



UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI (UAC)

FACULTÉ DES SCIENCES AGRONOMIQUES

**DÉPARTEMENT DE NUTRITION ET DES
SCIENCES ET TECHNOLOGIES
ALIMENTAIRES**

**LABORATOIRE DE SCIENCES ET
TECHNOLOGIES DES ALIMENTS**



UNIVERSITÉ DE LIÈGE (ULiège)

FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

**DÉPARTEMENT DES SCIENCES DES
DENRÉES ALIMENTAIRES**

**SERVICES D'ANALYSE ET DE
TECHNOLOGIE DES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

**QUALITÉS TECHNOLOGIQUES, PHYSICO-CHIMIQUES ET NUTRITIONNELLES
DU FROMAGE PEULH WAGASHI GASSIRE : ÉVALUATION, RISQUES
CHIMIQUES ASSOCIÉS ET PISTES D'AMÉLIORATION**

**TECHNOLOGICAL, PHYSICO-CHEMICAL, AND NUTRITIONAL QUALITY OF
PEULH CHEESE WAGASHI GASSIRE: ASSESSMENT, ASSOCIATED CHEMICAL
RISKS AND IMPROVING WAYS**



Alphonse Wanignon DOSSOU

**Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de DOCTORAT en
SCIENCES VÉTÉRINAIRES (ULiège)
SCIENCES ET TECHNOLOGIES DES ALIMENTS (UAC)**

Année académique 2023-2024

Illustration de couverture

Fromage Wagashi Gassirè rouge et blanc : Photos prises par l'auteur, 2019



UNIVERSITÉ DE LIÈGE
FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
DÉPARTEMENT DES SCIENCES DES DENRÉES ALIMENTAIRES
SERVICES D'ANALYSE ET DE TECHNOLOGIE DES DENRÉES ALIMENTAIRES

QUALITÉS TECHNOLOGIQUES, PHYSICO-CHIMIQUES ET NUTRITIONNELLES
DU FROMAGE PEULH WAGASHI GASSIRE : ÉVALUATION, RISQUES
CHIMIQUES ASSOCIÉS ET PISTES D'AMÉLIORATION

TECHNOLOGICAL, PHYSICO-CHEMICAL, AND NUTRITIONAL QUALITY OF
PEULH CHEESE WAGASHI GASSIRE: ASSESSMENT, ASSOCIATED
CHEMICAL RISKS AND IMPROVING WAYS

Alphonse Wanignon DOSSOU

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

ANNÉE ACADÉMIQUE 2023-2024



RÉPUBLIQUE DU BÉNIN

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES AGRONOMIQUES ET DE L'EAU

FORMATION DOCTORALE : Nutrition, Sciences et Technologies Alimentaires

OPTION : Sciences et Technologies des Aliments

**QUALITÉS TECHNOLOGIQUES, PHYSICO-CHIMIQUES ET NUTRITIONNELLES
DU FROMAGE PEULH WAGASHI GASSIRE : ÉVALUATION, RISQUES
CHIMIQUES ASSOCIÉS ET PISTES D'AMÉLIORATION**



**THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTORAT EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DES ALIMENTS**

Soutenu publiquement le 20 août 2024

Par

Alphonse Wanignon DOSSOU

Jury de soutenance

Président du jury :	Lamine Saïd BABA-MOUSSA (FAST, UAC, Bénin)
Rapporteurs :	Sylvie AVALLONE (SupAgro, France) Christophe BLECKER (ULiège, Belgique) Flora Josiane CHADARE (UNA, ESTCTPA, Bénin)
Examineurs :	Jean-Luc HORNICK (ULiège, Belgique) Chakirath SALIFOU (EPAC, UAC, Bénin)
Co-directeur de these :	Antoine CLINQUART (ULiège, Belgique)
Directeur de these :	Paulin AZOKPOTA (FSA, UAC, Bénin)
Equipe d'encadrement :	Caroline DOUNY (ULiège, Belgique)
Invités :	Marie-Louise SCIPPO (ULiège, Belgique) Marianne SINDIC (ULiège, Belgique)

ANNÉE ACADÉMIQUE 2023-2024

Jury de défense privée à ULiège :

Président du jury :	Alexandra SALCICCIA (ULiège, Belgique)
Promoteur :	Antoine CLINQUART (ULiège, Belgique)
Promoteur Co-tutelle :	Paulin AZOKPOTA (FSA, UAC, Bénin)
Co-promoteur:	Caroline DOUNY (ULiège, Belgique)
Membres du comité de thèse :	Marie-Louise SCIPPO (ULiège, Belgique) Marianne SINDIC (ULiège, Belgique)
Membres internes ULiège :	Jean-Luc HORNICK (ULiège, Belgique) Christophe BLECKER (ULiège, Belgique)
Membres internes UAC :	Lamine Saïd BABA-MOUSSA (FAST, UAC, Bénin) Chakirath SALIFOU (EPAC, UAC, Bénin)
Membres externes ULiège_UAC :	Sylvie AVALLONE (SupAgro, France) Flora Josiane CHADARE (UNA, ESTCTPA, Bénin)

Jury de défense publique à l'UAC :

Président du jury :	Lamine Saïd BABA-MOUSSA (FAST, UAC, Bénin)
Directeur de these :	Paulin AZOKPOTA (FSA, UAC, Bénin)
Co-directeur de these:	Antoine CLINQUART (ULiège, Belgique)
Equipe d'encadrement :	Caroline DOUNY (ULiège, Belgique)
Invités :	Marie-Louise SCIPPO (ULiège, Belgique) Marianne SINDIC (ULiège, Belgique)
Rapporteurs :	Sylvie AVALLONE (SupAgro, France) Christophe BLECKER (ULiège, Belgique) Flora Josiane CHADARE (UNA, ESTCTPA, Bénin)
Examineurs :	Jean-Luc HORNICK (ULiège, Belgique) Chakirath SALIFOU (EPAC, UAC, Bénin)

Remerciements

Nos sincères remerciements vont d'abord à l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES) qui a financé cette recherche doctorale à travers le projet PRD WALAC.

Nous voudrions, ensuite, remercier du fond du cœur, les personnes qui ont rendu possible la réalisation de cette thèse de doctorat. Il s'agit de :

Professeur **FAROUGOU Souaibou (UAC)**, coordonnateur-sud du projet WALAC, et Professeur **CLINQUART Antoine (ULiège)**, coordonnateur-nord du projet WALAC, pour la bonne gestion administrative du projet, leur écoute attentive et leurs conseils paternels avisés.

Professeur **AZOKPOTA Paulin (UAC)**, Professeur **CLINQUART Antoine (ULiège)** et Docteur **DOUNY Caroline (ULiège)** les promoteurs de cette thèse de doctorat. Je les remercie pour la qualité de l'encadrement scientifique, les conseils avisés et les diverses contributions qu'ils ont apportées à ce travail.

Professeur **SCIPPO Marie-Louise (ULiège)**, membre du comité de thèse ULiège et Directrice du Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires pour son accompagnement scientifique et ses analyses pertinentes et Professeur **SINDIC Mariane (ULiège)**, membre du comité de thèse ULiège pour avoir accepté de nous suivre durant toute la période de cette thèse.

Professeur HOUNHOUGAN Joseph (UAC) et Professeur **YOUSSAO Issaka (UAC)**, tous deux membres du comité de thèse UAC pour leurs précieux conseils et leur contribution scientifique permanente.

Professeur **MAHILLON Jacques (UCLouvain)**, Professeur **PONCELET Marc (ULiège)**, Professeur **MONGBO Roch (UAC)**, Professeur **MADODE Yann (UAC)**, Professeur **SESSOU Philippe (UAC)**, Professeur **BENON MORA Abdoulaye (UAC)**, Professeur **BADOUSI Eric (UAC)**, Docteur **GBENAHOU Hervé (UAC)** et Docteur **AHOUNOU Serge (UAC)**, tous des membres de l'équipe de coordination du projet WALAC pour leurs différents conseils.

SEKO-OROU Baké Marie Thérèse (UAC & ULiège) et **KOMAGBE Gwladys (UAC & UCLouvain)**, toutes deux doctorantes du projet WALAC pour leur esprit de travail d'équipe, leur complicité et leur sens du partage.

BOUTALEB Samiha (ULiège), technicienne au LADA/ULiège, **SOGBOSI Christin (UAC)**, technicien du LaSTA/UAC, **KLEIN Benjamin (ULiège)** et **VANDEVOORDE Pierre (ULiège)**, tous deux techniciens au TDA/ULiège, **DOSSA François (UAC)**, technicien à l'URMAT/UAC pour leur disponibilité et leur sens du sacrifice.

Professeur Pieter Spanoghe (UGhent) du Laboratory of Crop Protection Chemistry (Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University), **Cédric Delforge (ULiège)** du Laboratoire d'Océanologie (Centre MARE, Université de Liège, Belgium), **Unisensor Belgium** et l'équipe du **Laboratoire Provincial de Liège** pour leur assistance technique.

Les doctorants, post-doc et stagiaires avec qui nous avons passé des séjours conviviaux à l'ULiège, à savoir : **VERHELLE Axel (ULiège)**, **HOUNKPE Codjo Eustache (UAC & ULiège)**, **QUE Doan Thi (ULiège)**, **ANH DAO Nguyen Le (ULiège)**, **TALLA OUAMBO Achille Wilfried (ULiège)**, **GOYAJORGE Élisabeth (ULiège)**, **DJOUMESSI Gina France (UDschang & ULiège)**, **HINSON Cyrielle (UAC & ULiège)**, **POLLET Pauline (ULiège)**, **EL GHARBAOUI Nihed (ULiège)**, **DEBRUS Victoria (ULiège)**, **ALI Amira (ULiège)**, **NGUYEN QUOC Tinh (ULiège)**, **HUỠNH THỊ KIM DUYÊN (ULiège)**, **MUSTAFA Ahmed (ULiège)** et **Anne NGOUNO (UDschang & ULiège)**.

Les honorables membres de notre jury et les différents rapporteurs pour l'attention particulière accordée à notre travail malgré leurs multiples occupations, ainsi que **les autorités et les enseignants de l'UAC** et de l'**ULiège** qui sont intervenus dans notre formation doctorale.

Un remerciement particulier au Professeur **SCIPPO Marie-Louise (ULiège)** et à toute son équipe de recherche, mais aussi aux Professeurs **CLINQUART Antoine (ULiège)**, **DAUBE Georges (ULiège)**, **DELCEUSERIE Véronique (ULiège)** et **KORSAK Nicolas (ULiège)** et les différentes équipes de recherche qu'ils encadrent au sein du Département des Denrées Alimentaires (DDA/ULiège) pour les accueils chaleureux lors de nos différents séjours au sein dudit département.

Nos sincères remerciements à nos chers parents, Monsieur **DOSSOU Honoré** et Madame **ASSOCLE Lucienne** et nos frères et sœurs, en particulier, **Florence, Françoise, Dominique, Brigitte, Joël et Gwladys** pour leurs diverses contributions à la réalisation de cette thèse de doctorat.

Je voudrais, enfin, remercier très sincèrement ma très chère épouse **ATTIOGBE Chimène** et mon cher enfant **DOSSOU Prince Almène**, pour leur patience, leur soutien et encouragement. Que Dieu les bénisse abondamment.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

UAC:	Université d'Abomey-Calavi
UCLouvain :	Université Catholique de Louvain
ULiège :	Université de Liège
PRD :	Projet de Recherche-Développement
ARES :	Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur
WALAC :	Projet PRD intitulé "Amélioration des procédés de production et de conservation du lait caillé et du Wagashi Gassirè par la recherche-action en partenariat avec les acteurs de la filière lait au Bénin"
WG:	Wagashi Gassirè
RWG:	Red Wagashi Gassirè
WWG:	White Wagashi Gassirè
EFSA :	European Food Safety Authority
AFSCA :	Agence Fédérale de la Sécurité de la Chaîne Alimentaire
FAO :	Food and Agriculture Organization of the United Nations
WHO :	World Health Organisation
JECFA :	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
BMDL	Benchmark Dose Low Level
MRS :	Méthodologie de Réponse Surface
PCC :	Plan Composite Centré

TABLE DES MATIÈRES

RESUME.....	1
SUMMARY	3
PRÉAMBULE GÉNÉRAL	5
1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	9
1.1. Introduction	9
1.1.1. Importance et composition du lait et du Wagashi Gassirè produits au Bénin.....	9
1.1.2. Technologie fromagère et procédés traditionnels de production et de conservation du Wagashi Gassirè produit au Bénin	23
1.1.3. Risques chimiques associés à la consommation du lait et du Wagashi Gassirè.....	36
1.1.4. Disponibilité alimentaire et santé publique au Bénin	50
1.2. Problématique, questions de recherche et objectifs de l'étude.....	51
2. SECTION EXPERIMENTALE	55
Méthodologie globale de recherche.....	55
ETUDE 1 : Caractéristiques des procédés traditionnels de production et de conservation du Wagashi Gassirè au Bénin.....	59
ETUDE 2 : Caractéristiques nutritionnelles et risques chimiques associés au Wagashi Gassirè vendus dans les marchés du sud du Bénin.....	85
ETUDE 3_Partie I : Impact de la saison et de la région sur la qualité du lait et du Wagashi Gassirè produit au Bénin	123
ETUDE 3_Partie II : Impact des technologies sur la qualité du Wagashi Gassirè produit au Bénin ..	149
ETUDE 4 : Conditions optimales de coagulation du lait lors de la production du fromage Peulh Wagashi Gassirè au Bénin.....	171
ETUDE 5 : Conditions améliorées de conservation et impact sur la qualité du Wagashi Gassirè.....	209
3. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	245
3.1. Production, conservation et sources de contamination chimique du Wagashi Gassirè	245
3.2. Caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles du Wagashi Gassirè produit au Bénin.....	247
3.3. Risques chimiques associés à la consommation du lait et du Wagashi Gassirè produit au Bénin	249

3.4.	Efficacité des méthodes améliorées de production et de conservation du Wagashi Gassirè..	252
3.5.	Applicabilité des améliorations et pérennité de la technologie du Wagashi Gassirè	254
3.6.	Limites de cette étude.....	255
4.	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	259
4.1.	Conclusion générale	259
4.2.	Perspectives	260
	Références	263
	Annexe : Valorisation des résultats de recherche.....	277

RESUME

Le fromage Peulh Wagashi Gassirè (WG) est le dérivé du lait frais de vache le plus connu et le plus consommé au Bénin. Il est obtenu par la coagulation à chaud du lait à l'aide des extraits de *Calotropis procera*. Cependant, les conditions de traite et de conservation du lait cru, les procédés traditionnels et les pratiques de production et de conservation du WG sont souvent inappropriés et génèrent des produits finis de qualité variable qui ne répondent ni aux exigences réglementaires de qualité ni aux préférences des consommateurs. L'amélioration des procédés de production et de conservation du WG apparaît comme une nécessité pour le développement de cette chaîne de valeur au Bénin. Ce travail a été conduit pour répondre à la problématique de l'amélioration des procédés de production et de conservation du WG au Bénin. La démarche méthodologique globale a consisté à une caractérisation technologique, physico-chimique et nutritionnelle du WG, à l'évaluation des risques chimiques associés à la consommation du WG, à la détermination des conditions optimales de coagulation du lait et à la détermination des conditions appropriées de conservation du WG.

La caractérisation des procédés de production et de conservation du WG a été réalisée au moyen d'une enquête technologique auprès de 390 acteurs de la chaîne de valeur WG (84 éleveurs, 165 productrices, 53 commerçants et 88 consommateurs) des communes de Dassa et Nikki. Cette enquête a montré que les consommateurs préféraient le WG pour sa blancheur (63 %), sa douceur (24,7 %), son onctuosité (19,2 %) et sa fermeté (13,7 %). Six méthodes de production du WG, dont trois nouvelles méthodes ont été identifiées, en fonction de la manière dont les extraits de *C. procera* sont utilisés pour préparer le coagulant. La cuisson journalière, parfois avec de sacs plastiques, est la méthode de conservation du WG la plus répandue. La dose de coagulant à utiliser pour la production du WG et des méthodes de conservation appropriées étaient les principales contraintes identifiées. De plus, l'utilisation de marmites en aluminium, la production du WG en plein air et l'utilisation abusive d'antibiotiques peuvent conduire à la contamination chimique du WG.

Pour la caractérisation nutritionnelle, des échantillons de WG ont été collectés à Abomey-Calavi (9 WG rouges et 6 WG blancs), à Dassa et à Nikki (24 échantillons de lait, 24 échantillons de WG blancs et 24 échantillons de WG rouges collectés en fonction de la saison). L'analyse de ces échantillons a révélé que les acides oléique, palmitique et stéarique, le calcium et le phosphore étaient les principaux acides gras et minéraux essentiels du lait et du WG. Les teneurs en protéines et en matières grasses des échantillons de lait de la saison pluvieuse ($3,1 \pm 0,3$ et $5,4 \pm 0,8$ g/100g poids frais (pf), respectivement) étaient significativement plus élevées que ceux de la saison sèche ($2,7 \pm 0,4$ et $4,8 \pm 0,5$ g/100g pf, respectivement). Cependant, les teneurs en protéines et en matières grasses des échantillons de WG étaient similaires durant les saisons, mais significativement différentes entre les régions (Nikki > Dassa).

Dans les échantillons de WG collectés à Abomey-Calavi, le plomb ($0,08 \pm 0,06$ mg/kg pf) et l'AFM1 ($0,3 \pm 0,0$ μ g/kg pf) ont été détectés, dépassant les limites maximales fixées par les réglementations internationales. La cadavérine et la tyramine étaient les principales amines biogènes détectées. Aucun résidu de pesticide n'a été détecté. Des résidus de quinolones, de tétracyclines et de colistine ont également été détectés. Toutefois, les expositions chroniques calculées ont révélé des risques négligeables pour le plomb, l'AFM1, l'arsenic, l'aluminium, l'histamine et la tyramine pour les consommateurs de WG.

Au regard des contraintes identifiées par l'enquête, les conditions optimales de coagulation du lait au cours de la production du WG avec les extraits de *C. procera* ont été déterminées par la méthode de réponse surface associée un plan composite centré. Les résultats ont révélé que le temps optimal de trituration de 5 min et la quantité optimale de 5 g/kg de lait de tige de *C. procera* pouvaient être utilisés pour produire un WG respectant les préférences des consommateurs (protéines : 39 % poids sec (ps) ; matière grasse : 42 % ps ; luminance : 93) en 16 min avec une rétention de matière sèche de 64 % à partir d'un lait ayant 25 % ps de protéines, 33 % ps de graisse et 86 de luminance. En outre, l'effet combiné de la cuisson à la vapeur et du conditionnement sous vide sur la qualité du WG pendant le stockage à 28 °C ou à 5 °C a été évalué. Indépendamment de la température et des traitements thermiques, aucune différence significative n'était observable pour la matière sèche, les protéines, la graisse totale, les acides gras et les minéraux essentiels des échantillons de WG durant le stockage. Le pH et l'Aw des échantillons de WG conservés à 28 °C ont diminué de manière significative ($p < 0,05$) et ces diminutions étaient plus importantes pour le WG emballé simplement que pour le WG emballé sous vide, tandis que le pH et l'Aw sont restés constants pour les échantillons de WG conservés à 5 °C. Pour les panélistes, le WG produit dans les conditions optimales répondait mieux aux critères de préférence et les attributs sensoriels des échantillons du WG étaient mieux préservés par l'emballage sous vide que par l'emballage simple et par la basse température que la température ambiante.

