

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

D.G. Libouga<sup>1\*</sup>, Dominique Vercaigne-Marko<sup>2</sup>, Sana Longa Djangal<sup>1</sup>, Iliassou Choukambou<sup>1</sup>, A.L. Ebangi<sup>3</sup>, Messine Ombionyo<sup>3</sup>, R.G. Beka<sup>1</sup>, T.M. Aboubakar<sup>4</sup> & D. Guillochon<sup>2</sup>

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 abomasum 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<sup>-1</sup>) was determined by bicinchoninic acid assay. Five proteins of respective molecular masses 27, 30, 42, 44 and 90 kg.mole<sup>-1</sup> 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 NH<sub>2</sub> 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

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>Laboratoire 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.

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

<sup>4</sup>Faculté 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 × mole<sup>-1</sup>. La caractérisation de la protéase responsable de l'activité coagulatrice est actuellement en cours.

conducted using SAS<sup>®</sup> 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. shirensis*, *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.

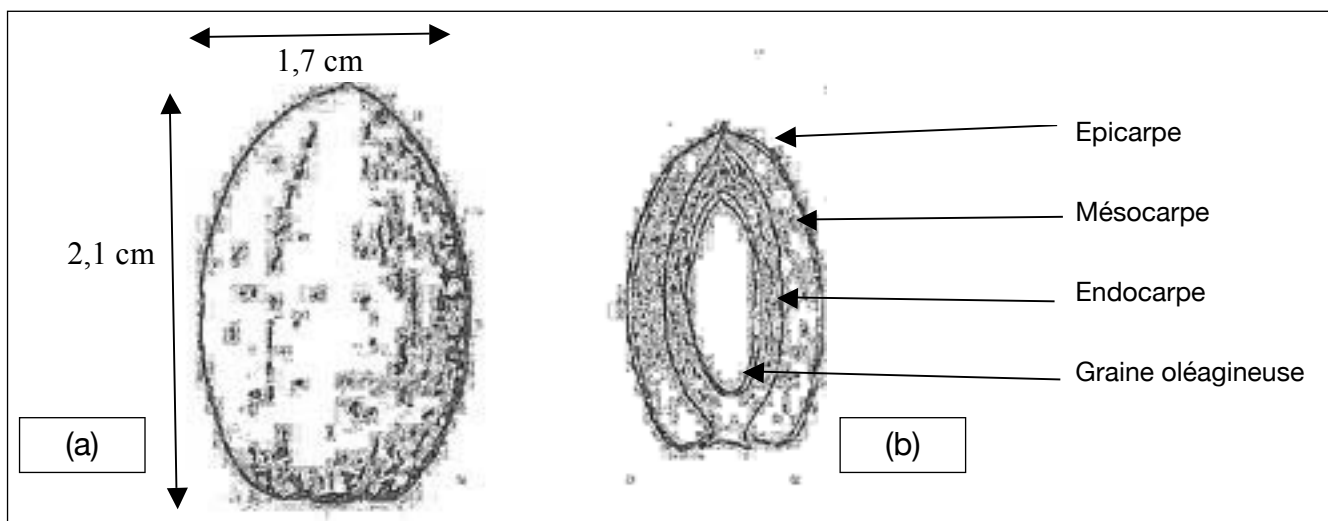


Figure 1: Schéma du fruit de *Balanites aegyptiaca*: (a) vue de profil et (b) coupe transversale.

## 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<sup>-1</sup>), 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 aérobie 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 <sup>-1</sup> )
Mil	54
Tourteau de coton	18
Maïs	16
Poisson fumé	8
Polyvitaviaire (mélange des vitamines, nutriments, amino acides, sels ....etc)	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<sup>-1</sup> 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**

<i>Analyse sensorielle</i>			
Code	Nationalité	Date et heure	Province d'origine
Age		Sexe	
Profession			
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  $j^{\text{ème}}$  concentration, du  $j^{\text{ème}}$  température et de la  $k^{\text{ème}}$  durée de macération sur le temps de coagulation du lait,

$\mu$  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  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

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

$(C*T)_{ij}$  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.

