

**Extrait des écorces de l'*Ongokea gore*: protéolyse et conservation****David Gabriel LIBOUGA<sup>1</sup>, Hilaire Macaire WOMENI<sup>2</sup> et Laurent BITJOKA**

École Nationale Supérieure des Industries Agro-alimentaires du Cameroun

B.P. 455, N'GAOUNDÉRE - Cameroun

**RÉSUMÉ****Activité protéolytique et conservation de l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore***

L'extrait coagulant étudié a été obtenu en macérant les écorces de l'*Ongokea gore* dans du  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 3 % (p/v). Les caractéristiques des gels obtenus avec cet extrait ont été comparés à celles obtenues avec la pepsine bovine et la présure ; leurs activités protéolytiques ont aussi été comparées. La stabilité des activités coagulante et protéolytique de l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* tout comme celle de la charge microbienne au cours de la conservation à différentes températures (-18 à +30 °C) pendant plusieurs jours (0 à 60 jours) ont été étudiées. La fermeté des gels obtenu avec du lait reconstitué a été mesurée à l'aide du formagraph. La protéolyse a été mesurée sur une solution de caséine à 3 % (p/v) suivie de la détermination de l'azote non protéique dans le filtrat trichloracétique à la concentration finale de 12 % (p/v). L'activité coagulante est obtenue en mesurant le temps de floculation du lait à 30 °C. Le dénombrement de la flore totale a été fait sur milieu solide *Plate Count Agar* (+30 °C, 3 jours), celle de la flore caséolytique sur milieu gélosé à base de lait (+30 °C, 3 jours). Les gels obtenus avec les extraits des écorces de l'*Ongokea gore* se raffermissent beaucoup plus lentement que ceux obtenus avec soit la présure soit la pepsine. L'activité protéolytique des écorces de l'*Ongokea gore* importante et non spécifique ; elle est au moins huit fois supérieure à celle de la pepsine bovine et se poursuit encore au-delà de 8 h ; elle admet un maximum à +54 °C pour l'extrait des écorces. La charge microbienne de l'extrait brute des écorces de l'*Ongokea gore* est très importante mais le traitement préalable des écorces pulvérisées par l'éthanol et l'hypochlorite permet d'assainir le milieu ; cette mesure d'hygiène s'impose donc dans toute préparation. À -18°C, les activités coagulante et protéolytique diminuent rapidement dans les 5 premiers jours puis se stabilisent ; à +4°C les variations ne sont pas significatives ( $p < 0,05$ ) dans les 30 premiers jours par contre à +30 °C les pertes sont importantes (42 %). La charge microbienne croît avec l'augmentation de la température d'une part et de la durée de conservation d'autre part. On suggère de conserver les extraits coagulants des écorces de l'*Ongokea gore* à +4 °C pendant un maximum de 7 jours.

**Mots clés** Coagulation, conservation, *Ongokea gore*, protéolyse, température

**ABSTRACT****Proteolysis and conservation of *Ongokea gore* barks extracts**

By macerating the barks of *Ongokea gore* in 3 %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , an extract that coagulated milk was obtained. The characteristics and proteolytic activity of the gels obtained with the extract were compared to those obtained with bovine pepsin and rennet. Studies were carried out for several days (0 to 60) on the stability of the coagulation and proteolytic activities of extracts of *Ongokea gore* barks. These were equally carried out on microbial load in the course of conservation at different temperature (-18 to + °C). The hardness of gels obtained with reconstituted milk was measured with a formagraph. Proteolysis was determined on 3 % (w/v) casein solution. This was followed by determination of non protein nitrogen in the trichloroacetic acid filtrate at a final concentration of 12 % (w/v). The coagulating activity was obtained by measuring the milk clotting time at 30 °C. The counting of total flora was done on solid plate count agar medium (30 °C, 3 days). That of the caseolytic flora was done on milk based gel medium (30 °C, 3 days). The growth of the firmness of gels obtained with *Ongokea gore* barks extracts was lower than that obtained with either bovine pepsin or rennet. The proteolytic activity of *Ongokea gore* barks was significant and non specific. It was at least eight times greater than that of bovine pepsin. Its maximum activity was around 54 °C. The microbial load of raw extract of *Ongokea gore* was very high but the treatment of *Ongokea gore* bark with both ethanol and sodium hypochlorite allowed for the reduction of this microbial load ; so hygienic measures are necessary for this preparation. Coagulating and proteolytic activities diminished rapidly at -18 °C during the first 5 days then stabilised whereas at +4 °C, there was no significant variation ( $p < 0.05$ ) during the first 30 days. On the other hand at +30 °C loses are significant (42 %). The microbial load increased with increase in temperature on one hand and on the other hand the length of conservation. It is suggested that extracts of *Ongokea gore* barks can be conserved at +4°C for a maximum of 7 days and employed for coagulating milk.

**Key words** Coagulation, conservation, *Ongokea gore*, proteolysis, temperature

Faculté des Sciences

Université de Dschang

<sup>1</sup>À qui toute correspondance devrait être adressée.<sup>2</sup>Etudiant au Diplôme d'Études Approfondies.

## INTRODUCTION

La présure est abondamment utilisée dans l'industrie fromagère cependant sa rareté et les difficultés de son approvisionnement conduisent les chercheurs à trouver d'autres sources d'extraits coagulants non seulement à partir des micro-organismes mais aussi à partir des végétaux : *Albizia julibrissin* (OTANI *et al.*, 1991<sub>a</sub>), *Bennicasa cerifera* (GUPTA et ESKIN 1977), *Calotropis procera* (AWORH et MULLER 1987), *Carica papaya* (HAMDY *et al.*, 1976), *Cartamus tintorius* (TAVASOLIAN et SHABBAK 1979), *Cynara* (CORDEIRO *et al.*, 1992; MACEDO *et al.*, 1993), *Onopordum turcicum* (TAMER, 1993) et *Wrightiana calysina* (HOSONO 1985; OTANI *et al.*, 1985; OTANI *et al.*, 1991<sub>b</sub>). Certaines de ces protéases ont été utilisées avec succès en fromagerie (VIERA DE SÀ et BORBOSA, 1972 ; ERNSTROM et WONG, 1983). Le fromager appréciera d'autant plus un nouvel extrait coagulant qu'il a des caractéristiques proches de la présure voire de la pepsine bovine. Parmi les critères de choix d'un extrait coagulant figurent ses caractéristiques physico chimiques, ses activités coagulante et protéolytique, sa charge microbienne et son aptitude à la conservation. GORRETA, 1980 a proposé des valeurs limites de la densité, de la matière sèche et de la matière organique. Le temps de floculation et par suite l'activité coagulante permettent de connaître la force d'un extrait coagulant et donnent au fromager une idée sur la fermeté du gel donc sur le temps de tranchage du caillé. Un extrait coagulant très protéolytique conduit à une hydrolyse poussée des caséines  $\alpha$   $\beta$  et  $\kappa$  ; il s'en suit des pertes des substances azotées dans le lactosérum et donc baisse du rendement fromager ; de plus les fragments peptidiques de la caséine  $\beta$  pourraient donner un goût amer aux fromages. L'extrait coagulant doit être indemne des germes pathogènes qui pourraient se développer d'autant mieux dans le lait pasteurisé que celui-ci aura été assaini. Le cas échéant, des conséquences néfastes se manifesteront sur les fabrications fromagères. Enfin les fromagers apprécieront d'autant plus un extrait coagulant qu'il a une bonne aptitude à la conserver : stabilité des activités coagulante et protéolytique tout comme celle de la flore microbienne. En dehors de WOMENI *et al.*, (1997) les chercheurs ne se sont pas intéressés à l'action des extraits des écorces de l'*Ongokea gore* sur le lait. L'objectif de ce travail est de préparer un extrait coagulant à partir des écorces de l'*Ongokea gore*, de comparer les caractéristiques du gel obtenu avec cet extrait à celles obtenues avec de la présure et la pepsine bovine, de comparer les activités protéolytiques de ces extraits coagulants et de suivre la conservation de l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore*. L'*Ongokea gore* est un arbre de la forêt tropicale humide rencontrée au Cameroun, au Ghana et à l'ex-Zaïre (ASHIABOR, 1972; VILLIER, 1973). Il mesure 8 à 10 m de haut et peut être identifié par la taille de son tronc, son écorce et ses feuilles (DETIENNE, 1991); son bois jaune est naturellement résistant contre la biodégradation due aux moisissures et aux termites (TSUNODA, 1990) et ses fruits contiennent des acides gras acétyléniques incorporés aux triglycérides (MILLER *et al.*, 1977<sub>a</sub>, 1977<sub>b</sub>). L'écorce de cet arbre n'est pas utilisée en agro alimentaire mais dans la pharmacopée africaine. La décoction de l'écorce est utilisée comme boisson purgative au Gabon (RAPONDA – WALKER et SILLIANS, 1961). Au Congo, pour garantir aux bébés de belles selles, on frotte les écorces fraîches de l'*Ongokea gore* sur le bout des seins si bien que le bébé absorbe le remède en même temps que le repas ; ce traitement a aussi l'avantage d'augmenter la sécrétion lactée et de prévenir les abcès des seins (BOUQUET, 1969).