En conclusion, le WG est produit au Bénin en utilisant plusieurs variantes technologiques. Les bonnes propriétés nutritionnelles du WG ont été confirmées par ses teneurs en acides gras et minéraux essentiels et en protéines. Cependant, le type de lait, la région et la saison de production sont des facteurs significatifs qui contribuent aux différences de composition du WG. Les principales contraintes de la chaîne de valeur du WG ont été solutionnées, et ont permis de déterminer les conditions optimales de coagulation du lait et de conservation du WG. Cette étude contribue à la caractérisation du WG et constitue une première étape vers le développement d'une méthode rentable et facile à utiliser de production d'un WG de qualité standard.

Mots clés : lait, fromage, composition nutritionnelle, risques chimiques, procédés de production, pratiques de conservation, coagulation, méthode de réponse surface, emballage sous vide, Wagashi Gassirè.

SUMMARY

Peulh cheese Wagashi Gassirè (WG) is the most widespread and consumed dairy products obtained from the fresh cow's milk in Benin. Its processing is based on the hot coagulation of fresh milk induced by *Calotropis procera* extracts. However, the milking and storage conditions of the raw milk, and the traditional processing methods of WG and the preservation practices are often inappropriate, resulting in WG of variable quality that meet neither regulatory requirements nor consumer preferences. Improving WG processing methods and preservation processes is essential for the development of this value chain in Benin. This study was conducted to address the problem of improving WG processing methods and preservation processes in Benin. The overall methodological approach consisted of the technological, physico-chemical and nutritional characterisation of the WG, the assessment of the chemical risks associated with its consumption, the determination of the optimal milk coagulation conditions during WG processing, and the determination of the appropriate conditions of WG preservation.

The characterisation of WG processing methods and preservation practices was performed by a survey carried out among 390 actors of the WG value chain (84 dairy farmers, 165 producers, 53 traders, and 88 consumers) from Dassa and Nikki. This survey showed that WG was highly preferred by consumers for its whiteness (63.0%), softness (24.7%), smoothness (19.2%), and firmness (13.7%). Six milk processing methods, including three new WG production methods were identified, depending on how the *C. procera* extracts were pre-treated and used during WG production. Daily boiling and sometimes with plastic bags was the most widely used as WG preservation method. The dose of the coagulant to be used during WG production and the appropriate conservation method were the main constraints found during this survey. Moreover, the use of aluminium cooking pots, WG open-air production, and antibiotic misuse may lead to the chemical contamination of WG.

For the nutritional characterisation, WG samples were collected from Abomey-Calavi (15 WG samples including 9 Red WG and 6 white WG), Dassa and Nikki (24 milk samples and the corresponding 24 white WG and 24 red WG samples from the rainy and the dry season). The analysis of these samples revealed that oleic, palmitic and stearic acids, calcium, and phosphorus were the main WG and milk fatty acids and minerals. The protein and total fat contents of rainy milk samples (3.1 ± 0.3 and 5.4 ± 0.8 g/100g wet weight (ww), respectively) were significantly higher than the dry one (2.7 ± 0.4 and 4.8 ± 0.5 g/100g ww respectively). However, the protein and total fat contents of WG samples were similar throughout the season, but significantly different between regions (Nikki > Dassa).

For the samples collected in Abomey-Calavi, lead (0.08 ± 0.06 mg/kg wet weight) and AFM1 (0.3 ± 0.0 µg/kg ww) were detected exceeding the maximum level set by the international standard. Cadaverine and tyramine were the main biogenic amines found. No pesticide residues were detected using a

multiresidue method targeting compounds. Residues of quinolones, tetracyclines, and colistin antibiotics were also detected. However, the calculated chronic exposure indicated no public health concern for lead, AFM1, arsenic, aluminium, histamine and tyramine for WG consumers.

Regarding the constraints identified by the survey, the optimum conditions of milk coagulation during WG processing using *C. procera* extracts were determined using the Surface Response Methodology through a Centered Composite Plane. The results revealed that the optimum trituration time (5 min) and the quantity of the stem of *C. procera* (5g/kg milk) could be used to produce a WG respecting consumer preferences (proteins: 39 % dry weight (dw); fat: 42 % dw; lightness: 93) in 16 min with a dry matter retention factor of 64 % from milk of the following characteristics: protein 25 % dw, fat 33 % dw, lightness 86. Moreover, the combined effect of steaming and vacuum packaging on the WG quality during storage at 28°C or 5°C was assessed. Regardless of the storage temperature and preservation treatments, no significant differences were found in the dry matter, proteins, fat contents, fatty acids, and essential mineral composition of the WG samples during storage. The pH and Aw of the WG samples stored at 28°C significantly ($p < 0.05$) decreased and these decreases were more important for simple packaged WG (6.5 – 6 for pH and 0.997 – 0.988 for Aw) than vacuum packaged WG (6.5 – 6.2 for pH and 0.998 – 0.992 for Aw) while pH and Aw remained constant for WG samples stored at 5°C. For the panellists, the WG produced using the optimum conditions better met consumer preference criteria and the sensorial attributes of WG samples were better preserved by vacuum packaging than simple packaging and by a lower temperature than room temperature.

In conclusion, WG is produced in Benin using various traditional processing methods. The good nutritional properties of WG was confirmed by its essential fatty acids, minerals, and protein contents. However, the type of milk, region, and season of production were significant factors in contributing to the differences in WG composition. The main constraints in WG value chain were addressed leading to the determination of the optimal milk coagulation conditions and the appropriate preservation process. This study contributes to the characterization of WG and is a first step towards the development of a cost-effective and easy-to-use method for producing standard quality WG. However, further studies should be carried out for the technological transfer and the adoption of the innovation of this study.

Key words: milk, cheese, nutritional composition, chemical hazards, processing methods, conservation practices, coagulation, response surface methodology, vacuum packaging, Wagashi Gassirè.

PRÉAMBULE GÉNÉRAL

Au Bénin, en dehors de son importance alimentaire et nutritionnelle, le lait a une importance socio-économique non négligeable, notamment dans les communautés rurales Peuhl où le lait et les produits laitiers contribuent pour plus de 50 % aux revenus annuels des ménages à travers la commercialisation primaire et la transformation du lait (Sessou, 2013). Cependant, l'une des contraintes majeures à la promotion de la filière est la forte périssabilité du lait. À cela s'ajoute le tabou Peuhl qui interdit le retour au campement du lait invendu, préalablement emporté au marché (Dossou et al., 2006). Ainsi la transformation du lait s'impose comme une alternative intéressante puisqu'elle augmente son aptitude à la conservation, facilite sa manutention et son transport et améliore le revenu tiré de sa production.

Au Bénin, le lait frais est transformé en divers produits laitiers commercialisés et consommés sur toute l'étendue du territoire national. Les procédés traditionnels permettent d'obtenir notamment le fromage local appelé Wagashi Gassirè (WG), le lait caillé (LC), le beurre, et l'huile de beurre. Parmi les produits issus de la transformation du lait de vache, le WG demeure le plus répandu et le plus consommé, tant en milieu rural qu'en milieu urbain (Dossou et al., 2006 ; Mattiello et al., 2018).

Le WG est un fromage à pâte molle obtenu par coagulation à chaud du lait entier, sous l'action de la calotropaine, une enzyme végétale relativement résistante à la chaleur présente dans le latex de *Calotropis procera*, aussi appelé pommier de Sodome, arbuste commun des régions arides de l'Afrique de l'Ouest (Baba-Moussa et al., 2007 ; Dossou et al., 2006). Le WG est très apprécié et fortement demandé par les populations du Bénin, du Togo, du Nigéria et d'autres pays de la sous-région ouest-africaine (Dossou et al., 2006). Dans ces pays, il est consommé fréquemment en remplacement de la viande et du poisson dans divers plats alimentaires (Kees, 1996). La production du WG est essentiellement assurée par les productrices Peuhl qui sont de fait les principales actrices de cette chaîne de valeur. (Chabi et al., 2015). Cependant, les conditions peu hygiéniques de traite, de transport et de conservation du lait cru, les procédés traditionnels et les pratiques d'hygiène de production et de conservation du WG sont souvent inappropriés et génèrent des produits finis qui ne répondent ni aux exigences réglementaires de qualité ni aux préférences des consommateurs. L'amélioration des procédés de production et de conservation du WG apparaît comme une nécessité pour le développement de la filière lait au Bénin, l'augmentation des revenus des acteurs et la satisfaction des consommateurs.

Certes, des travaux scientifiques ont été menés visant à améliorer les techniques de production et/ou de conservation du WG (Baba-Moussa et al., 2007 ; Keke et al., 2009 ; Mazou et al., 2012 ; Tchobo et al., 2014 ; Aïssou et al., 2016 ; Dossou et al., 2016a). Mais ces travaux restent limités aux sphères technologiques de la recherche scientifique sans qu'il y ait de transfert de technologie vers les groupes cibles. Les capacités d'innovation du secteur sont donc freinées par ce cloisonnement entre les chercheurs et les productrices du WG. Il convient de développer, de commun accord, avec les acteurs de la filière, des techniques adaptées au contexte socio-économique et environnemental en vue

d'améliorer la qualité du WG et les méthodes de sa conservation, et de faciliter son transport, pour ainsi améliorer le revenu tiré par les principaux acteurs de la filière.

C'est dans ce contexte que le projet WALAC, un projet de recherche-développement qui vise l'amélioration des procédés de production et de conservation du Wagashi Gassiré et du lait caillé par la recherche-action en partenariat avec les acteurs de la filière lait au Bénin a été initié. Ce projet financé par l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur, Commission de la Coopération au développement (ARES/CCD) durant la période 2019-2024 concerne le WG et lait caillé (LC). Dans le cadre de la réalisation de ce projet, trois thèses de doctorat sont prévues pour être réalisées en cotutelle entre l'Université d'Abomey-Calavi/Bénin, l'Université de Liège/Belgique et l'Université Catholique de Louvain/Belgique. Les intitulés de ces thèses de doctorat sont les suivants : (1) Logiques des acteurs et perspectives d'amélioration de la chaîne de valeur Wagashi Gassiré au Bénin, (2) Qualités technologiques, physico-chimiques et nutritionnelles du fromage Peulh Wagashi Gassiré : évaluation, risques chimiques associés et pistes d'amélioration, (3) Qualité microbiologique des laits caillés et Wagashi Gassiré produits au Bénin : état des lieux et améliorations.

Le présent document fait le point des études réalisées pour l'évaluation technologique, physico-chimique et nutritionnelle du WG produit au Bénin, la caractérisation des risques chimiques associés à sa consommation et aux pistes d'amélioration des technologies de production et de conservation dudit produit. Il est subdivisé en quatre parties. La première partie est l'introduction. Elle présente une synthèse bibliographique sur l'importance nutritionnelle et socio-économique du lait et du WG, les contraintes des procédés traditionnels de production et de conservation du WG et les contaminants chimiques du lait et des fromages et leur impact sur la santé des consommateurs des fromages, en général, et du WG en particulier. Dans cette première partie, les objectifs de recherche sont également décrits. La deuxième partie de ce document est la section expérimentale. Cette section donne un aperçu de la démarche méthodologique globale adoptée, et présente les résultats obtenus durant les différentes études expérimentales réalisées, résultats qui sont subdivisés en cinq études. La troisième partie est relative à la discussion générale et la dernière partie présente la conclusion et les perspectives.

Les cinq études de la section expérimentale sont : une étude sur les procédés traditionnels de production et de conservation du WG produit au Bénin, une étude sur la qualité physico-chimique et nutritionnelle ainsi que les risques chimiques associés à la consommation du WG vendus dans les marchés du sud du Bénin, une étude sur l'impact de la saison et de la région sur la qualité du lait et du WG résultant produit à partir de trois variantes technologiques. L'ensemble de ces trois études constitue un diagnostic, base des deux études qui portent sur l'optimisation de la coagulation du lait au cours de la production du WG et l'évolution de la qualité nutritionnelle et sanitaire du WG au cours des méthodes améliorées de conservation.

INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

1.1. Introduction

Cette section présente la synthèse bibliographique des différentes études réalisées sur le lait et les fromages, en général, et le fromage WG, en particulier. Un diagnostic de la chaîne de valeur WG au Bénin est aussi présenté afin d'énoncer clairement les problèmes qui soutiennent cette recherche doctorale. Cette section est divisée en trois parties.

La première partie présente l'importance nutritionnelle et socio-économique du lait et du WG produit au Bénin. Dans cette partie, les niveaux de production du lait et du fromage WG sont présentés, leur composition nutritionnelle ainsi que les facteurs de variation de leurs caractéristiques physico-chimiques.

Dans la deuxième partie, les fondements de la technologie fromagère sont présentés ainsi que les variantes technologiques liées à la typicité des fromages produits. Les méthodes de conservation des fromages y compris le fromage WG sont aussi présentées de même que les effets des technologies de production et de conservation sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des fromages.

La troisième partie fait une synthèse des contaminants chimiques du lait et des fromages en relation avec les potentielles implications pour la santé des consommateurs des fromages, en général, et du WG en particulier.

1.1.1. Importance et composition du lait et du Wagashi Gassirè produits au Bénin

Le Bénin, à travers le Plan Stratégique de Développement du Secteur Agricole a identifié les filières lait, viande et œufs de table comme des filières prioritaires pour le développement du secteur agricole. À travers le Programme d'Action du Gouvernement (PAG) 2021-2026, le pays prévoit investir 34 milliards de FCFA pour l'amélioration des performances de ce secteur (MAEP, 2017).

1.1.1.1. Caractéristiques du cheptel bovin et productivité des races bovines

Caractéristiques du cheptel bovin béninois

Le cheptel bovin béninois est élevé selon deux principaux systèmes d'élevage : le système d'élevage traditionnel et le système d'élevage semi-amélioré en raison du potentiel et des contraintes des zones agropastorales (MAEP, 2014). Le système semi-amélioré se caractérise par une amélioration du système de production, notamment la conduite des animaux, l'organisation de la production par le biais de l'alimentation, le suivi sanitaire, l'apport de compléments alimentaires et l'amélioration du potentiel génétique des races locales (N'diaye, 2006 ; Yaokorin, 2007 ; Ferrari, 2013). Il n'occupe que 2 % des

éleveurs et est pratiqué dans les fermes gouvernementales (Okpara, Betecoucou, Samiondji, et Kpinnou) (Anihouvi et al., 2019). Basé principalement dans le nord du pays, le système de production traditionnel est le plus représenté, compte tenu du potentiel de la zone et de sa faible densité humaine. Il fournit 85 % du cheptel bovin national (Anihouvi et al., 2019). Le système semi-amélioré assure une production continue en toutes saisons. Le système d'élevage traditionnel est le plus répandu au Bénin et est caractérisé par l'inexistence de logements pour les animaux qui vivent toute l'année sur des parcs non entretenus. Les pâturages naturels constituent alors les seules sources d'alimentation des animaux et la reproduction est basée sur la monte naturelle avec une quasi-inexistence d'un plan de prophylaxie (Figure 1). Ce système d'élevage traditionnel est très dépendant de l'environnement et des aléas climatiques (Soulé, 2015).



Figure 1 : Troupeau en pâturage à Kandi (Adigbli, 2014)

Près de 90 % du cheptel national est concentré dans les départements septentrionaux du pays (Youssao et al., 2013) avec 63 % dans les départements du Borgou et de l'Alibori. Les Peulh possèdent 95 % du cheptel bovin national et sont ainsi les acteurs incontournables pour la fourniture de protéines animales du pays (Dehoux et Hounsou-Vè, 1993). Dans les systèmes d'élevage traditionnels, les races élevées sont composées des taurins (*Bos taurus*) de race Lagunaire, Borgou et Somba, des zébus (*Bos indicus*) M'bororo, Goudali et White Foulani, ainsi que des sujets hybrides issus de leur croisement (Figure 2). Dans les systèmes d'élevage semi-améliorés, les races utilisées sont composées de la Holstein Frisonne, du Gir, du Girolando, du N'Dama, de l'Azawak, en races pures, ainsi que des sujets hybrides issus de leurs croisements comme Borgou-Girolando, Borgou-Hostein, Borgou-Nellore et Borgou-Gir (Gbangboché et Alkoiret, 2011 ; Dossou et al., 2016b). Parmi toutes ces races, la race Borgou est la plus rencontrée à l'échelle nationale et représente 51 % du cheptel national bovin. Le cheptel national bovin

fait l'objet de déplacements cycliques et d'amplitude variable de troupeaux de bovins de 60 à 80 têtes. L'effectif moyen de bovins de race Borgou dans les élevages est de 57 bovins dans l'Alibori, 83 bovins dans l'Atacora et 63 bovins dans le Borgou. Dans la Commune de Gogounou située dans le Département de l'Alibori, l'effectif moyen de bovins Borgou dans les élevages et son écart -type sont de 78 ± 56 têtes (Youssao et al., 2013).



Figure 2 : Quelques races bovines élevées au Bénin : Borgou (haut-gauche), Girolando (haut-droite), Azawak (bas-droite) et Lagunaire (bas-gauche) (Soulé, 2015)

Productivité des races bovines

La vache de race Borgou produit en moyenne 0,8 litre de lait par jour (Gbangboche et Alkoiret, 2011). Cette production peut atteindre 1,77 litre par jour si cette race Borgou reçoit un complément alimentaire (Senou et al., 2008). Par ailleurs, Kassa et al (2016a) ont rapporté une production moyenne journalière de 0,83 litre de lait pour la race Borgou avec une estimation de 1 litre de lait dans le système semi-amélioré. Sabi (2004) a rapporté une production de 1,53 litre de lait par jour chez les zébus Bororo blancs élevés en système traditionnel. La race Girolando produit en moyenne 6,94 litres de lait par jour (Doko et al., 2012). Pour Kassa et al (2016a), la meilleure productivité est obtenue chez la vache Girolando (4,77 litres de lait par jour), suivie de la vache Borgou (0,83 litre par jour), la vache métissée Azawak x Lagunaire (0,69 litre par jour) et la race Lagunaire (0,36 litre par jour). Compte tenu de la faible productivité de la race Lagunaire et afin d'améliorer le niveau de la production laitière des Lagunaires, des croisements ont été effectués entre cette race et le zébu Azawak, reconnu pour sa production plus élevée de lait (4,5 litres par jour) (MAEP, 2014). Les performances de production laitière de certaines races sont résumées dans le Tableau 1. Les races Girolando et Azawak se révèlent être les plus performantes en production laitière au Bénin.