$\mu$  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,

$\mu$  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  $j^{\text{ème}}$  province, de  $j^{\text{ème}}$  région de  $k^{\text{ème}}$  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.

$\mu$  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 ( $k=$  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  $1 \text{ ml}$  d'extrait de mésocarpe à  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant  $1 \text{ h } 30$ . La réaction est arrêtée par précipitation avec  $10 \text{ ml}$  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  $\text{NH}_2$  libres. Le calcul du nombre de fonctions  $\text{NH}_2$  libérées permet de calculer le degré de l'hydrolyse.

### 11. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Environ 50  $\mu\text{g}$  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  $\beta$  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  $734 \pm 5$  g.kg<sup>-1</sup>.

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<sup>-1</sup>) et des coliformes ( $5.10^2$  UFC.ml<sup>-1</sup>) mais pas du tout de spores de germes sulfito-réducteurs.

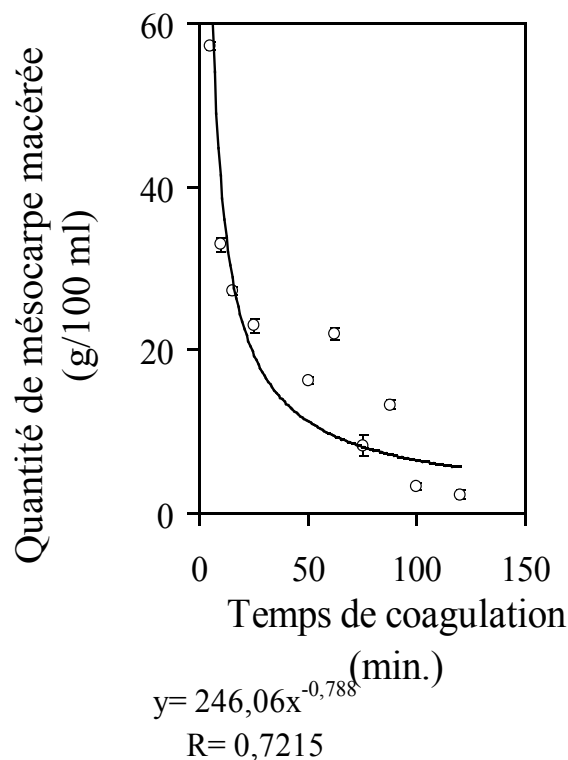


Figure 2: Electrophorèse de l'extrait brut de mésocarpe des fruits de *Balanites aegyptiaca*.

(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  $\beta$  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<sup>-1</sup> à 2,3 min pour une concentration de  $1,20$  g.ml<sup>-1</sup>.

La teneur moyenne en protéines des extraits aqueux ainsi obtenus est de  $91 \pm 14$  mg.ml<sup>-1</sup>. Ces extraits hydrolysent l'hémoglobine bovine en libérant  $10 \mu\text{M}$  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  $\times$  mole<sup>-1</sup> 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  $1.011 \pm 10$  g.l<sup>-1</sup> et sa matière sèche de  $151$  g.l<sup>-1</sup> (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	$12,33 \pm 1,06$