## MATERIEL ET METHODES

### Mesures physico chimiques

La densité est obtenue par pesée des volume connus à 30 °C. La matière sèche a été déterminée par séchage à l'étuve à 105 °C jusqu'à poids constant, les cendres par incinération au four à moufle à 550 °C, la matière organique par différence entre la matière sèche et les cendres et l'azote par Kjeldahl selon le l'ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (1980).

### Réactifs, substrats et extraits coagulants

Tous les réactifs chimiques (NaOH, HCl, tyrosine, CaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O ... etc) sont de de Riedel de-Haën (Seelze, Allemagne) ; le réactif de Folin Ciocalteu est de Sigma (Saint Louis, Missouri, U.S.A.).

Le poudre de lait (*spray low heat*, lot N° 4) provient de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique (Poligny, France). Le lait reconstitué (substrat de Berridge) est obtenu en dissolvant 12 g de la poudre de lait dans 100 mL de CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O 0,01 M.

La présure (essais au formagraph, 99,5 % d'activité due à la chymosine ) est des Etablissements Boli (Arpajon, France) et celle (Extrait de présure Carlin) utilisée pour calibrer l'extrait végétal est de Texel (Groupe Rhône – Poulenc, Dangé – Saint – Romain, France) ; elle contient un minimum de 520 mg de chymosine par litre et sa force est de 1/10 000. La pepsine bovine en poudre est de Riedel de-Haën (Seelze, Allemagne).

L'*Ongokea gore* a été identifié à Makak (agglomération située à 3°33' longitude est, 11°02' latitude nord; LETOUZEY, 1968) par les services de l'Office Nationale de la Régénération des Forêts (ONAREF). Ses écorces fraîches ont été prélevées puis tamisées (mailles du tamis: 2 mm). Ces écorces sont éventuellement stérilisées par la méthode décrite par FIGUEIREDO *et al.*, 1987 : immersion dans l'éthanol (70 %) pendant 30 mn puis dans l'hypochlorite de sodium (6 %) pendant 30 mn. L'extrait coagulant de l'*Ongokea gore* est obtenu en macérant 75 g de poudre des écorces fraîches de l'*Ongokea gore* dans 100 ml de CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O à 3 % (4 °C, 12 h) en présence de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> à 2 % (v/v) (ANIFANTAKIS *et al.*, 1980) suivi d'une filtration sur papier whatman et d'une centrifugation (10 000 g, 4 °C, 15 mn). Le surnageant a été traité de deux façons : dans un cas on a procédé à une filtration à travers des membranes de porosité 2 µ (Millipore) et à une concentration par ultrafiltration dans une cellule Amicon (Amicon, Éperon, France) à l'aide d'une membrane ayant un seuil de coupure de 10 k Da ; l'ultrafiltration est arrêtée quand le temps de floculation obtenu avec le concentrât, était de 20 mn environ ; il a été vérifié que l'activité coagulante de l'ultrafiltrat était négligeable devant celle du concentrât. Dans un autre cas cet extrait est dessalé par dialyse contre de l'eau distillée (4 °C, 48 h) avec une membrane ayant un seuil de coupure de 3,5 k Da puis stérilisé par filtration (filtres Sartorius Minisert de porosité 0,2 µm).

#### Déterminations de l'activité coagulante et de la force des extraits coagulant

La mesure du temps de coagulation se fait par la méthode de BERRIDGE (1952) et COLLIN *et al.* (1977) en mettant 10 ml de lait reconstitué et 0,5 ml de solution coagulante dans un tube à essais plongé au bain-marie à 30 °C. Le temps de floculation (t) est celui qui s'écoule entre l'introduction de l'extrait coagulant dans le tube à essai et le moment où il se forme un mince film sur les parois intérieures de ce tube à essai. L'activité coagulante est exprimée en unité présure (UP). Une unité présure est la quantité d'enzyme contenue dans 1 ml de solution coagulante et qui peut coaguler 10 ml de substrat en 100 secondes à 30 °C autrement dit

$$UP = 10 \times V / t \times v$$

V et v sont respectivement les volumes (ml) du lait et de l'extrait coagulant et t le temps de floculation exprimé en seconde.

Les activités coagulantes de 18 échantillons d'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* repartis en 3 lots et conservés le 1<sup>er</sup> à -18 °C, le 2<sup>ème</sup> à +4 °C et le 3<sup>ème</sup> à +30 °C (3 températures) pendant 9 périodes (0 à 60 jours) (dispositif expérimental en *split plot* 3 × 9) ont été déterminées. Les expériences ont été répétées 3 fois.