Tableau 1 : Moyenne de productivité laitière journalière de quelques races bovines au Bénin (Anihouvi et al., 2019)

Races bovines	Origines	Aire de distribution	Production laitière (litre/jour)
Lagunaire	Bénin : sud	Bénin, Guinée, Côte d'Ivoire, Ghana	- 0,36 L/j en élevage traditionnel
Somba	Bénin: Atacora	Bénin, Togo	- 0,48 L/j en élevage traditionnel
Borgou	Bénin : Borgou	Bénin, Togo, Burkina Faso, Nigeria	- 0,8-1,3 L/j en élevage traditionnel - 0,8-1,77 L/j en élevage semi-amélioré
Zebu M'Bororo	Niger	Niger, Sudan, Nigeria, Mali, Burkina Faso, Bénin	- 1,75 L/j en élevage traditionnel
Zebu Azawark	Niger : Vallée de l'Azawak	Niger, Mali, Burkina Faso, Bénin	- 4,5 L/j en élevage traditionnel - 6,74 L/j en élevage semi-amélioré
Zebu White Fulani	Niger, Nigeria	Niger, Nigeria, Mali (Macina), Bénin	- 1,52 L/j en élevage traditionnel - 2,65 L/j en élevage semi-amélioré - 3,14 L/j en élevage amélioré
Azawak x Lagunaire	Bénin	Samiondji (Sud du Bénin)	- 0,75 L/j en élevage semi-amélioré
Girolando x Borgou	Bénin	Bénin	- 5,5 L/j en élevage semi-amélioré
Gir x Borgou	Bénin	Bénin	- 10 L/j en élevage semi-amélioré
Holstein x Borgou	Bénin	Bénin	- 3 L/j en élevage semi-amélioré

Facteurs non génétiques influençant la productivité des bovins

Plusieurs facteurs non génétiques influencent la productivité des bovins. Ces facteurs sont surtout d'ordre environnemental et sont des sources de variation des performances zootechniques des animaux à l'instar des gains de poids et de la production de lait. Les principaux facteurs qui agissent sur la production du lait sont, entre autres, la saison de vêlage, le rang de mise bas, le mode d'alimentation, l'année de mise bas, le système d'élevage, le système d'exploitation, la durée du pâturage des vaches en lactation, etc. (Kassa et al., 2016b).

1.1.1.2. Production du lait, des produits laitiers et du Wagashi Gassirè

Production du lait au Bénin

L'évolution de la production laitière ainsi que du cheptel bovin béninois de 1961 à 2022 est présentée à la Figure 3. Les valeurs de la production laitière de 1961 à 2000 sont estimées tandis que celles de 2020 sont officielles (FAOSTAT, 2024). De 1961 à 1990, la production laitière annuelle variait de 4.824 à 15.600 tonnes avec une moyenne de 10.361 tonnes. De 1991 à 2022, la production laitière au Bénin est passée de 63.748 à 114.625 tonnes avec une moyenne annuelle de 91.587 tonnes. Le cheptel bovin est passé de 321.609 à 1.080.000 têtes de 1961 à 1990, avec une moyenne de 695.173 têtes et de 1.880.000 à 2.313.666 têtes, avec une moyenne annuelle de 1.798.470 têtes de 1991 à 2022. La tendance de la production laitière semble être largement liée au cheptel bovin. Cela suggère donc que le nombre de vaches laitières est le principal moteur de la production laitière au Bénin. Depuis les années 2000, le Bénin a introduit des races exotiques de bovins telles que Girolando et Azawak, qui présentent des rendements laitiers nettement supérieurs à celui des bovins Borgou (Achaglinkame et al., 2023). Cette initiative peut expliquer en partie les quantités de lait produites par le Bénin au cours des dernières décennies. Le secteur connaît une croissance annuelle de 2,58 % (MAEP, 2017). Sur cette base, la production laitière du Bénin en 2025 serait d'environ 123.726 tonnes. Avec le volume actuel de production laitière, le Bénin accuse un déficit important qui est comblé par des importations de produits laitiers (lait concentré, poudre de lait). Ces importations prennent aujourd'hui des proportions insoutenables et occasionnent une hémorragie de devises qu'il convient de limiter par une augmentation et une valorisation de la production laitière locale (MAEP, 2014).

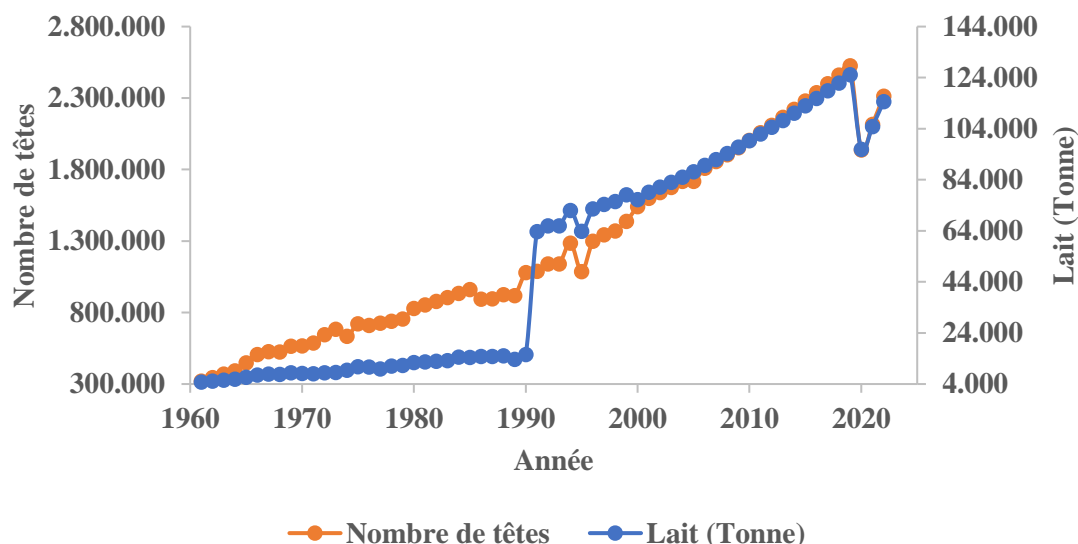


Figure 3 : Evolution du cheptel bovin et de la production laitière de 1961 à 2022 au Bénin
(FAOSTAT, 2024)

La production laitière est saisonnière et inégalement répartie sur le territoire national avec une forte concentration dans les régions du Nord Bénin. Les départements « grands producteurs de lait » sont le Borgou-Alibori (60 %), suivi de l'Atacora-Donga (20 %) et du Zou-Collines (12 %) (Soulé, 2015). Les communes grandes productrices de lait sont celles de la zone cotonnière et de la vallée du Niger : Banikoara, Kalalé, Gogounou, Kandi, Bembèrèkè, Kouandé, Kèrou, Péhunco, Sinendé, Ségbana, Malanville, Karimama (Tableau 2). Elles génèrent ensemble environ 64 % de la production laitière nationale.

Tableau 2 : Principales zones de production du lait et marchés de fromages Wagashi Gassiré (MAEP, 2014 ; Soulé, 2015)

Départements	Zones de production du lait et du Wagashi Gassiré	Marchés de Wagashi Gassiré
Borgou-Alibori	Gogounou, Nikki, N'Dali, Tchaourou, Bembèrèkè, Kalalé, Parakou.	Petit-Paris, Nikki, N'Dali, Tchatchou, Bembèrèkè, Parakou
Zou-Collines	Dassa, Glazoué, Savè, Savalou, Bantè, Ouèssè, Djidja	Dassa, Glazoué, Paouignan, Ouèssè, Bohicon
Mono-Couffo	Kpinnou, Grand-Popo, Comé	Lokossa, Grand-Popo, Comé, Kpinnou
Atacora-Donga	Péhunco, Natitingou	Péhunco, Kérou

Produits laitiers et Wagashi Gassirè

Des facteurs tels que la forte périssabilité et la disponibilité limitée du lait cru rendent nécessaire sa transformation en des formes plus stables pour une conservation et une utilisation plus longue. À l'échelle mondiale, les produits laitiers peuvent être classés en produits de culture, comme le yaourt, le lait fermenté, certains fromages, la crème acidulée, le babeurre de culture ; en produits laitiers liquides, comme le lait entier, le lait évaporé, le lait écrémé, la crème ; en produits laitiers concentrés, comme le lait concentré ; en produits laitiers en poudre, comme le lait en poudre ; et en produits laitiers congelés, comme la crème glacée, le yaourt congelé et certains fromages (Achaglinkame et al., 2023 ; Anihouvi et al., 2019). Au Bénin, une diversité de produits laitiers compose le marché. Cette diversité va du lait cru produit localement ou importé (entier, demi-écrémé, écrémé) au lait transformé (lait en poudre, lait caillé, yaourt, beurre et l'huile de beurre). Il existe également une boisson fermentée (à base de lait de vache et de céréales) communément appelée "Degue" et le fromage local appelé Wagashi Gassirè (WG) (Anihouvi et al., 2019). Parmi les produits issus de la transformation du lait frais de vache, le WG demeure le plus répandu et le plus consommé, tant en milieu rural qu'en milieu urbain (Dossou et al., 2006 ; Mattiello et al., 2018).

La production du WG est réalisée sur toute l'étendue du territoire béninois. Les départements grands producteurs de lait coïncident avec les zones de grande production de WG (Kora, 2005 ; MAEP, 2014). Les marchés de distribution du fromage sont localisés dans les milieux urbains où la demande est très forte (Tableau 2). Très répandu, le WG existe sous divers aspects selon la couleur et les dimensions (diamètre et épaisseur) (Dossou et al., 2006, Kora, 2005). Considérant la couleur, il existe deux sortes de WG : le WG rouge et le WG blanc (Figure 4). Prenant en compte les dimensions, on observe trois tailles différentes notamment les petites (diamètre < 10 cm, épaisseur ≤ 1,5 cm), les moyennes (diamètre 10-15 cm, épaisseur 1,5-5 cm) et les grandes (diamètre > 15 cm, épaisseur > 5 cm) (MAEP, 2014).



Figure 4 : Fromages WG rouge et blanc (Sessou, 2013)

Au Bénin, il existe deux modèles de production du WG : la production traditionnelle et la production semi-industrielle (MAEP, 2014). La production traditionnelle est dominante et assure la quasi-totalité de la disponibilité du WG sur l'étendue du territoire national. Cette production est réalisée au niveau individuel, voire familial, par la femme Peulh. La production semi-industrielle est assurée par les mini-laiteries installées dans les bassins laitiers du Bénin : Gogounou, Nikki, Banikoara, Tchaourou, Bembèrèkè, Bassila et quelques entreprises privées comme FroBé à Bohicon (sud du Bénin).

Utilisation culinaire du Wagashi Gassirè

Le WG est un produit laitier destiné exclusivement à la consommation humaine. Consommé sous différentes formes dépendant des préférences des consommateurs, le WG frais (blanc ou rouge) est cuit et salé ou frit avec du piment ou incorporé dans les sauces d'accompagnement de plats tels que : l'igname pilée, l'akassa, le riz, la pâte de cossette d'igname, etc (MAEP, 2014).

1.1.1.3. Importance économique et nutritionnelle du lait et du Wagashi Gassirè

Importance économique de la production du lait au Bénin

Durant la saison d'abondance, le prix à la ferme du lait cru est de 200 FCFA le litre (MAEP, 2014). Quand il subit une pasteurisation au niveau des mini-laiteries, le prix du litre de lait est bonifié et varie entre 300 et 400 FCFA (FAO/CEDEAO 2016). La production du lait en 2022 aurait donc généré 22 à 45 milliards de FCFA. Dans les exploitations Peulh, il revient à la femme la charge de commercialiser/transformer le lait, après avoir déduit la part réservée à l'autoconsommation (Chabi et al., 2015). Environ 20 à 25 % du lait sont généralement destinés à l'autoconsommation, mais cette quantité peut atteindre 75 à 80 % en saison sèche ou pendant la transhumance lorsque la production du lait des vaches devient insignifiante (Dossou et al., 2006). Le reste est vendu aux consommateurs généralement au sein des populations riveraines des zones de production, aux productrices de WG et aux mini-laiteries (Kora, 2005). La transformation du lait en WG peut représenter une valeur ajoutée très appréciable de l'ordre du double de la valeur du lait (1.000 FCFA de lait à la ferme pour 2.000 FCFA de WG produit) (MAEP, 2014). Le lait et les produits laitiers contribuent pour plus de 50 % aux revenus annuels des ménages Peulh à travers la commercialisation et la transformation (Sessou, 2013).

Importance nutritionnelle du lait

En dehors de son importance économique, le lait contribue de manière significative à la couverture des besoins en nutriments : protéines de haute qualité, matière grasse, minéraux, vitamines (A, B, C, D, E) et antioxydants (carotènes, folates) qui jouent un rôle essentiel dans la santé et la croissance humaines (Achaglinkame et al., 2023).

Globalement, le lait de vache est composé de 87 % d'eau, de 4 à 5 % de lactose, de 3 % de protéines, de 3 à 4 % de matières grasses, de 0,8 % de minéraux et de 0,1 % de vitamines (Barłowska et al., 2011 ;

Wijesinha-Bettoni et Burlingame, 2013 ; Pereira, 2014). Les protéines du lait de vache contribuent pour 18 à 20 % de l'apport en protéines chez les adultes (Achaglinkame et al., 2023). Les protéines du lait ont une valeur biologique élevée et le lait est donc une bonne source d'acides aminés essentiels. En outre, le lait contient un large éventail de protéines dont les activités biologiques vont des protéines antimicrobiennes à celles qui facilitent l'absorption des nutriments, en passant par les facteurs de croissance, les hormones, les enzymes, les anticorps et les stimulants immunitaires (Haug et al., 2007). Les protéines animales, dont les protéines laitières font partie, présentent une digestibilité supérieure à celle des protéines végétales.

Les données de revue systématique de la composition du lait indiquent que les acides gras saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI) représentent respectivement environ 69-70, 27-30 et 1-4 % de la matière grasse totale (Kalač et Samková, 2010 ; Pereira, 2014). Le lait de vache présente une teneur élevée en acides palmitique, stéarique et oléique et, au sein des AGS, les principaux sont les acides palmitique (30 %), myristique (11 %) et stéarique (12 %) (Wijesinha-Bettoni et Burlingame, 2013 ; Pereira, 2014). Le lait et les produits laitiers souffrent d'une image nutritionnelle négative, en grande partie à cause de la perception par le consommateur de l'association entre certains AGS, en particulier les acides laurique, myristique et palmitique, et une augmentation du risque cardiovasculaire, de l'obésité et de certains cancers (Haug et al., 2007 ; Gómez-Cortés et al., 2018). Toutefois, les recherches actuelles ne permettent pas d'établir un lien entre les biomarqueurs de la consommation de matières grasses laitières et le risque de diabète ou de maladies cardiovasculaires. En outre, les données d'observation ne confirment pas l'hypothèse selon laquelle les produits laitiers riches en matières grasses contribuent au syndrome métabolique ou au risque cardiovasculaire et indiquent même que la consommation de matières grasses laitières dans le cadre de modèles alimentaires typiques est inversement associée à ce risque (Gómez-Cortés et al., 2018). Contrairement aux AGS, les AGPI ont fait l'objet d'une attention croissante en raison de leurs propriétés biologiques bénéfiques pour la santé (CSS, 2019 ; González-Martín et al., 2020). En raison d'un manque d'enzymes appropriées, les mammifères ne peuvent pas synthétiser *de novo* deux AGPI : l'acide α -linoléique et l'acide linoléique, c'est pourquoi ils sont qualifiés d'acides gras essentiels. Ces acides gras jouent de multiples rôles (structure de la membrane cellulaire, signalisation cellulaire, etc.) (Markiewicz-Kęszycka et al., 2013 ; Bodkowski et al., 2016).

Le lait et les produits laitiers sont d'excellentes sources d'éléments minéraux, principalement le calcium, le fer, le magnésium, le phosphore, le potassium, le sodium, le zinc et le manganèse avec le calcium et le phosphore étant les plus abondants (Wijesinha-Bettoni et Burlingame, 2013 ; Pereira, 2014). Dans une revue de données, de la Fuente et Juarez (2015) rapportèrent des teneurs en calcium comprises entre 1.200-1.220 mg/kg et 3.500-5.400 mg/kg de poids frais et des teneurs en phosphore comprises entre 920-1.190 mg/kg et 2.800-3.900 mg/kg de poids frais, respectivement, dans le lait et dans différents types de fromages à pâte molle obtenus à partir du lait de vache. Dans l'alimentation humaine, un apport

adéquat en calcium est essentiel. Un apport suffisant en calcium dans l'alimentation permet d'avoir des os et des dents en bonne santé, et peut également contribuer à prévenir l'hypertension, à diminuer les risques de cancer du côlon ou du sein, à améliorer le contrôle du poids et à réduire le risque de développer des calculs rénaux (Haug et al., 2007). Le phosphore joue d'autres rôles importants dans la production d'énergie pour l'organisme sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), dans la composition des phospholipides et des acides nucléiques, et dans la régulation de la synthèse des protéines (Achaglinkame et al., 2023).

Importance nutritionnelle du Wagashi Gassirè

Le WG est une source importante de macro et micronutriments. Uzeh et al (2006) avaient rapporté que le WG produit dans la région de Lagos (Nigéria) contenait 55 % d'eau, 18 % de graisse, 23 % de protéines et 1,5 % de cendres (poids frais). Par contre, les données rapportées par Appiah et al (1998) indiquèrent que le WG produit à Yeji (région Ashanti du Ghana) contenait 53 % d'eau, 27 % de graisse, 18 % de protéines et 1,4 % de cendres (poids frais). Par son contenu en nutriments, le WG pourrait aider la population à atteindre les apports journaliers recommandés en Europe pour les adultes de 0,83 g de protéines/kg de poids corporel (pc), 1.000 mg de calcium et 11 mg de fer (EFSA, 2019), par exemple. Peu de données sont disponibles sur les caractéristiques physico-chimiques du WG produit au Bénin. Les propriétés physico-chimiques les plus évaluées concernent le pH, la matière sèche et l'acidité titrable. Quant aux propriétés nutritionnelles, elles se rapportent à la teneur en matière grasse, protéines, cendres et sucres totaux (Kora, 2005 ; Aïssi et al., 2009 ; Aïssi et al., 2016 ; Okry et al., 2017). Le pH des WG produits au Bénin est proche du pH du lait frais. Il varie entre 6,26 et 6,55 (Aïssi et al., 2009 ; Aïssi et al., 2016). Sa teneur en eau est comprise entre 60 % et 62 % et son acidité titrable exprimée en pour cents d'acide lactique varie de 0,84 à 1,44 (Aïssi et al., 2009). Les teneurs (poids sec) en matière grasse, protéines et glucide mesurées sont 43-45 %, 33-36 % et 13-15 % respectivement (Kora, 2005). Par ailleurs, les teneurs en graisse rapportées par Aïssi et al (2009) montrent une très grande variabilité attribuable à la qualité des laits utilisés pour la production qui elle-même serait influencée par la race des animaux, leur alimentation, etc. (Aïssi et al., 2009). À ce jour, et à notre connaissance, aucune donnée n'est encore disponible sur les teneurs en minéraux essentiels et en acides gras du lait et du WG produit au Bénin .

