519	Galactose
26.17–26.49	323–537–597	537	Uronic acid

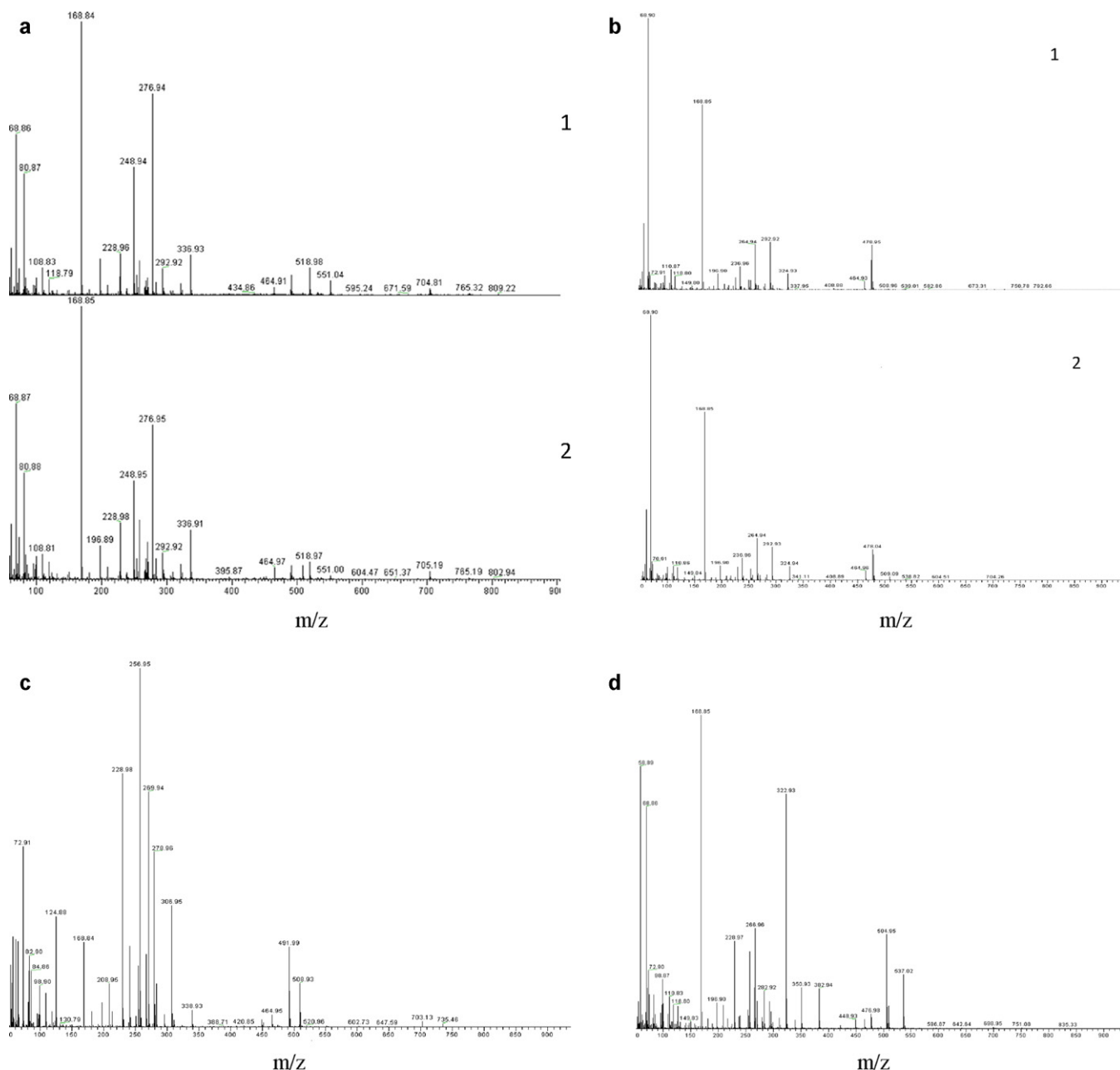


Fig. 4. (a) MS-EI spectra of hexose. 1: spectrum of galactose, 2: spectrum of mannose. (b) MS-EI spectra of pentose. 1: spectrum of arabinose 2: spectrum of xylose. (c) MS-EI spectrum of deoxyhexose (rhamnose). (d) MS-EI spectrum of uronic acid (glucuronic acid).

hexosamine and sialic acid residues were not detected in the purified extract from *B. aegyptiaca* fruits. The identification of monosaccharides bond to proteases is a key to determine of its structure. Further works are needed to quantify monosaccharides content in these proteases extract. Glycans large-scale of that purified extract suggests that it might be useful for industrial and biotechnological applications.

Acknowledgements

The authors wish to express their thanks to Bertrand Fertin and Laurent Bonneau for technical help. This work was supported by research grants of the Nord-Pas de Calais Region in France and AUF (Agence Universitaire de la Francophonie).