La force d'un extrait coagulant est représentée par un rapport de quantité entre un certain volume d'extrait coagulant et un certain volume de lait amené à coaguler dans des conditions déterminées (40 mn à +35 °C). La force de l'extrait coagulant des écorces de l'*Ongokea gore* (F<sub>x</sub>) a été calculée par rapport à une présure de référence préalablement étalonnée et de force F<sub>s</sub> selon la relation suivante :

$$F_x \times t_x \times c_x = F_s \times t_s \times c_s$$

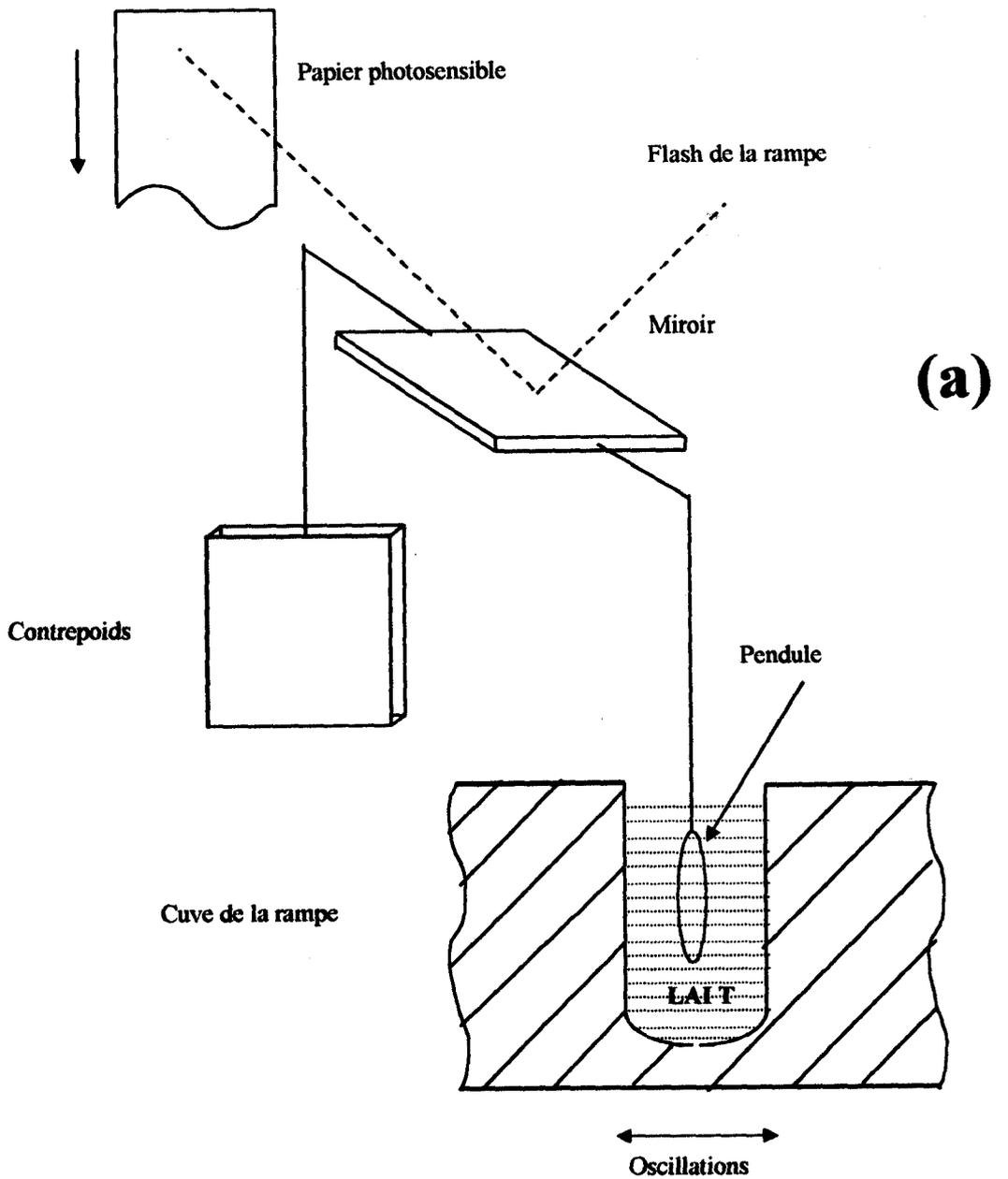
Avec c<sub>x</sub> et c<sub>s</sub>, t<sub>x</sub> et t<sub>s</sub> respectivement les concentrations et les temps de coagulations des extraits coagulants inconnu et de référence.

#### Mesures de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été déterminée suivant deux méthodes : la méthode de BERGVIST, 1963 et VANDERPOORTEN et WECKX, 1972 suivie de l'expression de la protéolyse en mg de tyrosine par ml de solution selon Lowry *et al.*, (1951) puis la méthode de ROWLAND (1938) et GARNIER (1957) suivie de la détermination de l'azote par la méthode de Kjeldahl.

Les dilutions extraits coagulants (extraits des écorces de l'*Ongokea gore*, pepsine bovine et présure) donnent le même temps de floculation avec substrat de Berridge.

À 10 ml de solution de caséine de vache (Fluka Chemie, Buchs, Suisse) à 3 % (p/v) dissoute dans du tampon phosphate 25 mM pH 6,7, on ajoute 1 ml d'extrait coagulant; après incubation pendant 1 h à des températures comprises entre 30 et 70 °C, on y ajoute 11 ml d'acide trichloroacétique à 24 % (p/v) puis on filtre la solution obtenue (BERGVIST, 1963 ; VANDERPOORTEN et WECKX, 1972). Ensuite, on ajoute à ces filtrats trichloroacétiques et à des solutions de tyrosine de concentration variable un mélange de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2 % (p/v) dans NaOH 0,1 N, du CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,05 % (p/v) et du réactif de Folin Ciocalteu ayant une acidité



(a)

(b)

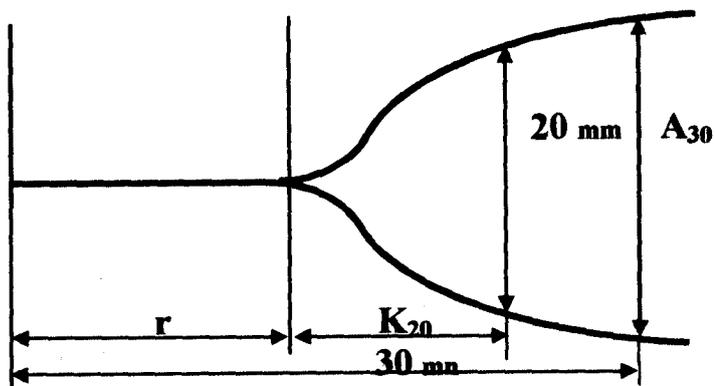


Figure 1: (a) Schéma du formagraph et (b) du formagramme (Documentation technique de Foss Electric).

de titrable de 1 N (LOWRY *et al.*, 1951). On détermine ensuite les densités optiques à 750 nm contre un blanc. Les mesures d'absorbance sont converties en mg de tyrosine par ml à partir d'une courbe étalon et l'activité protéolytique est exprimée en milligrammes de tyrosine par ml de solution.