1.1.1.4. Facteurs de variation des caractéristiques nutritionnelles du lait et du Wagashi Gassirè

La composition du lait de vache est influencée par de nombreux facteurs (Schwendel et al., 2015 ; Pereira, 2014). Ces facteurs sont d'ordre génétique (race et sélection), physiologique (stade de lactation, période de lactation, bien-être de l'animal), nutritionnel (apports énergétiques et composition des aliments) et environnemental (saison, situation géographique, conditions climatiques). Les interactions

entre ces facteurs sont nombreuses et les mécanismes à l'origine de ces effets ne sont pas entièrement compris (Schwendel et al., 2015).

Caractéristiques nutritionnelles du lait et races bovines

La composition du lait de certaines races bovines élevées au Bénin est présentée dans le Tableau 3. Les données montrent une certaine hétérogénéité qui ne permet pas de comparaison entre auteurs. Selon Dossou et al (2006), aucune différence significative n'est observée entre la teneur en graisse totale du lait des vaches de race Borgou, Girolando, Borgou-Gir et Lagunaire. Toutefois, le lait des vaches de race Borgou-Gir présenterait les teneurs les plus élevées en lactose, en protéines et en minéraux essentiels (magnésium, calcium et zinc) (Dossou et al., 2016b). Par ailleurs, Djibril et al (2019) n'observent pas de différence significative entre les teneurs en matières grasses, en glucides totaux et en protéines des laits de Borgou et Girolando. Mais ils révèlent des différences significatives de composition en minéraux essentiels des deux races bovines. Les teneurs en calcium, phosphore et potassium sont plus élevées, et la teneur en sodium est plus faible dans le lait de la race Borgou. De toutes les races étudiées par Kora (2005), la race Girolando présente la plus faible teneur en protéine et la plus forte teneur en cendres.

Tableau 3 : Propriétés nutritionnelles du lait de vache en fonction des races bovines du Bénin

Race	Race Girolando			Race Borgou			Race Borgou-Gir	Race Lagunaire	
Sources	Dossou et al., 2016b	Kora, 2005	Djibril et al., 2019	Dossou et al., 2016b	Kora, 2005	Djibril et al., 2019	Dossou et al., 2016b	Dossou et al., 2016b	Kora, 2005
Matière sèche	12,8	12,4	13,1	13,2	19,2	11,8	13,1	12,8	16,3
Cendres (% MS)		5,7			1,1				2,0
Graisse (% MS)		36,1			34,5				35,1
Glucides (% MS)		32,4	28,8		32,8	29,3			33,7
Protéines (% MS)	43,4	25,6		42,7	31,5		63,8	37,4	29,1
Minéraux essentiels (mg/kg poids frais)	Magnésium	128		130	159		130	197	192
	Calcium	1623		1010	1561		1090	2056	1641
	Fer	1,7			2,9		1,0	1,7	
	Zinc	3,7			2,9		5,5	3,6	
	Potassium	1169		660	1293		1040	1294	1391
	Phosphore			800			950		
	Sodium			600			480		

MS : Matière sèche

Caractéristiques nutritionnelles du lait et facteurs environnementaux

Les variations saisonnières et régionales de la composition du lait sont principalement liées aux changements dans la disponibilité et la qualité des pâturages au cours de l'année (Johansen et al., 2002 ; Nudda et al., 2005). Par exemple, au Pays-Bas et en Suède, le lait est plus riche en protéines et matières grasses en automne et en hiver qu'au printemps et en été (Heck et al., 2009 ; Lindmark-Mansson et al., 2003). Aussi, les teneurs les plus faibles de protéines totales ont été observées dans les régions occidentales de la Suède et les plus élevées dans les régions orientales. Quant à la teneur en matières grasses, elle varie d'un bout à l'autre du pays, la moyenne la plus basse étant observée dans le sud et la plus élevée dans le nord (Lindmark-Mansson et al., 2003). En Europe, les vaches consomment davantage d'aliments secs en hiver, alors qu'en été, elles mangent de l'herbe au pâturage et restent donc plus longtemps à l'extérieur. Le régime hivernal est généralement associé à des niveaux plus faibles de fibres et plus élevés d'amidon, ce qui entraîne une production accrue d'acide propionique dans le rumen et une augmentation de l'apport microbien en protéines. L'acide propionique est le principal précurseur du glucose, suivi par les acides aminés, et l'apport de nutriments glucogènes entraîne divers signaux hormonaux chez la vache qui se traduisent par une augmentation de la concentration en protéines du lait. Mais en été, la teneur en acide linoléique de l'herbe fraîche est beaucoup plus élevée que celle de l'ensilage d'herbe (hiver), et les niveaux élevés d'acide linoléique sont associés à la production d'acides gras insaturés à longue chaîne spécifiques qui inhibent la synthèse *de novo* des acides gras dans la glande mammaire et réduisent la teneur en matières grasses du lait en été (Johansen et al. 2002 ; Heck et al., 2009).

Parmi les principaux constituants du lait (lactose, matières grasses et protéines), le lactose présente la variation la plus faible et les matières grasses la plus forte, les protéines se situant entre les deux (Heck et al., 2009 ; Capuano et al., 2014 ; Tyasi et al., 2015). Dans une étude réalisée aux États-Unis, les concentrations moyennes en AGS étaient similaires d'une région à l'autre et d'une saison à l'autre (O'Donnell-Megaro et al., 2011). Dans une autre étude réalisée en Suède, le lait prélevé dans le centre se distingue de celui du sud par des teneurs plus élevées en acides stéarique et linoléique et une teneur plus faible en acide palmitique (Larsen et al., 2010). Dans la même étude, les échantillons de lait d'été contenaient des quantités plus élevées d'acide oléique et d'acides linoléiques conjugués (ALC) que le lait d'hiver (Larsen et al., 2010). Lock et Garnsworthy (2002) ont rapporté, dans leur étude réalisée au Royaume-Uni, que les concentrations d'ALC (acides vaccénique et ruménique) et d'acides gras à chaîne courte étaient plus élevées en été (mai, juin, juillet) que pendant les autres saisons. Les tendances saisonnières des concentrations des différents acides gras du lait sont très probablement le résultat de nombreux facteurs interdépendants tels que l'apport d'acides gras par l'alimentation et le métabolisme microbien du rumen (Heck et al., 2009). Par exemple, l'herbe fraîche est riche en acide linoléique, et son incorporation dans le régime alimentaire augmente généralement les apports en acide linoléique et, par conséquent, augmente les concentrations en stéarique, oléique et CLA de la matière grasse du lait

et diminue les concentrations en acides gras à chaîne plus courte synthétisés *de novo* (Larsen et al., 2010 ; Elgersma et al., 2006).

Schwendel et al (2015) ont rapporté que la teneur en minéraux du lait est influencée par la génétique des vaches, la gestion de l'exploitation et le milieu environnant (application d'engrais, élimination des boues d'épuration, type de sol, proximité de zones minières, 'activités industrielles ou émissions par les véhicules automobiles). La composition minérale du lait de vache ne devrait subir que des modifications mineures au cours de l'année (de la Fuente et Juarez, 2015). Par exemple, les concentrations en calcium et en magnésium dans le lait sont hautement héréditaires et ne sont que marginalement influencées par le régime alimentaire (Haug et al., 2007 ; Schwendel et al., 2015).

Qualité du Wagashi Gassirè et facteurs de variation de la composition du lait produit au Bénin

Au Bénin, peu d'études rapportent les interactions entre les facteurs génétiques (race et sélection), physiologiques (stade de lactation, période de lactation, bien-être de l'animal), nutritionnels (valeur énergétique et composition des aliments) et environnementaux (saison, situation géographique, conditions climatiques) et la qualité du lait et du WG qui en est issu. Aissi et al (2016) ont étudié l'effet de la complémentation des vaches laitières Girolando importées au Bénin sur les caractéristiques physico-chimiques du lait et du WG. Le complément alimentaire testé était un mélange de céréales, de tourteaux de coton et de palmiste, acides aminés, calcaire, phosphate bicalcique et farine d'os. Leurs résultats montrent que la complémentation alimentaire des vaches laitières Girolando élevées à l'herbage peut influencer les caractéristiques physicochimiques tant du lait que du WG qui en est issu notamment le pH, la densité et la teneur en sucres. En présence du complément alimentaire, la densité et l'acidité titrable et la teneur en sucres totaux du lait avaient augmenté tandis que le pH et la teneur en cendres avaient baissé significativement. L'acidité des WG correspondants avait augmenté et leur pH avait baissé significativement. Mais aucune variation n'a été observée pour la teneur en cendres du WG. Ces résultats révèlent la forte variabilité des caractéristiques physico-chimiques du lait et du WG en fonction de la complémentation des vaches laitières Girolando (Aissi et al., 2016). Il existerait une variation de la composition des pâturages naturels selon les saisons climatiques de l'année dans les différents bassins laitiers du Bénin. Mais les implications de ces différences de composition de l'alimentation sur la productivité des vaches laitières et la qualité du lait produit ne sont pas connues au niveau physico-chimique (Babatoundé et al, 2011). Des recherches sont donc nécessaires pour déterminer la qualité du lait et WG correspondant en relation avec la qualité physico-chimique de ces pâturages naturels.

1.1.2. Technologie fromagère et procédés traditionnels de production et de conservation du Wagashi Gassirè produit au Bénin

1.1.2.1. Introduction à la technologie fromagère

Le lait de fromagerie

Le lait est une émulsion de matière grasse (globules gras) dans une phase aqueuse contenant des éléments solubles (lactose, protéines du lactosérum, vitamines hydrosolubles et sels minéraux) et d'autres sous forme colloïdale (micelles de caséine) (Rayanitou, 2017).

Protéines et minéraux du lait. Les protéines du lait peuvent être subdivisées en 2 groupes : les protéines du lactosérum (β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine) et les micelles de caséine qui sont des structures sphériques constituées par des associations de monomères des différents types de caséine (α_1 , α_2 , β et κ) et de minéraux (Barłowska et al., 2011 ; Rayanitou, 2017). La caséine est la protéine la plus abondante dans le lait, tandis que la proportion de protéines de lactosérum est relativement faible (Barłowska et al., 2011). La structure de la micelle (structure en éponge) proposée par Dalgleish et Corredigh (2012) est représentée sur la Figure 5. Les α - et β -caséines (orange) sont attachées et relient les nanoclusters de phosphate de calcium (sphères grises). Une partie de la β -caséine (bleu) se lie de manière hydrophobe à d'autres caséines. La para- κ -caséine (en vert) et les chaînes caséinomacropéptidiques (en noir) se trouvent dans les parties les plus externes de la surface.

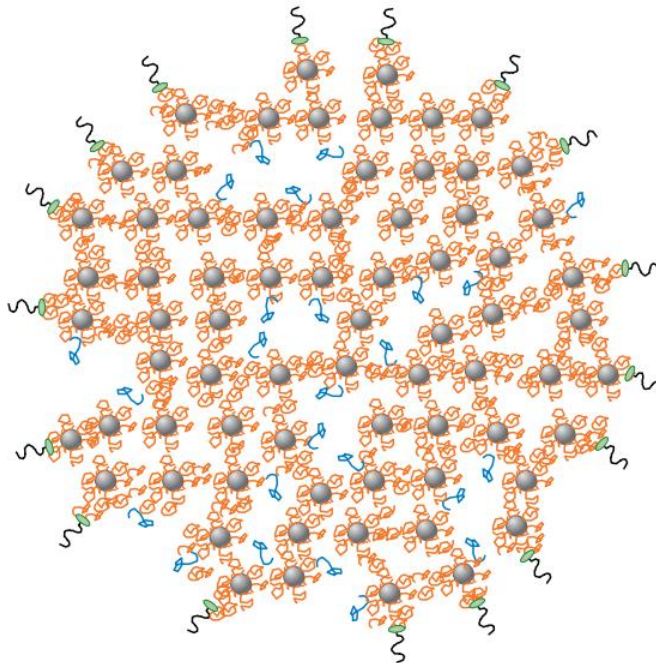


Figure 5 : Coupe schématique d'une micelle de caséine (Dalgleish et Corredigh, 2012)

Les minéraux du lait sont répartis entre sa phase aqueuse et sa phase micellaire : le calcium, le phosphate inorganique et le magnésium sont en grande partie liés à la micelle de caséine alors que le potassium, le chlorure et le sodium sont plus abondants dans la phase aqueuse (Raynatou, 2017). Dans la phase aqueuse, le calcium existe sous forme de complexe stable principalement avec le citrate et dans une moindre mesure avec le phosphate inorganique et avec le chlorure. Le calcium ionique ne représente qu'environ 10 % du calcium total du lait, mais cette partie est libre de réagir et de modifier l'équilibre du calcium et joue un rôle majeur dans la stabilisation, la stabilité à la chaleur et les propriétés superficielles et rhéologiques du lait. Les cations monovalents (sodium et potassium) existent principalement sous forme d'ions libres, mais une petite partie est associée au citrate, au phosphate inorganique et au chlorure (de la Fuente et Juarez, 2015). Dans la phase micellaire, le calcium est associé au phosphate organique (résidus phosphoséryl dans les molécules de caséine) et au phosphate inorganique pour former des nanoclusters (points noirs à l'intérieur de la micelle) (Figure 6).

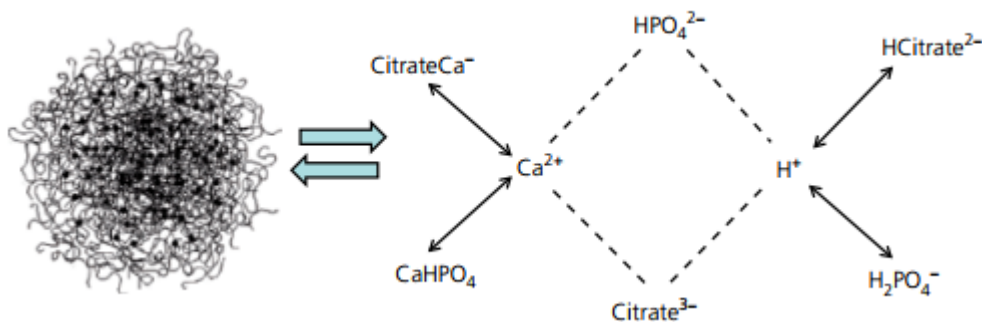


Figure 6 : Équilibre minéral entre les phases solubles (à droite) et micellaires (à gauche) dans le lait à pH 6,7 (de la Fuente et Juarez, 2015)

La matière grasse du lait. La matière grasse du lait est un mélange complexe de triacylglycérols (98 %), diacylglycérol (2 %), cholestérol (5 %), phospholipides (1 %) et acides gras libres (0,1 %). Elle se présente sous forme de globules gras, qui sont des structures sphériques dont le cœur est riche en triacylglycérols et la membrane constituée d'une bicouche de phospholipides reposant sur une monocouche (Raynatou, 2017 ; Lopez et al., 2010). La membrane des globules gras du lait contient les composants typiques de toute membrane biologique tels que le cholestérol, les enzymes, les glycoprotéines et les glycolipides (Figure 7). Les lipides constituent 30 % de la membrane et peuvent être répartis entre les groupes suivants : phospholipides (25 %), cérebrosides (3 %) et cholestérol (2 %). Les 70 % restants de la membrane sont constitués de protéines (Barłowska et al., 2011).

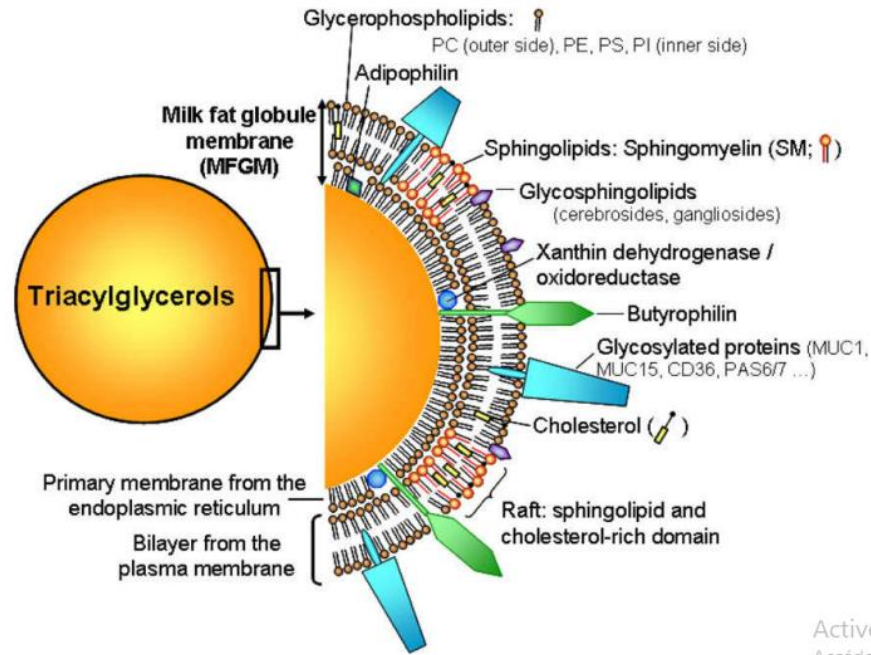


Figure 7 : Représentation schématique du globule gras du lait (Lopez et al., 2010)

Le lactose. Le lactose est le principal hydrate de carbone du lait des mammifères et il contribue à l'équilibre osmotique entre le sang et la lumière alvéolaire dans la glande mammaire. La synthèse et la concentration du lactose dans le lait sont principalement influencées par la santé de la mamelle ainsi que par l'équilibre énergétique et le métabolisme de la vache (Costa et al., 2019). Comme pour d'autres glucides, le lactose peut prendre deux formes anomériques : α -D-galactopyranosyl-(1,4)-D-glucopyranose, appelé α -lactose, et β -D-galactopyranosyl-(1,4)-D-glucopyranose, appelé β -lactose. Les 2 isoformes de lactose diffèrent en termes de solubilité, de rotation spécifique, et le pouvoir sucrant. Ces différences sont cruciales pour les traitements technologiques du lactose, tels que le séchage par atomisation, la cristallisation et les applications en aval. L' α - et le β -lactose présentent tous deux le même profil nutritionnel. Durant la production des fromages, la majeure partie du lactose se retrouve dans le lactosérum. Le lactose du lait utilisable par beaucoup de micro-organismes est à l'origine de la fermentation des produits tels que le yaourt et le fromage (Rayanatu, 2017). Le lactose obtenu à partir du lactosérum peut être utilisé comme excipient pour les comprimés de médicaments, comme base pour les confiseries et les préparations pour nourrissons. Le goût sucré du lactose est moins intense que celui des sucres courants (environ 20 % de moins), ce qui en fait un ingrédient important pour les produits de boulangerie, les crèmes glacées, le chocolat et les bonbons, etc.