References

- [1] I.A. Mohamed Ahmed, I. Morishima, E.E. Babiker, N. Mori, *Phytochemistry* 70 (2009) 483–491.
- [2] H.J. Von-Maydell, Eschborn: GTZ, 1983, 531 p.
- [3] R. Hardman, E.A. Sofowora, *Planta Medicinal* 20 (1971) 124–130.
- [4] L. Bravo, *Nutrition Reviews* 56 (1998) 317–333.
- [5] P.C. Hollman, M.B. Katan, *Archives of Toxicology Supplements* 20 (1998) 237–248.
- [6] D.G. Libouga, D. Vercaigne-Marko, D. Sana Longa, I. Choukambou, A.L. Ebangi, M. Ombionyo, R.G. Beka, D. Guillochon, *Tropicultura* 24 (2006) 229–238.
- [7] M. Arita, T. Tokimatsu, *International Conference on Genome Informatics* 19 (2007) 3–14.
- [8] B.E. Llorente, C.B. Brutti, N.O. Caffini, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 8182–8189.
- [9] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [10] J.P. Zanetta, P. Timmerman, Y. Leroy, *Glycobiology* 3 (1999) 255–266.
- [11] A.R. Duarte, D.M.R. Duarte, K.A. Moreira, M.T.H. Cavalcanti, J.L. Lima-Filho, A.L. Figueiredo, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52 (2009) 1–9.

- [12] S.V. Silva, T. Allmere, F.X. Malcata, A. Andrén, *International Dairy Journal* 13 (2003) 559–564.
- [13] A.R. Lo Piero, I. Puglisi, G. Petrone, *Journal of Agricultural and Food Chemical* 50 (2002) 2439–2443.
- [14] M.M.A. Van Teeffelen, K. Broersen, D.E.H.J. Jongh, *Protein Science* 14 (2005) 2187–2194.
- [15] M. Pande, V.K. Dubey, S.C. Yadav, M.V. Jagannadham, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 10141–10150.
- [16] E.F. Hounsell, M.J. Davies, K.D. Smith, in: J.M. Walker (Ed.), *Chemical Methods of Analysis of Glycoprotein, the Protein Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa, 1997, pp. 633–634.

RESUME

Dans le cadre de la recherche d'un succédané à la présure, la pulpe des fruits de *B. aegyptiaca* a été utilisée comme source d'enzyme coagulant. Les fruits ont été assainis par lavage et traitement à l'eau de javel. Une solution de NaCl 5 % a été utilisée comme milieu d'extraction. Le processus de purification est constitué des étapes suivantes: clarification au charbon actif et par diafiltration, chromatographies d'exclusion et d'échanges d'ions. Des études rhéologiques physico-chimiques et sensorielles ont été effectuées sur des fromages obtenus avec cet extrait. Les résultats de cette étude montrent qu'une protéase de 38 kDa a été isolée en milieu acide et trois protéases de 28, 70 et 85 kDa en milieu basique. Les tests sur les inhibiteurs, les analyses en MALDI-TOF couplée à la LC-MS et la digestion du gel de gélatine montrent que la protéase isolée en milieu acide est une protéase à acide aspartique tandis que celles isolées en milieu basique sont des protéases à sérine. Les protéases isolées sont capables d'hydrolyser les caséines α , β et κ . Le galactose, l'arabinose, le rhamnose, le xylose, le mannose, l'acide glucuronique et les hexosamines ont été détectés sur la partie glycosylée de ces protéases par GC/FID et GC/MS-EI. Cependant, la détection aux lectines a montré la présence du mannose et du fucose. Les paramètres physico-chimiques et organoleptiques montrent que le fromage obtenu avec l'extrait est comparable au fromage présure. Cette étude a montré que les protéases de l'extrait de la pulpe de *Balanites aegyptiaca* sont capables de remplacer la présure dans la fabrication des fromages locaux. Ce travail peut contribuer significativement au développement économique des localités agro-pastorales du Cameroun.

Mots clés: *Balanites aegyptiaca*, enzyme coagulant, fromages, aspartique protéase, sérine protéase, glycoprotéine.

ABSTRACT

In the framework of the search for a substitute to calf rennet, the pulp of the *B.aegyptiaca* fruits was used as source of milk-clotting enzyme. The fruits were cleaned by washing and treatment with sodium hypochlorite. The NaCl 5 % solution was used as medium of extraction. The purification process was made up of the following stages: clarification with activated charcoal and diafiltration, exclusion and ion exchange chromatographies. Physicochemical, rheological and sensory properties of cheese obtained with this vegetable rennet were studied. The results of this study showed that a protease of 38 kDa was extracted in acid medium and three proteases of 28, 70 and 85 kDa in basic medium. The inhibition test, MALDI-TOF analysis coupled with LC-MS and gelatin digestion by protease showed that the protease extracted in acid medium is aspartic while those isolated in basic medium are serine proteases. The isolated proteases are able to hydrolyze α , β and κ caseins. Galactose, arabinose, rhamnose, xylose, mannose, glucuronic acid and hexosamines were detected on the glycosyl part of these proteases by GC/FID and GC/MS-EI. However, detection with the lectins showed in more the presence of mannose and fucose. The physicochemical and organoleptic parameters showed that the cheese obtained with the extract is comparable with the standard cheese. This study showed that the proteases of the extract of the pulp of *Balanites aegyptiaca* are able to replace calf rennet in the manufacture of local cheeses. This work can contribute significantly to the economic development of the agro-pastoral localities of Cameroon.

Key words: *Balanites aegyptiaca*, milk-clotting enzyme, cheeses, aspartic protease, serine protease, glycoprotein.