L'activité protéolytique est aussi déterminée selon ROWLAND (1938) et GARNIER (1957) : elle est mesurée à 40 °C sur une solution de caséine à 3 % (p/v) dans du tampon phosphate 25 mM pH 6,7 et additionnée de 10 % (v/v) d'extrait coagulant. La réaction est arrêtée en mélangeant un volume d'aliquote avec un même volume d'acide trichloroacétique à la concentration finale de 12 % (p/v) ; L'azote non protéique (NPN) contenu dans le filtrat trichloroacétique tout comme l'azote total (NT) du mélange solution de caséine / extrait coagulant sont dosés par la méthode de micro kjeldalh ; le coefficient  $k = 6,37$  permet de convertir la quantité d'azote totale en quantité de protéine. On calcule la variation de la quantité de l'azote non protéique ( $\Delta$  NPN) entre les temps  $t$  ( $NPN_t$ ) et  $t_0$ , moment où on mélange la solution enzymatique avec le substrat ( $NPN_0$ ); ce qui donne  $NPN_t - NPN_0$ . Cette différence exprimée en pour cent d'azote total du milieu (NT) est appelée %  $\Delta$  NPN / NT autrement dit :

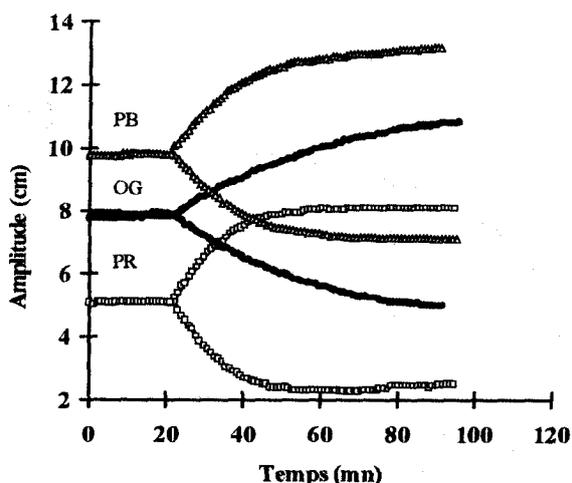
$$\% \Delta \text{NPN} / \text{NT} = 100 \times (NPN_t - NPN_0) / \text{NT}$$

Trois types d'extraits coagulants (extrait des écorces de l'*Ongokea gore*, pepsine bovine et de présure) sont incubés avec de la caséine pendant 7 périodes allant de 0 à 500 mn (dispositif expérimental en *split plot* 3 x 7). Toutes les expériences ont été répétées 4 fois. Par ailleurs 3 lots de 9 échantillons d'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* ont été conservés le 1<sup>er</sup> à - 18 °C, le 2<sup>ème</sup> à + 4° C et le 3<sup>ème</sup> à + 30 °C (3 températures). La durée de la conservation s'est étalée sur 9 périodes comprises entre 0 à 60 jours (dispositif expérimental en *split plot* 3 x 9).

### Mesures au formagraphe

Les dilutions extraits coagulants (extraits des écorces de l'*Ongokea gore*, pepsine bovine et présure) donnent le même temps de floculation avec substrat de Berridge.

La coagulation du lait est suivi par le formagraphe (Foss Electric, Paris, France) à 35 °C. Le formagraphe est formé (Figure 1<sub>a</sub>) d'un pendule plongeant dans un godet contenant du lait emprésuré et qui est entraîné au fur et à mesure de la coagulation par le mouvement latéral du godet. L'enregistrement de la déviation du pendule se fait sur un papier photosensible se déroulant à une vitesse de 2 mm / mn. Les godets sont remplis de 10 ml de lait et de 0,2 ml d'extrait coagulant. On nomme  $r$  (Figure 1<sub>b</sub>) le temps de coagulation qui s'écoule entre l'emprésurage et le moment où l'écart entre les deux branches du formagramme atteint 1 mm,  $K_{20}$  le temps de raffermissement qui s'écoule entre la fin de  $r$  et le moment où l'écartement des deux branches du formagramme est de 20 mm et  $A_{30}$  l'écart entre les deux branches du formagramme 30 mn après l'addition de l'extrait coagulant. Les mesures ont été faites 6 fois et les valeurs moyennes suivies des écart-types calculées. Quelques formagrammes ont été digitalisés au scanner puis retracés avec le logiciel de dessin *Ungraph* (Biosoft, Cambridge, Royaume Uni).



**Figure 2 : Formagrammes obtenus par la coagulation du lait avec l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* (OG), la pepsine bovine (PB) et la présure (PR)**

Les godets sont contiennent 10 ml de lait reconstitué et 0,2 ml d'extrait coagulant ; la réaction se fait à 35 °C ; la vitesse du déroulement du papier photosensible est de 2 mm / mn. Les formagrammes ont été digitalisés au scanner puis retracés avec le logiciel de dessin *Ungraph* de Biosoft (Cambridge, Royaume Uni).

### Analyses microbiologiques

Le dénombrement de la flore totale a été fait sur milieu solide *Plate Count Agar* (PCA) selon la technique de dilution décimale à 30 °C pendant 3 jours (BOURGEOIS, 1980) et celui de la flore caséolytique sur milieu gélosé à base de lait (15 ml de gélose à 2,5 %, agar fondu et 5 ml de lait écrémé) à 30 °C pendant 3 jours (PLUSQUELLEC, 1980; BEERENS et LUQUET, 1987).

### Analyses statistiques

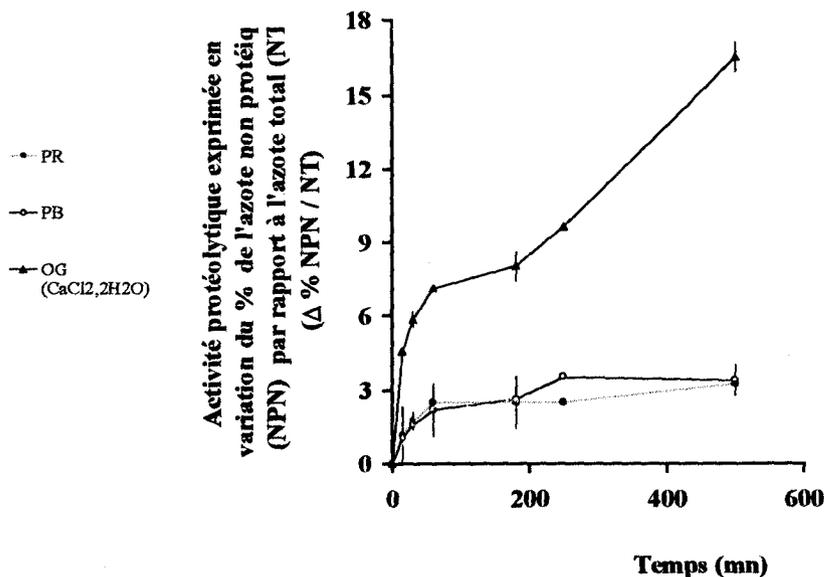
Les résultats sont traités par l'analyse de variances par ANOVA suivi d'un classement des moyennes par le test à intervalles multiples de Duncan en utilisant le logiciel SAS® (1985).

### RESULTATS

L'écorce de l'*Ongokea gore* a une épaisseur variable entre 18 et 21 mm, sa teneur en matière sèche est de  $64,3 \pm 0,9$  % (m/m), sa teneur en cendres de  $7,0 \pm 0,9$  % (m/m); elle contient  $0,86 \pm 0,09$  % (m/m) d'azote (moyenne de 10 essais). Les caractéristiques physico-chimiques suivants ont été obtenus pour l'extrait d'*Ongokea gore* pH  $3,9 \pm 0,0$ , densité  $1,011 \pm 0,008$ , matière sèche  $6,1 \pm 0,2$  % (m/v), cendres  $1,8 \pm 0,3$  % (m/v), matière organique (calculée par différence entre la matière sèche et les cendres)  $4,3 \pm 0,5$  % (m/v) et azote total  $0,23 \pm 0,02$  % (m/v). Avec  $k \approx 6,25$ , la teneur en protéine de l'extrait est de 1,44 % (m/v).

Le temps de coagulation avec la seule solution de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 3 % (essai à blanc) était supérieur à 24 h donnant ainsi une force négligeable. En macérant 75 g d'écorce fraîche de l'*Ongokea gore* dans 100 ml de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 3 % (4 °C, 12 h) en présence de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  à 2 % (v/v), on a obtenu un extrait coagulant ayant une force de 1/50.