La coagulation enzymatique en fromagerie

Définition de fromage. Selon le Codex Alimentarius, le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi-dure, dure ou extra-dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine ne dépasse pas celui du lait, et qui est obtenu: (a) par coagulation complète ou partielle des protéines du lait, du lait écrémé, du lait partiellement écrémé, de la crème, de

la crème de lactosérum ou du babeurre, seuls ou en combinaison, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation, tout en respectant le principe selon lequel la fabrication du fromage entraîne la concentration des protéines du lait (notamment de la caséine), la teneur en protéines du fromage étant par conséquent nettement plus élevée que la teneur en protéines du mélange des matières premières ci-dessus qui a servi à la fabrication du fromage et/ou (b) par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation des protéines du lait et/ou des produits provenant du lait, de façon à obtenir un produit fini ayant des caractéristiques physiques, chimiques et organoleptiques similaires à celles du produit défini à l'alinéa (a) (FAO/WHO, 2018).

Les coagulants enzymatiques. Les coagulants enzymatiques sont nombreux et les principaux types d'enzymes sont la présure animale, la chymosine obtenue par génie génétique, les coagulants d'origine microbienne et les enzymes de coagulation d'origine végétale (Jacob et al., 2011). La présure animale (principale source de chymosine) est l'agent de coagulation du lait préféré en raison de sa grande efficacité à coaguler le lait, ce qui permet d'obtenir une texture de caillé appropriée et un rendement fromager élevé (Mazorra-Manzano et al. 2018). La présure contient de la chymosine et de la pepsine. La chymosine est connue pour sa grande spécificité à cliver le glycomacropéptide de la k-caséine qui déclenche la déstabilisation des micelles de caséine et induit donc la coagulation du lait alors que la pepsine est beaucoup moins spécifique (Jacob et al., 2011). Toutefois, l'augmentation de la production mondiale de fromage, associée à la réduction de l'offre et à l'augmentation des prix de la présure de veau, a conduit à la recherche d'autres enzymes de coagulation du lait, en tant que substituts appropriés de la présure. Par ailleurs, certains facteurs religieux (islam et judaïsme) et d'autres liés au végétarisme de certains consommateurs ont considérablement limité l'utilisation de la présure animale (Ben Amira et al., 2017). Dans ce contexte, l'utilisation d'enzymes de coagulation d'origine végétale dans la fabrication des fromages continue d'être appliquée avec succès et acceptée, ce qui permet de valoriser certains fromages produits dans certaines régions du monde. Les principales classes d'enzymes de coagulation d'origine végétale du lait sont les protéases aspartiques, à sérine et à cystéine. Le Tableau 4 présente ces principales classes d'enzymes d'origine végétale et quelques-unes de leurs caractéristiques.

Tableau 4 : Exemples d'enzymes coagulantes d'origine végétale (Ben Amira et al., 2017 ; Rayanatou, 2017 ; Mazorra-Manzano et al., 2018)

Plante	Organe	type	Nom
<i>Actinidia chinensis</i>	Fruits	Protéase à cystéine	Actinidine
<i>Albizia lebbek</i>	Grains	Protéase à cystéine	Extrait enzymatique
<i>Balanites aegyptiaca</i>	Fruits	Protéase aspartique et à sérine	
<i>Calotropis procera</i>	Latex	Protéase à cystéine	Calotropaine
<i>Cirsium vulgare</i>	Fleurs	Protéase aspartique	Cirsin JN703462
<i>Citrus aurantium</i>	Fleurs		Extrait enzymatique
<i>Cucumis melo</i>	Fruits	Protéase à sérine	Cucmisine
<i>Cynara scolymus</i>	Fleurs	Protéase aspartique	Cynarase
<i>Ficus carica sylvestris</i>	Branches, Latex	Protéase à cystéine	Ficine
<i>Ficus religiosa</i>		Protéase à sérine	Religosine
<i>Helianthus annuus</i>	Grains	Protéase à cystéine	Extrait enzymatique
<i>Moringa oleifera</i>	Fleurs	Protéase aspartique	Extrait enzymatique
<i>Sideroxylonobtusifolium</i>	Tige, latex	Protéase à cystéine	
<i>Silybum marianum</i>	Fleurs	Protéase aspartique	Extrait enzymatique
<i>Solanum dubium</i>	Grains	Protéase à sérine	Dubiumine
<i>Fresen</i>			

***Calotropis procera*.** Il s'agit d'un arbuste à bois mou d'écorce épaisse et rugueuse et dont la hauteur ne dépasse pas 6 m (Kees, 1996) ; c'est une plante de la famille des *Asclepiadaceae*, très répandue en Afrique de l'Ouest et de l'Est ainsi que dans les autres régions tropicales. On la rencontre également en Asie, notamment en Inde et au Pakistan (Dossou et al., 2006). C'est un arbuste caractérisé par de grandes feuilles ovales de couleur gris vert, opposées, sessiles, couvertes d'un velours dense formé de petites fibres blanches. Ses fleurs sont blanches et violettes de 15 mm de diamètre avec une corolle large de 2 à 3 cm formée de 5 pétales verdâtres portant une tache violacée au sommet. Le fruit est un follicule verdâtre, ovoïde, lâchement et mollement fibreux à l'intérieur (Figure 9). Les graines sont aplaties et surmontées d'une aigrette blanche. Toutes les parties de la plante sont riches en sève laiteuse (Rayanatou, 2017 ; Baba-Moussa et al., 2007). *Calotropis procera* est utilisée en pharmacopée traditionnelle comme vermifuge, antidiarrhéique, analgésique, émétique. Elle dispose également d'une propriété technologique très connue des Peulh, celle de faire cailler le lait (Kees, 1996). D'après Baba-Moussa et al (2007), le latex du *Calotropis procera* présente une activité coagulante plus importante que les autres fractions de la plante. Cette activité protéolytique est influencée par les facteurs du milieu,

principalement la température et le pH. Les conditions optimales pour la coagulation sont une température située entre 65 et 70 °C et un pH compris entre 7 et 8 (Baba-Moussa et al., 2007).



Figure 9 : *Calotropis procera*, ses fleurs et ses fruits (Rayanatou, 2017)

Le processus de la coagulation. La coagulation est l'étape la plus fondamentale du processus de fabrication du fromage et consiste à transformer le lait liquide en un gel semi-solide. La synérèse qui s'ensuit, c'est-à-dire la rétraction et la perte du lactosérum de ce gel, aboutit à la formation du coagulum, appelé également caillé. La coagulation implique la précipitation de la caséine et est normalement réalisée par l'ajout d'enzymes, l'acidification par des microorganismes ou l'ajout d'acides, et traitement thermique, ou par une combinaison de ces trois méthodes (Henning et al., 2006 ; Legg et al., 2017, Rayanatou, 2017). La coagulation enzymatique fait intervenir des protéases dont les calotropaines extraites du *Calotropis procera*. L'enzyme coagulante la plus étudiée est la chymosine (Rayanatou, 2017). Le processus biochimique à l'origine de la coagulation du lait est identique pour la chymosine et les autres enzymes coagulantes (Ben Amira et al., 2017 ; Mazorra-Manzano et al., 2018). Ce processus se déroule en deux phases. La première phase est entièrement protéolytique, au cours de laquelle l'enzyme hydrolyse la partie C-terminale de la κ -caséine, au niveau de la liaison Phe105-Met106. La para- κ -caséine, apparentée aux caséines α et β , reste intégrée à la micelle hydrophobe. Le peptide

hydrophile libéré de la micelle vers le lactosérum est appelé macro-peptide caséino (CMP) (Ben Amira et al., 2017). L'hydrolyse de 85 à 90 % de la κ -caséine (COOH κ -caséine) provoque la déstabilisation des micelles, ce qui entraîne l'initiation de la deuxième phase de la coagulation, qui correspond à l'agrégation des micelles de para-caséine dans un réseau de gel tridimensionnel. Après l'élimination de la barrière stérique et la réduction de la répulsion électrostatique (diminution de 50 % du potentiel zêta), les micelles déstabilisées peuvent être regroupées progressivement par l'établissement de liaisons hydrophobes et électrostatiques (Lucey, 2002 ; Ben Amira et al., 2017). Ces étapes sont complétées par la réticulation du gel, phase au cours de laquelle le gel se restructure et s'organise. De nouvelles liaisons électrostatiques et hydrophobes s'établissent entre les micelles de caséine modifiées. Cette phase correspond au durcissement du gel et à la synérèse (Rayanatou, 2017).

L'activité enzymatique. L'Activité de Coagulation du Lait ou le Milk Clotting Activity (MCA) est le principal paramètre utilisé pour mesurer les performances de coagulation d'une enzyme (Mazorra-Manzano et al., 2018). Ces performances sont fortement influencées par le type d'enzyme (protéase aspartique, à cystéine ou sérine), sa spécificité et les conditions optimales de son activité (température, pH, quantité d'enzyme, composition du lait, etc. (Rayanatou, 2017). Pour l'industrie fromagère, l'objectif est d'avoir des enzymes ayant des activités spécifiques maximales. Pour évaluer l'activité de coagulation du lait d'une nouvelle enzyme, celle-ci doit être capable de transformer le lait en caillé dans des délais appropriés (environ 40-60 min) et avoir une spécificité comparable à celle de la chymosine (Mazorra-Manzano et al., 2018). Par exemple, les enzymes extraites (des protéases à cystéine) des fruits de kiwi (*Actinida deliciosa*), du rhizome de gingembre (*Zingiber officinale*) et du fruit d'aguama (*Bromelia pinguin*) présentaient des MCA spécifiques appropriés. Les MCA de ces extraits dépendaient de la température et des activités maximales étaient obtenues à des températures supérieures à 40 °C. D'autres sources de protéases telles que les extraits de cardon (*Cardunculus cardunculus* et *Cardunculus scolymus*) ont présenté des valeurs de MCA élevées dans des conditions de température/pH standard (32-37 °C/pH 6,3–6,8), augmentant leur activité à des pH plus bas en raison de la présence d'enzymes protéolytiques acides (aspartiques) (Mazorra-Manzano et al., 2018). Contrairement aux préparations enzymatiques pures, les performances de coagulation de certains extraits enzymatiques bruts sont faibles en raison de leur composition complexe due à la présence de différentes protéases. L'hydrolyse des caséines autres que la κ -caséine affecte le rendement fromager et les propriétés fonctionnelles du caillé obtenu. Des réactions hydrolytiques non spécifiques peuvent entraîner une protéolyse excessive ; toutefois, ces caractéristiques peuvent être intéressantes pour certains types de fromages en raison du développement de saveurs fromagères et/ou de l'accélération de la maturation du fromage (Mazorra-Manzano et al., 2018).

Les principaux paramètres définissant les conditions optimales de l'activité enzymatique en relation avec la coagulation du lait sont le pH, la composition du lait (teneur en calcium, protéines et graisse), la

température, et la dose de l'enzyme. Selon Rayanitou (2017), l'activité de la chymosine est optimale entre 30 et 42°C à des pH acides, mais supérieurs à 5. À des pH inférieurs à 5, la chymosine est dépourvue d'activité. L'effet de l'abaissement du pH sur la coagulation est lié à son action sur le calcium micellaire. En effet, l'abaissement du pH conduit à la solubilisation du calcium micellaire, à la diminution de la charge de surface des micelles et à la dissociation des caséines les constituant. Les micelles ainsi modifiées réagissent plus facilement à l'action de la chymosine et à l'agrégation (Rayanitou, 2017). Contrairement à la chymosine, les calotropaines sont actives à des pH très variés. Aboudoulaye et Kaya (2020) avaient rapporté un pH optimal de 5,5 tandis qu'une plage de pH optimal de 7 à 8 avait été déterminé par Baba-Moussa et al (2007). Rayanitou (2017) rapporta un pH optimal de 6,7. Ces différents pH indiquent que les calotropaines, enzyme du *C. procera*, sont actives dans une large gamme de pH. En effet, les calotropaines comme les protéases à cystéine ont un grand potentiel dans les industries alimentaires, biotechnologiques et pharmaceutiques en raison de leur propriété d'être actives dans une large gamme de pH (Shah et al., 2014). Les différents pH optimaux ci-dessus mentionnés correspondent à des températures optimales de 95°C (Rayanitou, 2017) et 70°C (Baba-Moussa et al., 2007). Au fur et à mesure que la coagulation du lait progresse, les ions calcium sont essentiels au développement d'une matrice gélifiée (phase non enzymatique du processus de coagulation). C'est pourquoi l'ajout de chlorure de calcium (100-400 mg CaCl₂/kg de lait) au lait est une pratique courante dans la production du fromage. L'effet du calcium sur le comportement du gel est associé à la réduction des forces répulsives entre les micelles altérées par l'enzyme, favorisant les interactions hydrophobes (augmentant la vitesse de formation du caillé) (Shah et al., 2014 ; Mazorra-Manzano et al., 2018).

Aptitudes technologiques du lait à la production de fromage

Étant donné que le fromage est le produit de concentration des nutriments du lait (protéines, graisse, minéraux et vitamines), la concentration des nutriments du lait a une influence majeure sur les propriétés de coagulation et d'égouttage, ainsi que sur le rendement technologique de la production. Il est bien établi que des teneurs plus élevées du lait en protéines et matières grasses améliorent directement les propriétés de coagulation du lait, par exemple en réduisant le temps de coagulation, en augmentant la fermeté du caillé et en augmentant le rendement technologique de la production du fromage (Panthi et al., 2017). Par exemple, la coagulation par la présure ne se produit pas (expérience réalisée pendant une heure) avec l'ajout de la présure au lait contenant < 2 % de protéines (Guinee et al., 1997). Une amélioration significative des propriétés de coagulation du lait (temps de coagulation plus court et fermeté du caillé) se produit avec l'augmentation de la teneur en protéines dans la plage de 2 % à 4 %, mais reste presque constante au-delà (4 % à 7,5 %) (Guinee et al., 1997). Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en matière grasse dans l'intervalle 0,1%-10 % du poids frais avec un niveau constant de protéines de 3,3 % du poids frais entraîne une réduction du temps de coagulation et une augmentation

de la fermeté du caillé (Guinee et al., 1997). Le rapport protéines/grasses du lait est donc un facteur déterminant la qualité du fromage.

Les procédés de fabrication du fromage ne reposent pas uniquement sur la composition des macro-composants, tels que les matières grasses, les protéines, les cendres et le lactose, mais également sur la microstructure de composants spécifiques tels que les caséines, les acides gras, les albumines et les globulines (Khanal et al., 2019). Au Bénin, peu de données sont disponibles sur les aptitudes technologiques du lait à la fabrication du fromage et plus spécifiquement à la production du WG.

Les différentes opérations de la technologie fromagère

La quasi-totalité des fromages obtenus par coagulation acide ou par la combinaison du traitement thermique et de la coagulation acide et un peu de ceux obtenus par coagulation enzymatique sont consommés frais, c'est-à-dire que la saveur, la texture et l'aspect du fromage sont dans leur forme finale à la fin de la production du caillé et que le caillé n'est pas soumis à une période de maturation ou d'affinage (Fox et McSweeney, 2017). La technologie des fromages obtenus par coagulation enzymatique peut être subdivisée en deux étapes bien définies : la production et l'affinage. L'ensemble des opérations constitutives de ces étapes est représenté sur la Figure 10.

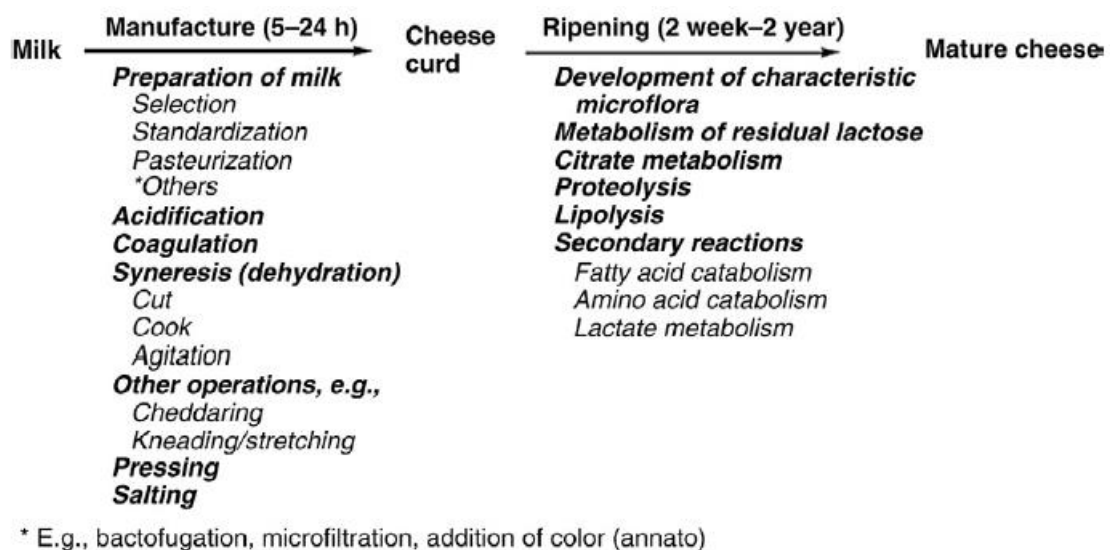


Figure 10 : Schéma récapitulatif de la technologie de fromage obtenu par la coagulation enzymatique (Fox et McSweeney, 2017)

Préparation du lait à la coagulation. La production des fromages débute par la sélection d'un lait de bonne qualité microbiologique et chimique. Au plan microbiologique, le lait possède une flore microbienne hétérogène, incluant les bactéries acidifiantes utiles à l'acidification du lait pour la production de certains types de fromages, les microorganismes non acidifiants qui participent à la saveur du fromage lors de l'affinage, les microorganismes pathogènes qui sont majoritairement détruits

par la pasteurisation du lait et les microorganismes d'altération (Fox et McSweeney, 2017). Les microorganismes d'altération sont majoritairement éliminés par la bactofugation ou la microfiltration et leur croissance peut être ralentie par l'utilisation du NaNO₃ ou de la lyzosome. Au plan chimique, le lait de fromagerie doit être dépourvu de résidus d'antibiotiques, car les résidus d'antibiotiques inhibent partiellement ou totalement les cultures starters. La composition du lait est variable et cette variabilité influence la qualité des fromages (Schwendel et al., 2015 ; Pereira, 2014). Pour des fromages de composition et de qualité reproductibles, des opérations telles que la standardisation des teneurs en graisse et protéines et l'ajout de calcium sont pratiquées. De nouvelles approches incluent la filtration sur membrane afin d'ajuster la composition du lait (Panthi et al., 2017). L'ensemble de ces opérations (pasteurisation, bactofugation, microfiltration, standardisation) permettent d'avoir du lait de composition reproductible, une condition importante pour un fromage de qualité.