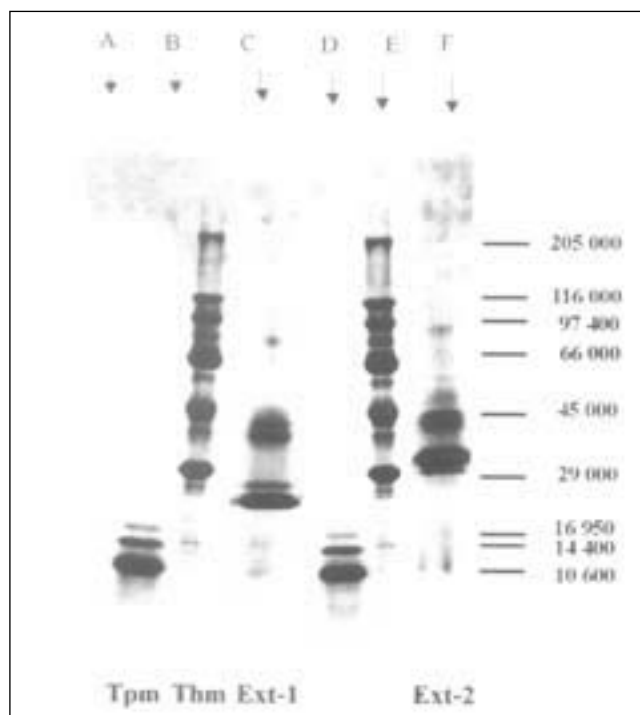


Figure 3: Variation du temps de coagulation du lait en fonction de la quantité de mésocarpe macérée.

un extrait sec total de 257,5 g.kg<sup>-1</sup>. 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<sup>-1</sup>. 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  $123 \pm 20$  g de matières grasses par kg de fromage contre  $137 \pm 25$  g.kg<sup>-1</sup> pour ceux fabriqués avec les extraits de mésocarpe 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 mésocarpe.

En supposant qu'une personne adulte de 70 kg consomme 500 g de fromage frais par jour, et que, dans 1 kg fromage toute la matière sèche provenant du mésocarpe (195 g) soit retrouvée, on peut calculer que la dose de mésocarpe 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 mésocarpe, 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 mésocarpe de *B. aegyptiaca*.

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

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

Temps (jours)	Poids des souris (g)	
	Lot C (+ présure)	Lot D (+ extrait)
0	25,97 ± 0,73a	25,94 ± 0,73a
15	31,28 ± 0,73a	30,32 ± 0,73a
30	32,02 ± 0,73a	33,29 ± 0,73a
45	34,21 ± 0,73a	32,90 ± 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 <sup>-1</sup> )	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 (mlx100 ml <sup>-1</sup> )	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

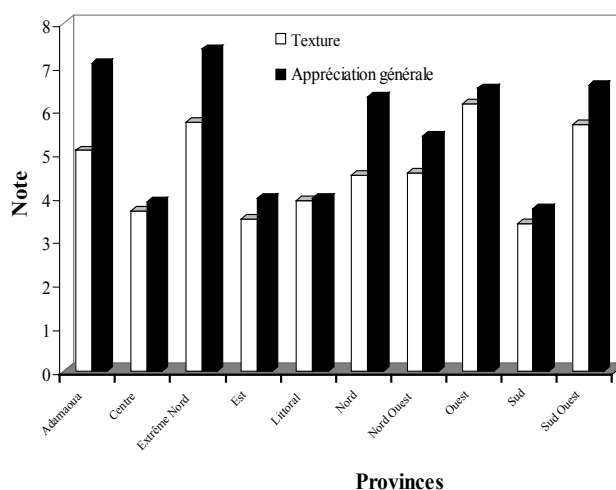


Figure 4: Appréciation des fromages selon les origines provinciales des dégustateurs.

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  $\text{CO}_2$ .

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<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup>. Il est à noter que la protéine E présente une migration différente en présence de  $\beta$  mercaptoéthanol, migration correspondant à sa masse réelle de 30 kg.mole<sup>-1</sup>. 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 hématopoiétiques 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'aromatization 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

- Anifantakis E. & Green M.L., 1980, Preparation and properties of rennets from lamb's and kid's abomasa. J. Dairy Res. 47, 221-230.
- Berridge N.J., 1952, An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. J. Dairy Res. 19, 328-329.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dupriez H. & Leener P., 1987, Jardins et vergers d'Afrique, Editions Harmattan, Paris, France.
- 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.
- Gorreta L.J., 1980, Coalho e coagulantes. Revista do Instituto de

- lacticinós 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<sup>ème</sup> 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.