La figure 2 montre les formagrammes obtenus avec la présure, la pepsine et l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore*. Pour des temps de coagulation de  $21 \pm 1$  mn, les valeurs de  $k_{20}$  et  $A_{30}$  sont respectivement pour l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore*, la pepsine bovine et la présure de  $14 \pm 2$ ,  $8,6 \pm 0,5$ ,  $5,7 \pm 0,9$  mn et  $18 \pm 7$ ,  $24 \pm 3$ ,  $31 \pm 5$  mn. Pour des temps de coagulation pratiquement identiques, les temps de raffermissement des gels décroissent dans l'ordre : présure, pepsine bovine, extrait des écorces de l'*Ongokea gore*. Le tableau 1 montre les caractéristiques des extraits des écorces de l'*Ongokea gore* bruts et ceux traités à la fois par l'éthanol à 70 % (30 mn) et l'hypochlorite de sodium à 6 % (30 mn). Les activités coagulante et protéolytique après les traitements à l'éthanol et à l'hypochlorite de sodium diminuent ( $p < 0,05$ ) mais le milieu est assaini en germes totaux et caséolytiques. Sur la figure 3 sont représentées les évolutions des activités protéolytiques sous les actions de la présure, la pepsine bovine et l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* (Tracé par interpolation). L'activité protéolytique de l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* est au moins quatre fois plus importante dans les 30 premières minutes que celles de la présure ou celle de la pepsine bovine ; cette activité protéolytique se poursuit même au-delà de 8 h.

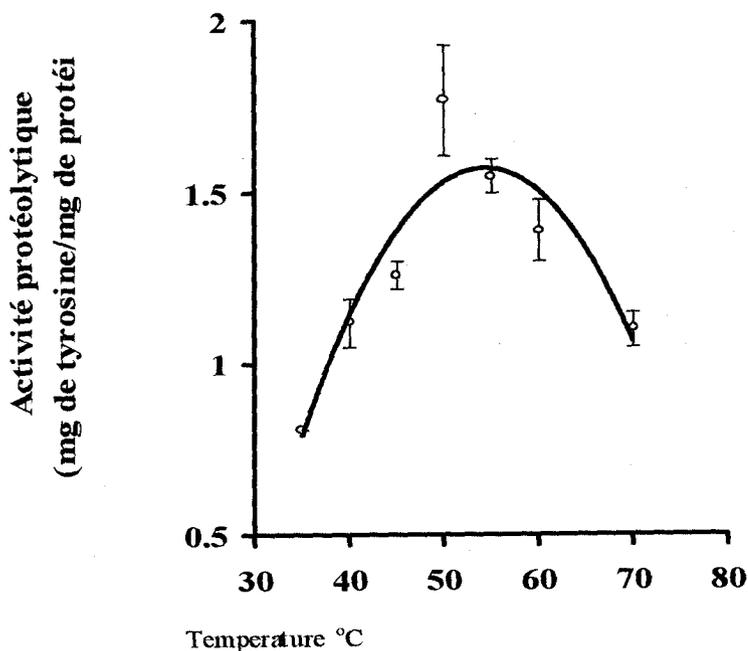


**Figure 3 :** Cinétique des activités protéolytiques de l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore*, de la pepsine bovine et de la présure.

A une solution de caséine à 3 % (p/v) dans du tampon phosphate 25 mM pH 6,7 (40 °C) est ajoutée 10 % (v/v) d'extrait coagulant. La réaction est arrêtée en mélangeant un volume d'aliquote avec un même volume d'acide trichloroacétique à la concentration finale de 12 % (p/v) ; L'azote non protéique (NPN) contenu dans le filtrat trichloroacétique tout comme l'azote total (NT) du mélange solution de caséine / extrait coagulant sont dosés par la méthode de micro kjeldahl. On calcule la variation de la production de l'azote non protéique ( $\Delta\text{NPN}$ ) entre les temps  $t$  ( $\text{NPN}_t$ ) et  $t_0$  moment où on mélange la solution enzymatique avec le substrat ( $\text{NPN}_0$ ); ce qui donne  $\text{NPN}_t - \text{NPN}_0$ . Cette différence exprimée en pour cent d'azote total du milieu NT est appelée %  $\Delta\text{NPN} / \text{NT}$  autrement dit :

$$\% \Delta\text{NPN} / \text{NT} = 100 \times (\text{NPN}_t - \text{NPN}_0) / \text{NT}$$

Les courbes sont obtenues par intrapolation



**Figure 4 : Activité protéolytique de l'extrait des écorces de l'Ongokea gore, en fonction de la température.**

Incubation entre 30 et 70 °C pendant 10 mn de 10 ml de la solution de caséine à 3 % (p/v) dans du tampon phosphate 25 mM pH 6,7 et de 1 ml de l'extrait coagulant à différentes températures (entre 30 et 70 °C) pendant 10 mn. L'azote non protéique dans le filtrat trichloracétique à 24 % (p/v) est exprimée en mg de tyrosine par ml selon la méthode de Lowry et al., (1951) et l'azote totale calculée par la méthode de Kjeldahl est convertie en protéine avec  $k=6,37$ .

Il s'agit d'une courbe de tendance (polynôme d'ordre 2, d'équation  $y = -0,0021 x^2 + 0,2259 x - 4,5702$  avec  $R^2 = 0,85$ ) ; son maximum (point où la dérivée première s'annule) se trouve à une température de 54 °C.

**Tableau 1 : Caractéristiques des extraits des écorces de l'Ongokea gore.**

Extrait bruts et celui traité à la fois à l'éthanol à 70 % (30 mn) puis à l'hypochlorite de sodium à 6 % (30 mn). Activité coagulante en unité présure obtenue après détermination du temps de coagulation par la méthode de Berridge (1952). Activité protéolytique obtenue par dosage (méthode de kjeldahl) de l'azote total (NT) puis de l'azote non protéique (NPN) dans le filtrat trichloracétique à la cocentration finale de 12 % ; % Δ symbolise le pourcentage de variation. Dénombrement de la flore totale et de la flore caséolytique respectivement sur milieu solide Plate Count Agar (PCA) et sur milieu gélosé à base de lait.

	Extrait brut	Extrait traité à l'éthanol puis à l'hypochlorite de sodium
Activité coagulante (UP : unité présure)	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Activité protéolytique (% ΔNPN / NT)	5,33 ± 0,63	5,27 ± 1,00
Germes totaux (ufc / ml)	$9 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$	1,0 ± 0,0
Germes caséolytiques (ufc / ml)	$85 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$	1,5 ± 0,0

L'effet de la température sur l'activité protéolytique est donné par la courbe de tendance de la figure N° 4 ; il s'agit d'une courbe de tendance (polynôme d'ordre 2 et d'équation  $y = -0,0021 x^2 + 0,2259 x - 4,5702$  avec  $R^2 = 0,85$ ) ; son maximum (point où la dérivée première s'annule) se trouve à une température de 54 °C. Les courbes des figures 5 et 6 tracées par interpolation montrent les variations des activités coagulante et protéolytique des extraits des écorces de l'Ongokea gore conservés à - 18, + 4 et + 30 °C. Après un jour d'incubation, on constate qu'il n'y a pas de différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les activités coagulante et protéolytique des extraits conservés à + 4 et à + 30 °C par rapport aux activités initiales par contre à - 18 °C on note une chute de ces activités après une seule journée d'incubation. A + 30 °C et après 5 jours, on note une baisse significative des activités coagulante et protéolytique; cette chute se poursuit jusqu'au 40<sup>ème</sup> jour (baisse minimale). Après 60 jours on constate une augmentation significative des activités coagulante et protéolytique mais également des flores totale et caséolytique (Tableau 2). A + 4 °C les

activités coagulante et protéolytique des extraits des écorces de l'*Ongokea gore* ne sont pas significativement différentes ( $p < 0,05$ ) après 60 jours toutefois après 20 jours d'incubation, la charge microbienne devient importante. A  $- 18\text{ }^{\circ}\text{C}$  les activités coagulante et protéolytique des extraits des écorces de l'*Ongokea gore* atteignent leur valeur minimale après 12 jours puis restent constantes jusqu'au 60<sup>ème</sup> jour.