L'acidification. Dans la technologie fromagère, l'acidification est souvent associée à l'utilisation des enzymes lors de la coagulation du lait (Jacob et al., 2011). L'acidification se fait normalement par la production in situ d'acide lactique, bien qu'un acide préformé ou un acidogène (généralement l'acide gluconique- δ -lactone) soit désormais utilisé pour acidifier directement le lait pour certaines variétés de fromage, par exemple la Mozzarella, le Feta et le Cottage (Fox et McSweeney, 2017). Dans la fabrication industrielle du fromage, il est courant d'ajouter une culture (starter) de bactéries productrices d'acide lactique sélectionnées au lait cru ou pasteurisé afin d'obtenir un taux de production d'acide uniforme et prévisible. Pour les variétés de fromage cuites à moins de 40°C, un ferment composé de *Lactobacillus lactis* est normalement utilisé, tandis que des cultures de *Streptococcus thermophilus* et d'un *Lactobacillus* spp. ou une culture de *Lactobacillus* seule est utilisée pour les variétés qui sont "cuites" à une température plus élevée, par exemple les variétés suisses et italiennes dures.

Les opérations de postcoagulation. Les principales opérations de postcoagulation sont la synérèse ou égouttage, le pressage et le salage. Les caillés obtenus lors de la coagulation enzymatique sont généralement stables au repos. Mais s'ils sont coupés ou cassés, la synérèse est rapide. La vitesse et l'ampleur de la synérèse sont influencées, entre autres, par la finesse avec laquelle le coagulum est coupé (les petits morceaux favorisent la synérèse), la composition du lait, en particulier les concentrations de Ca²⁺ et de caséine, le pH, la température de cuisson et le temps. La composition du fromage fini est dans une très large mesure déterminée par l'ampleur de la synérèse et, comme celle-ci est sous le contrôle du fromager, la différenciation des différentes variétés de fromage commence réellement à ce stade, bien que la composition du lait de fromagerie, la quantité et le type de starter ainsi que la quantité et le type d'enzyme de coagulation utilisés soient également importants à cet égard (Fox et McSweeney, 2017).

Après la synérèse, certains types de fromage sont cuits, exemple du Camembert, de l'Emmental et du Parmigiano-Reggiano. Après la cuisson, le caillé et le lactosérum sont séparés selon différentes techniques spécifiques à chaque variété. Pour la plupart des variétés de fromages, le caillé est transféré

dans des moules où l'égouttage et l'acidification se poursuivent. La dernière opération de postcoagulation est le salage réalisé majoritairement avec le NaCl. Le NaCl influence la maturation des fromages principalement par son effet sur l'activité de l'eau, mais il a probablement aussi des effets plus spécifiques. Les principaux effets du sel sont les suivants : le contrôle de la croissance et de l'activité microbienne ; le contrôle des diverses activités enzymatiques dans le fromage, la synérèse du caillé et donc la réduction de l'humidité du fromage, les modifications physiques des protéines du fromage qui influencent la texture du fromage, la solubilité des protéines et probablement leur conformation (Guinee et Fox, 2017).

La maturation. Certains types de fromages, à l'instar du WG, sont consommés frais (Dossou et al., 2006). Cependant, la plupart des variétés de fromage subissent une période d'affinage (maturation) qui varie de 2 semaines (par exemple, pour la Mozzarella) à 2 ans (par exemple, pour le Parmigiano-Reggiano ou le Cheddar extra-mature), la durée de l'affinage étant généralement inversement liée à la teneur en eau du fromage. Bien que le caillé des différentes variétés de fromage soit reconnaissable à la fin de la production, les caractéristiques uniques des différents fromages se développent au cours de l'affinage. Durant cette période, un ensemble extrêmement complexe de changements biochimiques se produit grâce à l'action catalytique des agents suivants : le coagulant, les enzymes lactières endogènes (en particulier la plasmine et la lipoprotéine lipase, qui sont particulièrement importantes dans les fromages fabriqués à partir de lait cru), les bactéries starter et leurs enzymes et le microbiote secondaire et ses enzymes (Fox et McSweeney, 2017). Les principaux changements biochimiques qui se produisent pendant la maturation impliquent le métabolisme du lactose résiduel et, dans certaines variétés, du lactate et du citrate, la lipolyse et la protéolyse. Ces changements primaires sont suivis et recouverts par une multitude de changements cataboliques secondaires, y compris les diverses réactions impliquant le catabolisme des acides aminés (transamination, désamination, décarboxylation etc.), le catabolisme des acides gras et les réactions connexes (β -oxydation des acides gras, estérification, formation de thioesters) et le catabolisme de l'acide lactique en CO₂ et H₂O ou en acides propionique, acétique ou butyrique et en CO₂ ou H₂. Les caractéristiques finales du fromage sont dues, non pas à un seul composé ou même à un groupe de composés, mais à la concentration et à l'équilibre de nombreux composés (Fox et McSweeney, 2017).

1.1.2.2. Procédés traditionnels et améliorés de production et de conservation du Wagashi

Gassirè

Procédés traditionnels de production du Wagashi Gassirè

Les principales matières premières nécessaires à la fabrication du WG sont le lait de vache et l'extrait de *Calotropis procera* utilisé comme agent coagulant. La transformation du lait en WG s'effectue en cinq étapes : la filtration, le préchauffage à 60 °C environ pendant 5 minutes, l'ajout du coagulant, le

chauffage à 70 °C environ (pendant 5 à 10 min) jusqu'à la formation du coagulum et du lactosérum puis à 100 °C pendant trois à cinq minutes jusqu'à ce que le lactosérum devienne jaunâtre et transparent, le moulage et l'égouttage dans des passoires (Dossou et al., 2006). Le WG obtenu est de couleur blanche. Le diagramme de fabrication du WG est présenté à la Figure 11.

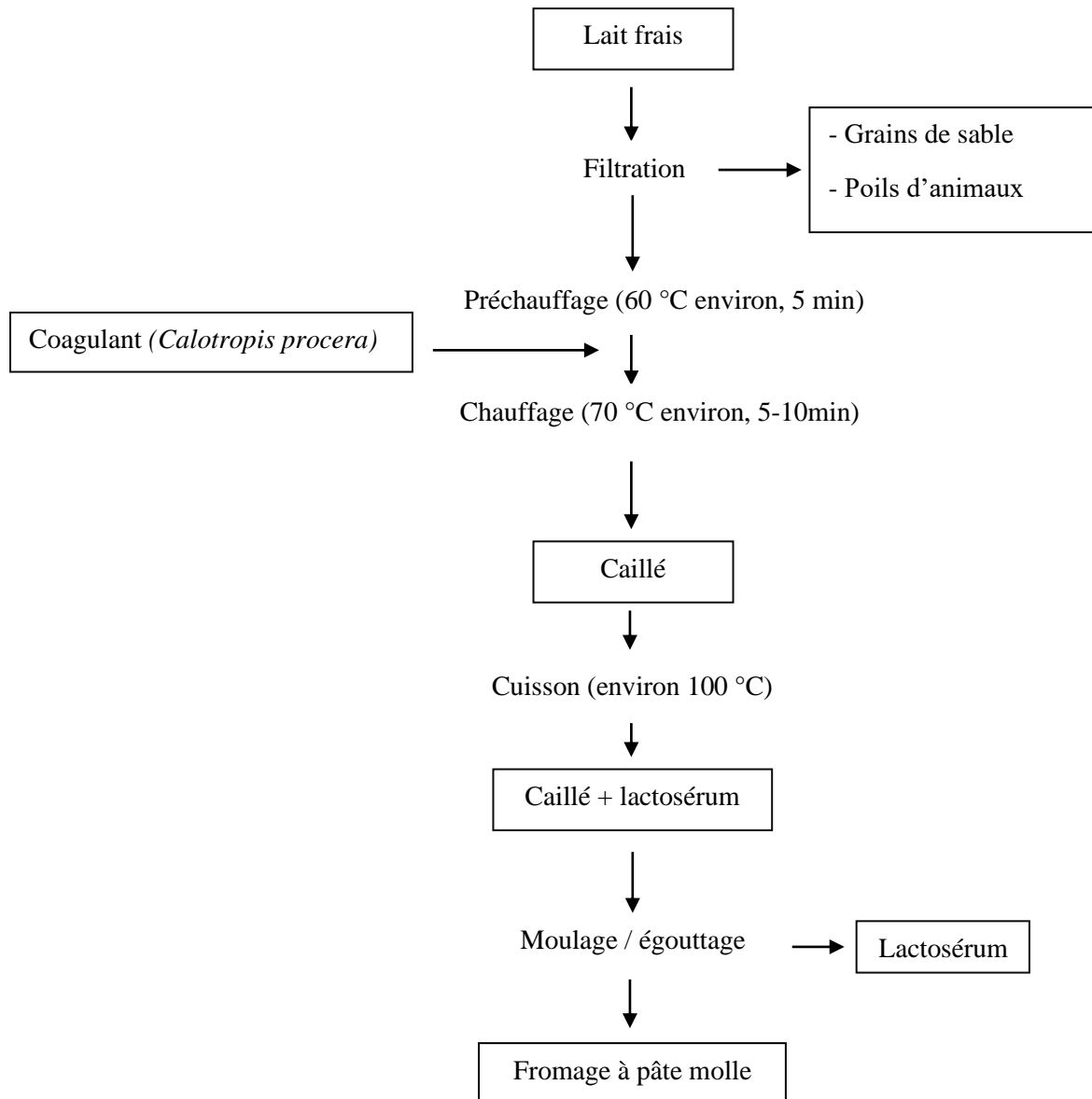


Figure 11 : Diagramme de fabrication du *Wagashi Gassirè* (Dossou et al., 2006)

Les différentes variantes de ce procédé sont liées au mode de coagulation du lait chauffé. La source principale du coagulant est la tige/feuille de *Calotropis procera*. La tige/feuille est pilée dans un mortier et triturée avec du lait. Le mélange obtenu est homogénéisé et filtré. Le filtrat constitue le coagulant. Certaines productrices utilisent les fleurs ou la sève (le latex) de *Calotropis procera*. Ces différents modes de coagulation mènent à des produits de qualité variable qui ne répondent pas toujours aux préférences des consommateurs.

Le WG blanc est souvent coloré avec les panicules du *Sorghum vulgare*, encore appelé sorgho rouge. Les panicules du sorgho rouge préalablement lavées sont bouillies avec le WG blanc en présence de potasse ou de bicarbonate et de sel. Le colorant extrait des panicules de sorgho rouge se fixe sur les fromages qui deviennent rouges. Égouttés et séchés à l'air libre, les fromages refroidissent, durcissent et perdent jusqu'à 30 % de leur poids (MAEP, 2014). Cette coloration peut aussi être réalisée à froid. La potasse et le bicarbonate permettent la fixation de la couleur rouge du colorant et la réduction de l'acidité alors que le sel rehausse le goût du WG (Dossou et al., 2006).

Procédés traditionnels de conservation du Wagashi Gassirè

Sept modes de conservation du WG ont été rapportés (Sessou et al., 2013a ; MAEP, 2014). Ce sont : le séchage au soleil, la conservation dans du lactosérum, la conservation dans de l'eau simple, la conservation dans de l'eau colorée (eau colorée par les panicules de *Sorghum vulgare*), le chauffage journalier, la friture et le fumage. Le séchage au soleil et la conservation dans du lactosérum sont les méthodes de conservation les plus utilisées par les productrices, la cuisson journalière étant plus pratiquée par les revendeuses et le fumage traditionnel, par les consommateurs. Selon les productrices, les commerçantes et les consommateurs de WG interviewés par Sessou et al (2013a), la durée de conservation du WG n'excède pas 12 jours, sauf pour le fumage qui permet une durée de conservation de 30 jours. La conservation dans du lactosérum est courante chez les femmes productrices Peulh de Dassa (Collines) et de Kpinnou (Mono) (MAEP, 2014).

Procédés améliorés de production et de conservation du Wagashi Gassirè

Plusieurs essais ont été réalisés au Bénin afin d'améliorer la production et la conservation du WG. Des études ont montré que les extraits volatils des feuilles de la citronnelle des Indes (*Cymbopogon citratus*), du piment couronné (*Pimenta racemosa*), du basilic sauvage (*Ocimum gratissimum*) et surtout du giroflier (*Syzygium aromaticum*) possèdent des propriétés antifongiques sur des isolats fongiques du WG et peuvent être utilisés pour lutter efficacement contre la contamination pré- et post-production du WG par les moisissures (Keke et al., 2009 ; Sessou et al., 2016). Ces extraits possèderaient des propriétés inhibitrices sur la production de mycotoxines par les souches toxigènes. Pour Dossou et al. (2016a), l'utilisation combinée de la déshydratation thermique (60 °C au four pendant 4 h) et du conditionnement sous vide stabilise le WG pendant environ 60 jours, aussi bien à la température de réfrigération (4-5 °C) qu'à température ambiante. D'autres essais de conservation du WG salé (7 % de sel) à basse température (-2 à 6 °C) ont montré un effet négatif sur la texture bien que les qualités microbiologiques du produit soient acceptables (Mazou et al., 2012). Tchobo et al. (2014) ont séché différents types de WG dans un four à 45 et 60 °C pendant 48 h. Ils ont conclu que le séchage à 45 °C préserve mieux les caractéristiques physico-chimiques des WG en les maintenant proches des WG frais.

Baba-Moussa et al (2007) se sont intéressés à la coagulation du lait ; ils ont montré que le latex de *Calotropis procera* utilisé lors de la production du WG avait une activité coagulante plus importante que la tige ou les feuilles de *Calotropis procera*. Le *Calotropis procera* contient une enzyme coagulante : la calotropaine. L'intérêt technologique et économique de la calotropaine a été mis en évidence par des travaux de chercheurs béninois qui ont mis au point une poudre coagulante à base de *Calotropis procera* appelée CECALOP. Aïssou et al (2016) ont montré qu'il est possible de réaliser en 13 minutes la coagulation d'un litre de lait pour le transformer en fromage Peulh, à l'aide d'une dose optimale de 35 g/l de lait d'un broyat constitué de 90 % de tiges et 10 % de feuilles fraîches de *Calotropis procera* avec un rendement de 30 % alors que les rendements de production habituels sont de 16 à 25 % (Kora, 2005 ; Dossou et al., 2006). Ces rendements varient en fonction des parties de la plante *Calotropis procera* (Baba-Moussa et al., 2007) et des laits des races bovines utilisés (Kora, 2005 ; Dossou et al., 2006).

1.1.2.3. Impact des technologies sur la qualité des fromages

Dans le monde entier, il existe une grande diversité de fromages (1.400 selon certaines estimations) (McSweeney et al., 2017). Cette diversité est liée à la matière première utilisée (type de lait et ses caractéristiques, dont le pH et les teneurs en protéines, en matières grasses et en calcium), mais aussi aux conditions de coagulation du lait (type de coagulation, nature et dose du coagulant, température de coagulation) et aux opérations de post-coagulation (cuisson, affinage, etc.) (Rayanatou, 2017). Il en résulte des fromages aux caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques diverses.

1.1.3. Risques chimiques associés à la consommation du lait et du Wagashi Gassirè

1.1.3.1. Principaux contaminants chimiques du lait et des fromages

Les contaminants chimiques sont des substances qui peuvent se retrouver dans les aliments lors de leur production, de leur transformation ou de leur distribution. Ils peuvent provenir d'une contamination environnementale (présence non intentionnelle), avoir été utilisés intentionnellement, ou peuvent se former pendant la transformation (contaminants de procédé) (EFSA, 2024). Les contaminants des denrées alimentaires les plus importants comprennent les toxines naturelles (les alcaloïdes ou les mycotoxines), les contaminants environnementaux (les biphényles polychlorés (BPC), les dioxines, les pesticides organochlorés persistants, les retardateurs de flamme bromés, les substances poly et perfluoro-alkylées, les métaux tels que l'arsenic, le cadmium, le plomb et le mercure), les contaminants néo-formés lors de la transformation (l'acrylamide et le furane) ou de la conservation des denrées alimentaires (amines biogènes) (EFSA, 2024). Pour le lait et les produits laitiers, les contaminants chimiques les plus importants sont les aflatoxines, les dioxines et PCBs, les amines biogènes et le plomb (EC, 2023 ; FAO/WHO, 2019 ; MAEP, 2007 ; EFSA, 2011, 2018, 2020). Outre ces contaminants chimiques, d'autres dangers chimiques sont à considérer. Il s'agit des résidus de médicaments

vétérinaires et de pesticides. La présence de ces dangers chimiques dans les aliments peut constituer un risque pour la santé humaine.

Les aflatoxines

Les aflatoxines (AFs) sont des métabolites toxiques produits par *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius* (Zinedine et al., 2021). Au sein de ce groupe, les aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1 et M2 sont les principaux composés naturels. Les structures chimiques de ces composés sont représentées sur la Figure 12. Les aflatoxines sont insolubles dans les solvants non polaires, alors qu'elles sont solubles dans les solvants organiques polaires tels que le chloroforme et le méthanol. La solubilité dans l'eau est de 10 à 20 mg/L (FAO/WHO, 2018).