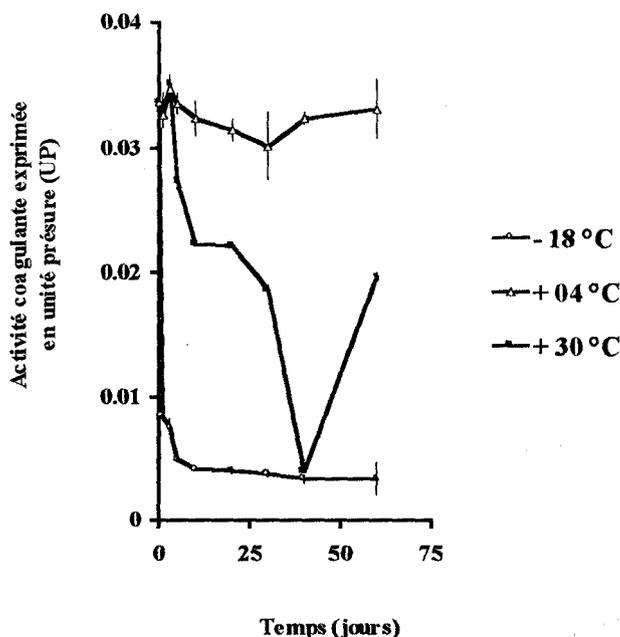
**Tableau 2: Evolution des flore totale et caséolytique**

Le dénombrement de la flore totale a été fait sur milieu solide Plate Count Agar (PCA ) selon la technique de dilution décimale. L'incubation a été faite à  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 3 jours. Le dénombrement de la flore caséolytique sur milieu gélosé à base de lait (15 ml de gélose à 2,5 %, agar fondu et 5 ml de lait écrémé). L'incubation a été fait à  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 3 jours.

Durée (jours)	Flore totale (ufc / ml)			Flore caséolytique (ufc / ml)		
	- 18 °C	+ 04 °C	+ 30 °C	- 18 °C	+ 04 °C	+ 30 °C
0	0	0	0	2	2	2
1	3	0		0	0	
3	0	0	3	2	0	0
5	0			0		1
10	4	8	$2 \times 10^3$	0	0	0
20	0	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	1	$1 \times 10^3$	70
30	0	$3 \times 10^5$	$7 \times 10^8$	3	$2 \times 10^4$	$4 \times 10^5$
40	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^6$	$6 \times 10^8$	0	$1 \times 10^5$	
60	$2 \times 10^2$	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^{11}$	4	$3 \times 10^7$	$2 \times 10^6$

**DISCUSSION**

Les écorces de l'*Ongokea gore* sont dures ; elles sont faites d'une grande quantité de matière sèche.. L'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* a une densité de 1,027 se retrouve au voisinage de la fourchette (1,12 à 1,14) des valeurs conseillées pour les présures (GORRETA, 1980) ; ses matière sèche et organique sont plus faibles que ce que prône ce même auteur : 20 à 25 % et 8 % respectivement. La relative grande quantité des cendres s'explique par la présence des sels de calcium dans la saumure ; cet extrait contient des substances azotées dont la nature n'a pas encore fait encore d'un travail publié. Toutefois si toute l'azote de l'extrait est sous forme protéique, la teneur en protéine de cet extrait est de 1,44 % (m / v) avec  $k \approx 6,25$ .



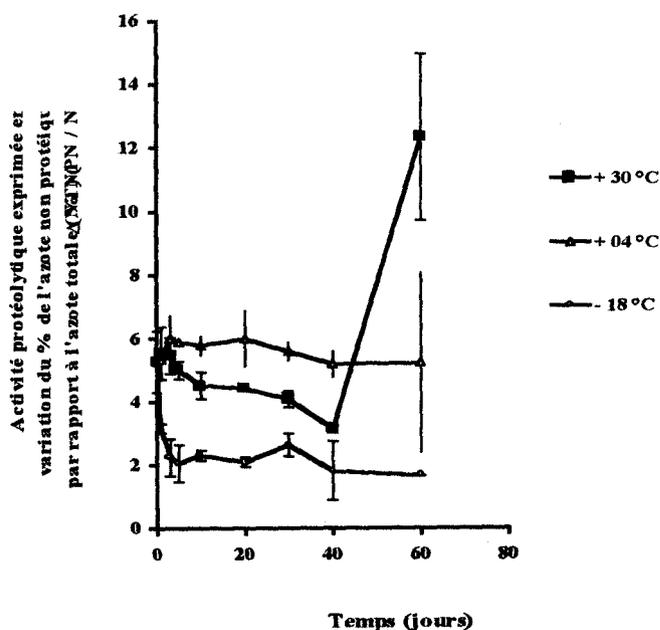
**Figure 5 : Cinétique de l'activité coagulante de l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* conservé à différentes températures.**

La mesure du temps de coagulation se fait par la méthode de Berridge (1952) et Collin et al. (1977) en mettant 10 ml (V) de lait reconstitué et 0,5 ml (v) de solution coagulante dans un tube à essais plongé au bain-marie à  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le temps de floculation (t) en seconde est celui qui s'écoule entre l'introduction de l'extrait coagulant dans le tube à essai et le moment où il se forme un mince film sur les parois intérieures de ce tube à essai. L'activité coagulante est exprimée en unité présure (UP).

$UP = 10 \times V / t \times v$

Les courbes sont obtenues par intrapolation

Après 15 mn d'incubation, l'activité caséolytique des extraits des écorces de l'*Ongokea gore* est significativement différentes ( $p \leq 0,05$ ) de celles de la présure et de la pepsine bovine. La vitesse initiale ( $tg \alpha$ ) d'hydrolyse de la caséine (V<sub>i</sub>) par l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* (0,305) est 4,2 fois supérieure à celle obtenue par la pepsine bovine (0,073) et 3,9 fois celle obtenue par la présure (0,079). Cette activité n'est pas spécifique ; après 8 h d'incubation la protéolyse de la caséine due à l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* est 6 à 7 fois plus grande que celle qui est due à l'action de la pepsine bovine. Cette forte activité caséolytique des protéases d'origine végétale est bien connue dans diverses espèces végétales (ERNSTROM et WONG 1983). L'allure de la courbe (figure 3) montrant un maximum d'activité protéolytique à + 54 °C laisse penser à une ou plusieurs protéases présentes dans les extraits des écorces de l'*Ongokea gore* ayant toutes des propriétés très voisines. Cette température optimum de protéolyse de la caséine est supérieure à celle de la présure traditionnelle (+ 40 °C) mais elle est comparable à celle de l'enzyme extraite d'*Onorporidium turcicum* (+ 55 °C) (TAMER, 1993). La ou les substances actives présentes dans les extraits des écorces de l'*Ongokea gore* sont relativement stables à la chaleur mais perdent leurs activités pendant la congélation. En plus des tannins (VILLIERS, 1973) une ou plusieurs protéases diffusent en solution au cours de la macération. Ces protéases perdent leurs activités après une congélation d'une journée et 5 jours après une incubation à + 30 °C. La stabilité d'une protéase de l'estomac de poule a été constatée entre + 30 et + 35 °C (KHAN *et al.*, 1985), celle des feuilles de *Calotropis procera* à 4 °C (OGUDIWIN et OKE, 1983). La forte concentration en CaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O accrue dans certaines zones au cours de la congélation pourrait expliquer la déstabilisation des protéases de l'*Ongokea gore*. Cette déstabilisation pourrait être aussi due aux caractéristiques propres de la protéase ; en effet, on connaît plusieurs protéines qui ne se conservent pas très bien à basse température : la myoglobine et du lysozyme sont dénaturées à des températures inférieures à 0 °C (LAPANJE, 1978; CHEN et SCHELLMAN, 1989) ; la L thréonine desaminase est inactivée à 0 °C et plusieurs protéines comme la protéine 11 S de soja, les gliadines, les protéines du lait et de l'œuf s'agrègent et précipitent quand elles sont amenées aux températures de congélation (CHEFTEL *et al.*, 1985). Les écorces brutes prélevées dans la nature peuvent avoir des contaminations les plus diverses ; elles sont donc susceptibles de contaminer les solutions de macération à divers degrés, ce qui pourrait expliquer les charges microbiennes rencontrées dans les extraits bruts des écorces de l'*Ongokea gore*. Par contre le traitement par de l'éthanol puis de l'hypochlorite de sodium permet d'assainir cet extrait. Cette mesure d'hygiène s'avère capitale pour l'obtention d'un produit de bonne qualité et qui devrait se conserver mieux. L'augmentation des activités coagulante et protéolytique des extraits des écorces de l'*Ongokea gore* après 60 jours d'incubation à 30 °C serait due à la charge microbienne relativement élevée (10<sup>11</sup> pour la flore totale et 10<sup>6</sup> germes / ml pour la flore caséolytique). « Emprésumer » le lait avec un extrait coagulant contenant une importante flore caséolytique aurait des conséquences néfastes sur la fabrication fromagère : hydrolyse poussée des caséines suivie de la perte des fragments peptiques dans le lactosérum et de la baisse du rendement fromager ; hydrolyse de la caséine β et apparition des peptides pouvant donner au fromage un goût amer ; activité protéolytique très importante au cours de l'affinage. Il paraît raisonnable de conserver les extraits coagulants des écorces de l'*Ongokea gore* au réfrigérateur (+ 4 °C) et de les utiliser dans les 7 jours qui suivent.



**Figure 6 : Cinétique de l'activité protéolytique de l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* conservé à différentes températures.** A une solution de caséine à 3 % (p/v) dans du tampon phosphate 25 mM pH 6,7 (40 °C) est ajoutée 10 % (v/v) d'extrait coagulant. La réaction est arrêtée en mélangeant un volume d'aliquote avec un même volume d'acide trichloroacétique à la concentration finale de 12 % (p/v) ; L'azote non protéique (NPN) contenu dans le filtrat trichloroacétique tout comme l'azote total (NT) du mélange solution de caséine / extrait coagulant sont dosés par la méthode de micro kjeldalh. On calcule la variation de la production de l'azote non protéique ( $\Delta NPN$ ) entre les temps t (NPN<sub>t</sub>) et t<sub>0</sub> moment

où on mélange la solution enzymatique avec le substrat ( $NPN_0$ ); ce qui donne  $NPN_r - NPN_0$ . Cette différence exprimée en pour cent d'azote total du milieu NT est appelée %  $\Delta NPN / NT$  autrement dit :

$$\% \Delta NPN / NT = 100 \times (NPN_r - NPN_0) / NT$$

Les courbes sont obtenues par intrapolation

Le caillé obtenu avec l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* se raffermi très lentement, 2 à 3 fois plus lentement que ceux obtenus avec la pepsine bovine ou la présure ; et même 30 mn après « emprésurage », la consistance du caillé obtenu avec l'*Ongokea gore* est moins ferme que ceux obtenus avec la pepsine bovine ou la présure. De par son activité protéolytique très élevée l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* ne pourra avoir qu'une application très limitée en fromagerie (fabrication des pâtes fraîches, mélange avec d'autres enzymes coagulants) ; par contre tout comme dans le cas des autres enzymes d'origine végétale comme la papaïne, la broméline (MYEONG *et al.*, 1993 ; AISHIMA *et al.*, 1996 ; IL SHIN CHOE YON JIN PARK *et al.*, 1996) les extraits purifiés de l'*Ongokea gore* pourront intervenir dans l'attendrissement la viande ou dans la modification les propriétés fonctionnelles des protéines.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient C. G. Libouga et T. Ngo Bôm Kônde pour la fourniture gracieuse des écorces de l'*Ongokea gore*, J. C. Collin et L. Vassal pour la mise à disposition du formagraph, J. C. Milol pour la collaboration technique, D. Libouga Li Gwét pour le dessin des formagrammes, I. de Couville pour la lecture du manuscrit et P. Kana Mbassi L. et L. Ngo Nken Libouga pour la dactylographie.