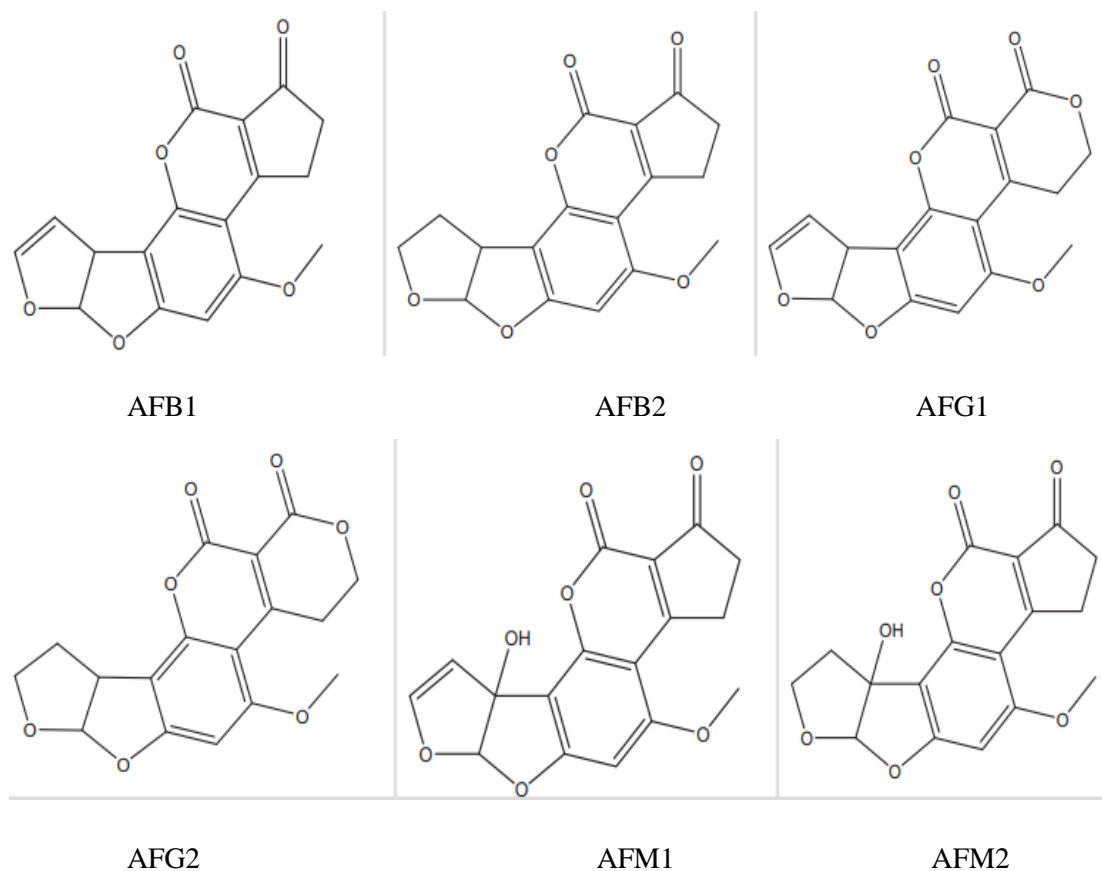


Figure 12 : Structure chimiques des aflatoxines (EFSA, 2020)

L'AFB1 est la plus fréquemment trouvée dans les aliments contaminés et les trois autres ne sont généralement pas trouvées en l'absence d'AFB1 (EFSA, 2020). Les AFM1 et AFM2 sont les métabolites hydroxylés des AFB1 et AFB2, respectivement. Elles ont été isolées pour la première fois dans le lait d'animaux en lactation nourris avec des aliments contaminés par l'AFB1 et l'AFB2. Les AFM1 et AFM2 résultent de la métabolisation des AFB1 et AFB2 sous l'action des enzymes associées au cytochrome P450 du foie et excrétées directement dans le lait des animaux d'élevage, ce qui entraîne une

contamination indirecte des produits laitiers. Ainsi, le lait et les produits laitiers comme le fromage sont contaminés par les AFM1 et AFM2 lorsque les animaux (vaches laitières) sont nourris avec des aliments contaminés par les AFB1 et AFB2 (Zinedine et al., 2021 ; Dobson, 2017 ; EFSA, 2020).

Les aflatoxines B1 et M1 ont des propriétés hépatocarcinogènes (EFSA, 2020). Parmi les premiers symptômes dus à une aflatoxicose, on trouve l'anorexie, un malaise et de la fièvre. En outre, une aflatoxicose grave peut entraîner une hépatite aiguë accompagnée de vomissements, de douleurs abdominales et est potentiellement létale (Udomkun et al., 2017). L'aflatoxine B1 est classée dans le groupe 1 (cancérogène avéré pour l'homme) par le centre international de recherche sur le cancer tandis que l'AFM1 est classée dans le groupe 2B (cancérogène possible) (IARC, 2002). Pour les propriétés hépatocarcinogènes, l'AFM1 est moins toxique que l'AFB1 d'un facteur d'environ 10 (EFSA, 2020). Par ailleurs, le risque de lésions hépatiques dues à l'aflatoxicose est plus élevé pour les personnes infectées par le virus de l'hépatite B (VHB) ou le virus de l'hépatite C (VHC) (IARC, 2002). Selon le groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire de l'Agence Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), la propriété hépatocarcinogène des aflatoxines reste l'effet central de l'évaluation des risques. Ce comité scientifique a sélectionné une BMDL10 (Benchmark dose) de 0,4 µg/kg/pc/jour pour les lésions hépatiques dues à l'aflatoxicose chez les rats mâles après une exposition à l'AFB1. Etant donné que l'AFM1 est considérée comme 10 fois moins toxique que l'AFB1, une BMDL10 de 4 µg/kg/pc/jour est à utiliser dans une approche de marge d'exposition (MOE) pour l'évaluation du risque lié à l'ingestion de l'AFM1 (EFSA, 2020). Dans cette approche, la MOE qui se calcule comme le rapport entre le niveau d'exposition à l'AFM1 et la BMDL10 (tous deux exprimés en µg/kg/pc/jour) doit être supérieur à 10.000 pour considérer le risque de cancer comme faiblement préoccupant. Si la MOE est inférieure à 10.000, le risque de cancer est préoccupant pour le consommateur.

L'Afrique de l'Ouest est caractérisée par un climat tropical (températures et humidité élevées) qui offre des conditions optimales pour la croissance des *Aspergillus* producteurs de mycotoxines. Les études de prévalence des AFs dans les produits alimentaires ont gagné en importance dans la littérature scientifique de la région de l'Afrique de l'Ouest (Zinedine et al., 2021). Cependant, peu de données ont été publiées sur la prévalence de l'AFM1 dans le lait et les produits laitiers de cette région, à l'exception du Nigéria comme le confirme les revues réalisées par Akinyemi et al (2021), Zinedine et al (2021) et Udomkun et al (2017). Dans une récente étude réalisée au Ghana, des marges d'exposition comprises entre 197 et 6666 ont été obtenues dans l'évaluation des risques liés à l'ingestion de l'AFM1 par le lait frais de vache pour les nourrissons, les jeunes enfants, les enfants, les adolescents et les adultes (Kortei et al., 2022). En raison de ces MOE inférieures à 10.000, les auteurs de cette étude ont conclu que la consommation de lait cru pouvait avoir des effets néfastes sur la santé de toutes les catégories d'âge étudiées. Au Bénin, peu de données sont disponibles sur la prévalence des AFs dans le lait (Dossou et

al., 2016b) et le WG (Aïssi et al., 2009 ; Sessou et al., 2013b) et aucune évaluation de risque lié à l'ingestion des AFs par la consommation du lait et des produits laitiers n'est disponible.

Les amines biogènes

Les amines biogènes (ABs) sont des composés azotés de faible masse moléculaire issus de la décarboxylation enzymatique d'acides aminés libres présents dans l'aliment suite à une dégradation des protéines (EFSA, 2011). Les principales amines biogènes présentes dans les aliments sont l'histamine, la tyramine, la putrescine, la cadavérine et la phényléthylamine qui sont des produits de la décarboxylation de l'histidine, de la tyrosine, de l'ornithine, de la lysine et de la phénylalanine, respectivement (Karovičová et Kohajdová, 2005 ; EFSA, 2011 ; Loizzo et al., 2013). La putrescine peut également être formée par désamination de l'agmatine. Les ABs peuvent être classés en amines aromatiques (histamine, tyramine, sérotonine et tryptamine), en diamines aliphatiques (putrescine et cadavérine) et en polyamines aliphatiques (agmatine, spermidine et spermine). Sur la base de leur structure chimique (Figure 13), les ABs sont classés comme aliphatiques (putrescine et cadavérine), hétérocycliques (histamine et tryptamine), aromatiques (tyramine et phényléthylamine), tandis que, selon leur nombre de groupes amines, ils peuvent être divisés en monoamines (tyramine et phényléthylamine) et en diamines (histamine, putrescine et cadavérine) (Loizzo et al., 2013).

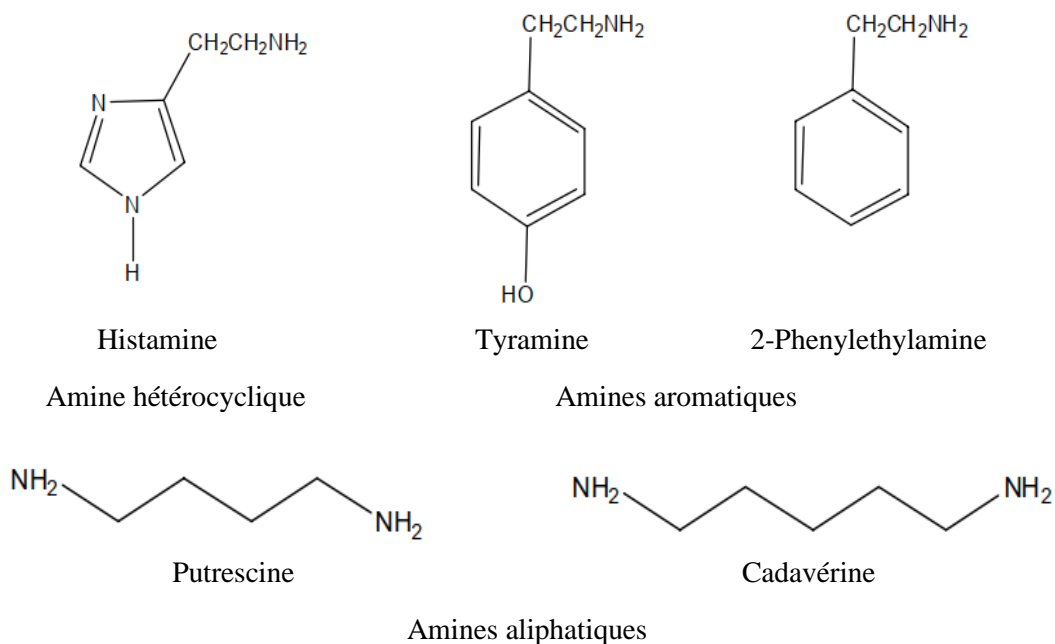


Figure 13 : Structure chimique des principales amines biogènes (EFSA, 2011)

La synthèse des ABs est possible grâce à la conjugaison de plusieurs conditions : la disponibilité de substrats aminés, la présence de microorganismes dont la voie catabolique appropriée est activée, et les conditions environnementales favorables à l'activité de décarboxylation (Linares et al., 2012). Ces conditions dépendent de plusieurs facteurs tels que le traitement du lait, l'utilisation de cultures starter,

la concentration en NaCl, la durée et la température de maturation et de conservation, le pH, la température ou les processus technologiques de post-maturation (Linares et al., 2012 ; Visciano et al., 2012). Bien qu'elles soient produites naturellement par les micro-organismes, la consommation d'aliments contenant de grandes quantités de ces amines peut avoir des conséquences néfastes. Ces problèmes sont plus graves chez les consommateurs dont la détoxification est moins efficace en raison de leur constitution génétique ou de leur traitement pharmacologique.

Les intoxications alimentaires dues aux ABs sont majoritairement liées à la présence de l'histamine. Celle-ci peut provoquer des maux de tête, des troubles respiratoires, des palpitations du cœur, de l'hypotension ou de l'hypertension et plusieurs troubles pseudo-allergiques (Stratton et al., 1991 ; Karovičová et Kohajdová, 2005 ; Spizzirri et al., 2013). On estime qu'il n'y a aucun effet néfaste sur la santé après une exposition (par personne et par repas) à 50 mg d'histamine pour les personnes en bonne santé, alors qu'un effet néfaste peut se manifester au-dessous des limites détectables chez les personnes présentant une intolérance à l'histamine. Si la consommation de 600 mg de tyramine ne produit pas d'effet néfaste chez les personnes en bonne santé, un effet apparaît à partir de 50 mg chez celles qui prennent des médicaments inhibiteurs de la monoamino-oxydase de troisième génération et de 6 mg pour celles qui prennent des inhibiteurs de la monoamino-oxydase classiques (Karovičová et Kohajdová, 2005 ; EFSA, 2011).

Sur la base des teneurs moyennes en histamine mesurées dans l'union européenne, les groupes d'aliments les plus sujettes à une contamination d'histamine sont les anchois séchés, les sauces de poisson, les légumes fermentés, les fromages, les autres poissons et produits de la pêche et les saucisses fermentés (EFSA, 2011). Afin de protéger la santé des consommateurs, une limite maximale de 200 mg/kg poids frais d'histamine a été définie par la Commission Européenne pour les produits de la pêche fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine (poissons des familles *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae*, *Scomberesocidae*) (EC, 2005).

Les dioxines et PCBs

Les dioxines sont des polluants organiques persistants. Elles regroupent les polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF). Parmi les 210 molécules connues dans ce groupe (75 PCDDs et 135 PCDFs), 17 sont toxiques et la plus toxique est la TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-para-dioxine). Quant aux polychlorobiphényles (PCB), ils sont un groupe de composés chimiques constitué de 209 molécules différentes (ou congénères) (Figure 14). Sur base de leurs caractéristiques structurelles et de leurs effets toxicologiques, les PCBs sont subdivisés en deux groupes. Le premier groupe est composé de 12 congénères qui présentent des propriétés toxiques similaires à celles des dioxines. D'où l'appellation « PCBs de type dioxine » (dioxine-like PCBs en

anglais), en abrégé PCB-DL. Les autres PCBs présentent un profil toxicologique différent. Ce groupe est appelé « PCBs autres que de type dioxine » (PCB-NDL) (AFSCA, 2013 ; EFSA, 2018).

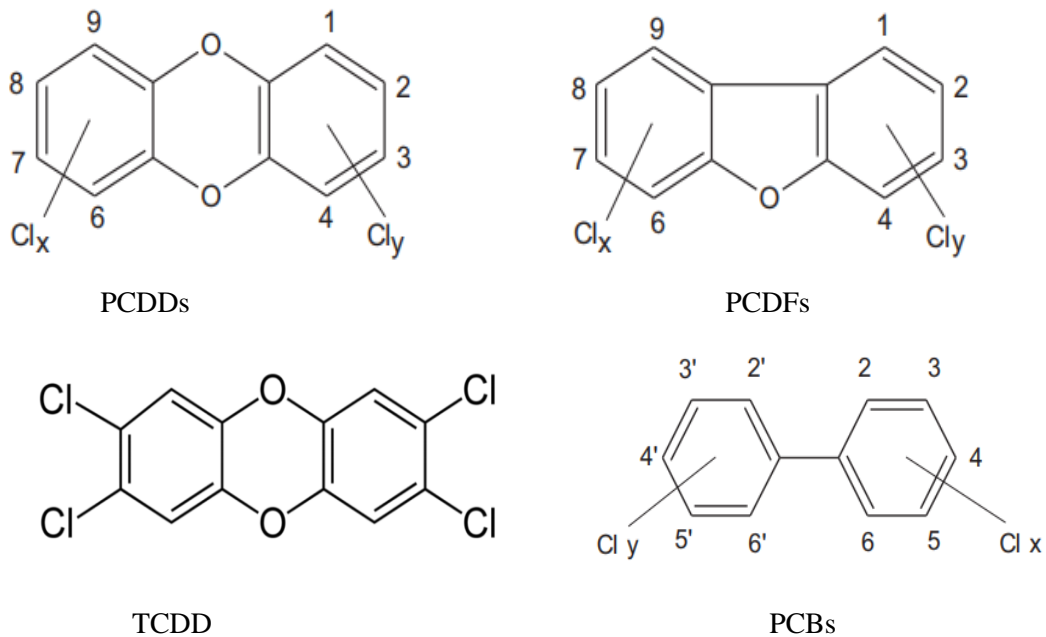


Figure 14 : Structure chimique des dioxines et PCBs (EFSA, 2018)

PCDD : polychlorodibenzo-*p*-dioxines, *PCDF* : polychlorodibenzofuranes, *TCDD* :

2,3,7,8- tétrachlorodibenzo-*para*-dioxine, *PCBs* : polychlorobiphényles

Les dioxines constituent des sous-produits indésirables et bien souvent inévitables de toute une série de processus thermiques et industriels. Un grand nombre d'activités humaines ainsi que certains phénomènes naturels génèrent directement ou indirectement des dioxines : incinération de déchets, métallurgie, chimie ayant recours à des composés organochlorés, trafic routier. Parmi les sources naturelles, on peut citer les volcans, les feux de forêt et les orages. Contrairement aux dioxines, les PCBs ont été utilisés pendant des décennies dans différentes applications industrielles, entre autres comme liquide de refroidissement dans les transformateurs électriques, ou encore dans des pigments, peintures (AFSCA, 2013).

Chez les humains, une exposition de courte durée à des doses élevées de dioxines et de PCBs (polychlorobiphényles) peut occasionner des lésions cutanées et des troubles de la fonction hépatique. Sur le long terme, les dioxines et PCBs peuvent provoquer des troubles du système endocrinien (en particulier des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes, entre autres), nerveux, reproducteur et immunitaire (Rusin et al., 2019 ; Mamontova et al., 2007). Sur base d'études animales et des preuves épidémiologiques, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzodioxine (TCDD) a été classée comme cancérigène pour l'homme (groupe 1). D'autres dioxines ont été considérées comme ne pouvant pas être classées comme

cancérogènes pour les humains (groupe 3) (AFSCA, 2013). D'autres effets négatifs sur la santé de l'exposition chronique aux dioxines et PCBS sont des troubles du système immunitaire et du système nerveux central, le diabète, des lésions hépatiques et un taux élevé de cholestérol dans le sang. Chez l'animal, des concentrations toxiques de dioxines ont la capacité d'interférer avec divers systèmes hormonaux, d'induire une immunodépression, d'intervenir dans le développement de sarcomes, de lymphomes et de carcinomes et d'induire des malformations congénitales (Roeder et al., 1998). Sur base d'effets sur la qualité du sperme, une DHT (Dose Hebdomadaire Tolérable) de 2 pg TEQ/kg.pc/semaine a été établie comme valeur toxicologique de référence au-delà de laquelle il est considéré que des effets néfastes se manifesteront chez le consommateur exposé (EFSA, 2018).

Les éléments traces métalliques

Les éléments traces métalliques (ETM) les plus préoccupants dans la chaîne alimentaire sont le plomb, l'arsenic, le mercure, le méthylmercure et le cadmium (AFSCA, 2013). Ce sont des contaminants environnementaux au même titre que les dioxines.