## REFERENCES

1. AISHIMA, T. ; IIZUKA, K. ; KIDZU, K. (1996) Comparison of effects of bromelain, papain and ficin treatments on beef by near and mid-infrared spectrometry and chemometric analysis. IFT annual meeting ; Book of abstracts, p. 167.
2. ANIFANTAKIS, E. ; GREEN, M. L. (1980) Preparation and properties of rennets from lamb's and kid's abomasa. J. Dairy Res. 47, 221-230.
3. ASHIABOR, W. K. (1972) Technical Note N°16 Forest Products Research Institute. Ghana.
4. ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (1980) *Lait et produits laitiers – méthodes d'analyse*. Éditeur AFNOR, Paris La Défense, France - pp. 21-80.
5. AWORH, O. C. and MULLER, H. G. (1987) Cheesemaking properties of vegetable rennet from sodom apples (*Calotropis procera*). Food chem 26, 71-79.
6. BEERENS et LUQUET F. M. (1987) *Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et produits laitiers*. Techniques et Documentation. Lavoisier, Paris France pp.46-47.
7. BERGVIST, R. (1963) The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. I. Methods for estimation and isolation of the proteolytic enzymes. Acta Chem. Scand., 17, 1521-1540.
8. BERRIDGE, N. J. (1952) An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. J.Dairy Res. 9, 328-329.
9. BOUQUET, A. (1969) *Féticheurs et Médecines Traditionnelles au Congo (Brazzaville)* ; ORSTOM, Paris France – p. 181.
10. BOURGEOIS, C. M. (1980) *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires – 3 – Le contrôle microbiologique*. Technique et Documentation . Lavoisier, Paris, France pp. 91-97.
11. CHEFTEL, J. C. ; CUQ, J. L. et LORIENT, D. (1985) *Protéines alimentaires, biochimie, Propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelles, modifications chimiques*. Techniques et Documentation Lavoisier, Paris, p. 38.
12. CHEN, B. and SCHELLMAN, J. A. (1989) Low temperature unfolding of mutant of phage T4 lysozyme. I Equilibrium studies. Biochemistry 28, 685-695.
13. COLLIN, J.C., GRAPPIN, R., LE GRAET, Y. (1977) Étude de la méthode de mesure selon Berridge du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. Rev. Lait. Fr. 355, 391-394.
14. CORDEIRO, M. ; JAKOB, E. ; PUHAN, Z. ; PAIS, M. S. ; BRODELIUS, P. E. (1992) Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarase from *Cynara cardunculus*: a comparison to chymosin. Milchwissenschaft 47, 681-687.
15. DETIENNE, P. (1991) Clé de reconnaissance par les feuilles des légumineuses des forêts du Cameroun, Congo, Gabon, et de la République Centrafricaine. Bois For Trop 230, 39-52.
16. ERNSTROM, C. A., WONG, N. P. (1983) Milk clotting enzymes and cheese chemistry, in: Webb B. H., Johnson A. H., Alford J. A. (Ed), Fundamentals of Dairy Chemistry, The Avi Publishing Company, Inc. Westport Connecticut, pp. 662-771.
17. FIGUEIREDO A. C., FEVEREIRO P., CABRAL J. M. S., NOVAIS J. M., PAIS M. S. S. (1987) Callus and suspension cultures for biomass production of *Cynara cardunculus* (Compositae), Biotechnol Lett. 9, 213-218.

18. GARNIER, J. (1957) Étude de la libération d'azote non protéique dans les laits de différentes espèces animales. Ann. Inst. Nat. Rech. Agron. Ser. E (Ann. Tech. Agri.) 3, 245-256.
19. GORRETA, L. J. (1980) Coalho e coagulantes. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes 35, 17-21.
20. GUPTA, C. B. ; ESKIN, N. A. M. (1977) Potential use of vegetal rennet in the production of cheese. Food Technol 31, 62-64.
21. HAMDY, A. M. ; CHEDED, M. A. ; EL-KOUSSY, L. A. ; FODA, E. A. (1976) Preparation of milk clotting enzymes from plant sources I. Coagulation enzyme extract from *Solanum torvum*. Agric Res Rev (Cairo) 54, 135-143.
22. HOSONO, A. (1985) A new milk clotting enzyme. Rakuno kagaku, shokuhin no kenkyu 34, A189-A193.
23. IL SHIN CHOE YON JIN PARK ; ISHIOROSHI, M. ; SAMEJIMA, K. (1996) A new protease in Korean pears as meat tenderizer. Animal Science and Technology 67, 43-46.
24. KHAN, M. R. ; AKHTAR, F. and AHMED, I. (1985) Protease activity of chicken stomach. Journal of Natural Sciences and Mathematics 25, 75-86.
25. LAPANJE, S. (1978) *Physicochemical Aspects of Protein Denaturation, Wiley - Interscience In Food Chemistry*, 3<sup>rd</sup> Edition ; 1996 Edited by Owen, R. Fennema, Marcel Dekker Inc. New York, U.S.A p. 1067.
26. LETOUZEY, R. (1968) *Les Botanistes au Cameroun in Flore du Cameroun N° 7* Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France p. 79.
27. LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N. J. ; FARR, A. L. AND RANDALL R. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chemistry 193, 265-269.
28. MACEDO, I. Q. ; FARO, C. J. ; PIRES, E. M. (1993) Specificity and kinetics of milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine kappa-casein. J Agric Food Chem 41, 1537-1540.
29. MILLER, R. W. ; WEISLEDER, D. ; KLEIMAN, R. ; PLATTNER, R. D. ; SMITH, Cr. Jr. (1977)<sub>a</sub> Oxygenated Fatty Acids of Isono Oil. Phytochemistry 16, 947-951.
30. MILLER, R. W. ; WEISLEDER, D. ; PLATTNER, R. D. ; SMITH, Cr. Jr. (1977)<sub>b</sub> Cis-Enediene Chromophore of Isono Oil. Lipids 12, 669-675.
31. MYEONG, H. C. ; SUN Y. (1993) Modification of functional of soy protein isolate by proteolytic enzymes. Korean Journal of Food Science and Technology 25, 39-45.
32. OGUNDIWIN, J. O. and OKE, O. L. (1983) Factors affecting the processing of wara a Nigerian white cheeses. Food Chem. 11, 1-13.
33. OTANI, H. ; HIGASHIYAMA, S. ; TAKAYAMA, K. AND HOSONO, A. (1985) Action of milk clotting enzyme from "*pohon litsusu*" (*Wrightiana calysina*) on milk protein. Milchwissenschaft 40, 137-139.
34. OTANI, H. ; MATSUMORI, M. ; HOSONA, A. (1991)<sub>a</sub> Purification and some properties of a milk clotting protease from young seeds of *Albizia julibrissin*. Anim. Sci Technol 62, 424-432.
35. OTANI, H. ; MATSUMORI, M. ; HOSONO, A. (1991)<sub>b</sub> The screening of trees having milk clotting activity. Anim Sci Technol 62, 417-423.
36. PLUSQUELLEC, A. (1980). *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, 3, Le contrôle microbiologique*. Techniques et Documentations Lavoisier, Paris, p. 242.
37. RAPONDA-WALKER, A. ET SILLANS, R. (1961) *Les plantes utiles du Gabon* ; Edition Paul Lechevalier, Paris, pp. 316-317.
38. ROWLAND, S. J. (1938) The determination of nitrogen distribution in milk. J Dairy Res. 9, 42-46.
39. SAS® (1985) User's Guide: Statistics, Version - 5 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.
40. TAMER, I. M. (1993) Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. Biotechnol Lett. 15, 427-432.
41. TAVASOLIAN, B. ; SHABBAK, F. (1979) Extraction and partial purification of milk coagulating enzyme from *Cartamus tinctorius* seeds. J Agric Food Chem 27, 190-191.
42. TSUNODA, K. (1990) The natural resistance of tropical woods against biodeterioration. Wood Res 0, 18-27.
43. VANDERPOORTEN, R. and WECKX, M. (1972) Breakdown of casein by rennet and microbial milk clotting enzymes. Neth. Milk Dairy J. 26, 47-59.
44. VIERA DE SÁ, F. and BORBOSA, M. (1972) Cheese-making with vegetable rennet from cardoon (*Cynara cardunculus*). J. Dairy Res. 39, 335-343.
45. VILLIERS, J. F. (1973) *Icacinacées, Olacacées, Pentadiplandrécées, Opiliacées, Octoknémacées* - Vol. 15 In *La Flore du Cameroun* - Laboratoire de Phanérogamie Muséum National d'Histoire Naturelle, France. pp. 159-162.
46. WOMENI, H. M. ; LIBOUGA, D. G. ; JIWOUA, N. C. N. ; NGASSOUM, M. et MBOFUNG, C. M. F. (1997) Extraction et purification partielle d'un composé coagulant du lait obtenu des écorces de *Ongokea gore*. Proceedings of the 5<sup>th</sup> annual Conference Bioscience and Food Security Yaoundé 403-408.