Le plomb est une substance aux propriétés cancérogènes et génotoxiques (EFSA, 2010). Au Bénin, les sources d'exposition au plomb sont variées ; les principaux facteurs de risque d'exposition humaine sont les sources d'eau (eau courante), la chasse (animaux tués avec des balles contaminées par le plomb), la nourriture (poisson, viande, riz), la profession et le sol (Obeng-Gyasi 2022). Des teneurs en plomb de 0,002 mg/kg ont été rapportées par Jitaru et al (2019) dans le lait et les produits laitiers du Borgou et du Littoral. Il est bien connu que le plomb a des effets néfastes sur la santé humaine, notamment sur les systèmes nerveux, rénaux, cardiovasculaires, reproductifs, immunitaires et hématologiques. Chez les enfants, le plomb est associé à un mauvais développement neurologique (Bodeau-Livinec et al., 2016). Il est généralement accepté que les conséquences neurocomportementales néfastes associées à l'exposition du fœtus au plomb durant son développement ne sont pas réversibles et persistent durant toute la vie (AFSCA, 2009 ; Bellinger, 2004). Le plomb est un problème de santé publique au Bénin. À Sô-Ava (Abomey-Calavi, Bénin), 31,3 % des femmes enceintes avaient une teneur sanguine en plomb supérieure au seuil de 50 µg/L fixé par l'US Centers for Disease Control and Prevention (Guy et al., 2018). À Allada (Bénin), la prévalence à une teneur sanguine en plomb supérieure au seuil de 50 µg/L chez les enfants était de 54,8% à l'âge de 1 an et de 59,5% à l'âge de 6 ans montrant une augmentation de l'exposition au plomb au cours de la vie (Ahmadi et al., 2020). Une augmentation de la teneur sanguine en plomb de 12 µg/L chez l'enfant peut diminuer le score du quotient intellectuel d'un point (EFSA, 2010). Au-delà de 60 à 70 µg de plomb par 100 ml de sang, des signes cliniques peuvent apparaître : troubles digestifs, neurotoxicité, néphrotoxicité, troubles hématologiques et troubles de la reproduction (AFSCA, 2009). Le groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire de l'EFSA a identifié la neurotoxicité développementale chez les jeunes enfants et les effets cardiovasculaires et la néphrotoxicité chez les adultes comme étant les effets critiques pour l'évaluation

des risques liés à l'ingestion du plomb. Les BMDL ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{pc}/\text{jour}$) respectifs établis étaient : BMDL01 (0,50) ; BMDL01 (1,50) et BMDL10 (0,63) (EFSA, 2010).

Comme le plomb, l'arsenic est un contaminant environnemental aux propriétés cancérigènes et génotoxiques (EFSA, 2009). Les principaux effets indésirables associés à l'ingestion à long terme d'arsenic inorganique chez l'homme sont les lésions cutanées, le cancer, la neurotoxicité, les maladies cardiovasculaires, les anomalies du métabolisme du glucose et le diabète. Une BMDL01 comprise entre 0,3 et 8 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{pc}/\text{jour}$ a été identifiée pour les cancers du poumon, de la peau et de la vessie, ainsi que pour les lésions cutanées causés par l'ingestion chronique de l'arsenic inorganique (EFSA, 2009).

Les résidus de médicaments vétérinaires

La mauvaise utilisation des antibiotiques par les éleveurs et les vétérinaires ainsi que le non-respect des délais d'attente après le traitement des animaux sont les principales raisons qui conduisent à la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait et les autres denrées d'origine animale. Au Bénin, Mensah et al (2014a) ont rapporté la présence de résidus d'antibiotiques dans 100 % et 33 à 83 % des laits de vache collectés au sud du Bénin pour deux campagnes de collectes différentes. Au Nigeria, des résidus d'antibiotiques ont été détectés dans 40,8 % des laits frais (Olatoye et al., 2016). Au Niger, 9,9 % des laits de vache provenant de Niamey contiennent des résidus d'antibiotiques (Madougou et al., 2019). Au Ghana, 3,1 % des laits de vache provenant de la zone côtière contiennent des résidus d'antibiotiques (Addo et al., 2011). Au Bénin et dans les pays alentour, les tétracyclines, les pénicillines, les sulfamides et les macrolides sont les familles d'antibiotiques les plus utilisées (Mensah et al., 2014b ; Olatoye et al., 2016 ; Madougou et al., 2019 ; Addo et al., 2011). Outre les mauvaises pratiques d'élevage, la présence des résidus de médicaments vétérinaires montre la faiblesse de la législation. En effet, dans l'Union Européenne où la législation relative aux médicaments vétérinaires est plus stricte qu'en Afrique, on note des prévalences de résidus de médicaments vétérinaires très basses dans les aliments d'origine animale (Mensah et al., 2014c).

Les pesticides

L'utilisation des pesticides en agriculture est bien documentée au Bénin. Les matières actives des pesticides utilisés par les agriculteurs du nord du Bénin sont le glyphosate, l'atrazine, le flubendiamide, le spirotétramate, la cyfluthrine, la cyperméthrine, la betacyfluthrine l'acétamipride, la lambda-cyhalothrine, le chlorpyrifos-éthyle, l'émamectine benzoate, le profénofos, l'endosulfan, l'imidaclopride, la flubendiamide, la prometrine, le fluometuron, etc. (Agbohessi et al., 2011 ; Adechian et al., 2015 ; Dognon et al., 2018 ; Gouda et al., 2018). Les maraichers du sud du Bénin utilisent du lambda-cyhalothrine, du profenofos, du mancozèbe et du méthylthiophanate (Ahouangninou et al., 2011). L'endosulfan et le glyphosate se révèlent très fortement utilisés au nord du Bénin (Agbohessi et al., 2011 ; Dognon et al., 2018). Certaines de ces substances se retrouvent dans les aliments consommés

comme le confirment les travaux de Dossou et al (2016a) et d'Ingenbleek et al (2019). Ces auteurs rapportent que 75,5 % des résidus de pesticides retrouvés dans les aliments consommés au Bénin, Mali, Cameroun et au Nigéria sont constitués du chlorpyrifos (22,4 %), du cyperméthrine (18 %), du dichlorvos (13,6 %), du lambda-cyhalothrine (8,2 %), du perméthrine (7,5 %) et du profenofos (5,8 %).

Au Bénin, les niveaux de contamination du WG par les éléments trace métalliques, les amines biogènes, les résidus de pesticides et de médicaments vétérinaires ne sont pas connus. Certains de ces contaminants ont souvent été évalués pour le lait de vache (Mensah et al., 2014a ; Mensah et al., 2014b ; Dossou et al., 2016b ; Aïssi et al., 2016 ; Djibril et al., 2019). Les quelques études qui ont porté sur la détection de l'aflatoxine M1 dans les WG produits au Bénin n'ont pas mis en évidence la présence de celle-ci (Aïssi et al., 2009 ; Sessou et al., 2013b). Ces contaminants sont résistants aux traitements thermiques et ne sont généralement pas éliminés par les procédés de fabrication (Anfossi et al., 2012). Ils pourraient donc se retrouver dans le WG et constituer ainsi un problème de santé publique.

En raison des problèmes de santé qui découlent de la présence de ces dangers chimiques dans la chaîne alimentaire, des limites maximales (LM) sont établies par les autorités compétentes chargées du contrôle de la sécurité sanitaire des aliments (FAO/WHO, Commission Européenne etc.). Le Tableau 5 présente les LM de certains contaminants chimiques pour le lait et les dérivés laitiers.

Tableau 5 : Limites maximales autorisées de quelques contaminants chimiques dans le lait et ses dérivés

Contaminants chimiques	Limite réglementaire		
	FAO/WHO (FAO/WHO, 2019)	Commission européenne (EC, 2023)	Bénin (MAEP, 2007)
Aflatoxine M1 (µg/kg)	0,5	0,05	0,05
Dioxines et PCBs (pg WHO- TEQ/g de graisse)	-	4	6
Plomb (mg/kg)	0,02	0,02	0,02

1.1.3.2. Analyse de risque

L'analyse des risques est utilisée pour estimer les risques pour la santé humaine, pour identifier et mettre en œuvre des mesures appropriées pour contrôler les risques, et pour communiquer avec les parties prenantes sur les risques et les mesures appliquées (FAO/WHO, 2006). Une fois l'exposition connue et les risques caractérisés, les gestionnaires de risques peuvent utiliser efficacement leurs ressources pour mettre en œuvre des mesures d'atténuation adéquates. L'analyse des risques permet également de classer les risques identifiés en fonction de leur gravité et de leur fréquence et de fixer des priorités fondées sur des données probantes afin de mieux protéger la santé des consommateurs (Ingenbleek, 2019).

Selon les directives de la Commission du Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2016), l'analyse des risques représente un processus décisionnel structuré comportant trois composantes distinctes, mais étroitement liées : la gestion des risques, l'évaluation des risques et la communication sur les risques (Figure 15). Ces trois composantes sont des éléments essentiels et complémentaires. L'analyse des risques est plus efficace lorsque les trois composantes sont intégrées avec succès par les gestionnaires de risques qui dirigent le processus (FAO/WHO, 2006).

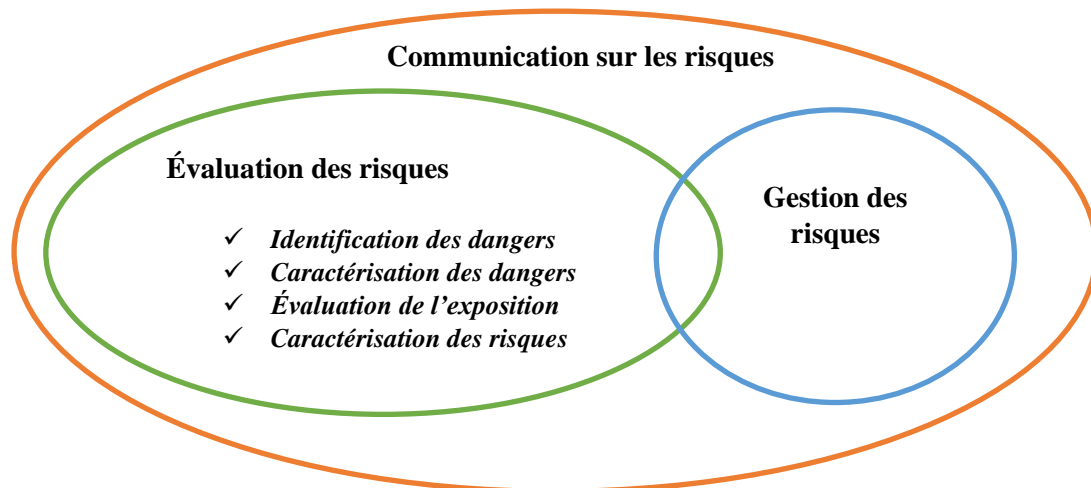


Figure 15 : Diagramme de l'analyse des risques (FAO/WHO, 2006)

L'évaluation de risque est un processus à base scientifique comprenant les étapes suivantes : i) identification des dangers ; ii) caractérisation des dangers ; iii) évaluation de l'exposition et iv) caractérisation des risques (FAO/WHO, 2006, 2016).

Identification des dangers. Elle consiste en l'identification des agents biologiques, chimiques et physiques qui peuvent générer des conséquences néfastes pour la santé et qui peuvent être présents dans une denrée alimentaire spécifique ou dans un groupe de denrées alimentaires. Pour les dangers chimiques, cette étape intègre des propriétés physico-chimiques, des données toxicologiques (*in vitro*, *in vivo*, animal, homme), des données toxicocinétiques (profils pharmaco-toxicocinétiques d'adsorption, de distribution, de métabolisation, d'élimination), des études épidémiologiques réalisées sur les dangers pour lesquels l'évaluation du risque est faite (Saegerman et Berkvens, 2006).

Caractérisation des dangers. Elle consiste en l'évaluation qualitative et/ou quantitative de la nature des effets néfastes pour la santé associée aux agents biologiques, chimiques ou physiques qui peuvent être présents dans un aliment. Pour les agents chimiques, la relation dose/réponse c'est-à-dire la relation entre le degré de l'exposition (la dose) et la gravité et/ou la fréquence des effets néfastes pour la santé qui sont associés (réaction) est évaluée. À cette étape, les données relatives au mode et au mécanisme d'action ainsi qu'un point de référence (par exemple la dose journalière tolérable) sont collectés (Saegerman et Berkvens, 2006).

Évaluation de l'exposition. L'évaluation de l'exposition est l'aspect du processus d'évaluation des risques qui estime ou mesure l'ampleur, la fréquence et la durée de l'exposition à un danger physique, chimique ou biologique. Il prend en considération les caractéristiques de la population exposée et décrit les sources, les voies d'exposition et les incertitudes associées à l'évaluation (FAO/WHO, 2016).

Bien qu'il soit essentiel de connaître la toxicité d'une substance, les gestionnaires de risques doivent également savoir dans quelle mesure le produit chimique est susceptible de nuire à une population. Il est donc nécessaire d'identifier et d'évaluer les différentes voies d'exposition (Ingenbleek, 2019). Certains groupes de population sont plus exposés que d'autres, en raison de l'exposition professionnelle par exemple. L'exposition alimentaire peut également varier d'un lieu à l'autre. Cela peut résulter de différents modèles de concentration de produits chimiques dans les aliments, ainsi que de différentes habitudes de consommation alimentaire.

L'évaluation de l'exposition alimentaire prend en compte les données sur la consommation alimentaire et les données sur les concentrations du contaminant dans les aliments (Saegerman et Berkvens, 2006). L'estimation la plus élémentaire de la consommation alimentaire repose sur les bilans alimentaires. Cette méthode consiste à évaluer la somme des produits cultivés localement et importés, moins les produits exportés. Cette approche suppose qu'une estimation du contenu de l'assiette peut être obtenue par calcul à partir des aliments disponibles à l'échelle de la population divisée par la taille de celle-ci. Les enquêtes sur la consommation des ménages sont beaucoup plus précises que les bilans alimentaires. Elles s'appuient sur les déclarations du chef de famille et prennent en compte plus de 5 000 ménages de différentes localités, ce qui permet d'identifier les spécificités locales des habitudes alimentaires. Selon le système de classification des aliments utilisé dans une enquête sur la consommation des ménages, plusieurs centaines de produits alimentaires peuvent être enregistrés pour chaque ménage, sur une période allant de 2 semaines à plus de 36 semaines. La collecte de données individuelles est par ailleurs la méthode la plus fiable d'estimation de la consommation alimentaire. Les données sont collectées sur la base de questionnaires de rappel de 24 heures. En augmentant le nombre de jours d'exercice, les résultats deviennent plus fiables (Ingenbleek, 2019).

Les plans officiels de contrôle et de surveillance peuvent générer des données sur la contamination des aliments lorsqu'ils existent et lorsque les rapports sont disponibles. Ces données peuvent également provenir des opérateurs, dans le cadre de leurs activités d'autocontrôle. En Afrique, ces données proviennent généralement des travaux des chercheurs universitaires.

Pour l'évaluation quantitative de l'exposition, les données sur la consommation alimentaire et la contamination des aliments sont généralement combinées en utilisant soit une approche déterministe, également appelée "estimation ponctuelle", soit une approche probabiliste. Ces deux approches décrites par Dorne et al. (2009) sont représentées sur la Figure 16.

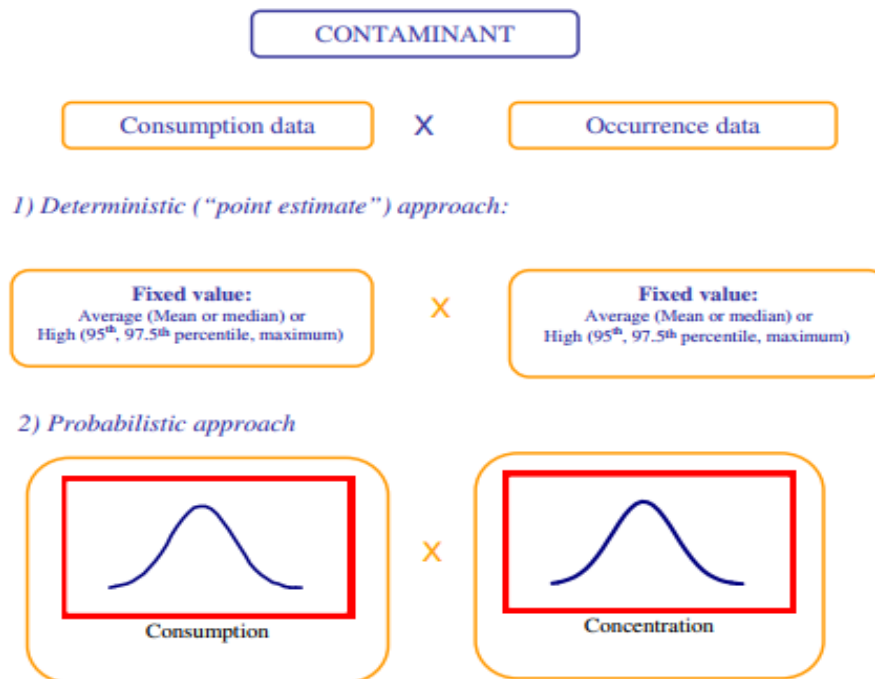


Figure 16 : Évaluation de l'exposition aux contaminants chimiques dans la population humaine (Dorne et al., 2009)

Caractérisation des risques. C'est l'estimation qualitative et/ou quantitative, compte tenu des incertitudes inhérentes à l'évaluation, de la probabilité de la fréquence et de la gravité des effets adverses connus ou potentiels sur la santé susceptibles de se produire dans une population donnée, sur la base de l'identification des dangers, de la caractérisation des dangers et de l'évaluation de l'exposition (EFSA, 2005 ; AFSCA, 2013 ; FAO/WHO, 2016). La caractérisation des risques consiste à comparer l'exposition alimentaire à un point de référence. Pour cela, les contaminants chimiques sont regroupés en deux classes : ceux qui ont des propriétés cancérigènes/génotoxiques et ceux qui n'en ont pas (Figure 17). Pour les contaminants chimiques ayant des propriétés cancérigènes et génotoxiques, l'approche de la marge d'exposition (MOE pour *Margin Of Exposure*) a récemment été appliquée à un certain nombre de contaminants (aflatoxines, plomb, arsenic, carbamate d'éthyle, acrylamide etc.) par le comité d'experts sur les additifs alimentaires (JECFA) de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et de l'Organisation mondiale de la santé (FAO/WHO) et par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) (EFSA, 2005). La MOE est le rapport entre une dose repère ou Benchmark Dose (BMD10 ou encore BMDL10) et le niveau d'exposition (tous deux exprimés en $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{pc}/\text{jour}$). La MOE donne une indication sur l'importance du risque ; plus grande est la MOE, plus faible est le risque lié à l'exposition au composé en question (AFSCA, 2013 ; EFSA, 2017). On estime qu'une MOE de 1 ou plus, basée sur une BMDL établie sur base d'études sur humains présenterait une préoccupation faible pour la santé publique (EFSA, 2005). Lorsque l'on utilise un

BMDL basé sur des études sur animaux, la MOE doit être égale ou supérieure à 10.000 pour qu'on considère que l'exposition est peu préoccupante pour la santé publique (EFSA 2005, 2017). Pour les dangers chimiques n'ayant pas des propriétés génotoxiques, l'exposition aux contaminants (dose journalière ingérée : DJI) est comparée à une Valeur Toxicologique de Référence (VTR). La VTR peut être la DHT (dose hebdomadaire tolérable) ou la DJA (Dose Journalière Acceptable). On considère qu'il y a un risque si la DJI est supérieure à la VTR (AFSCA, 2013).

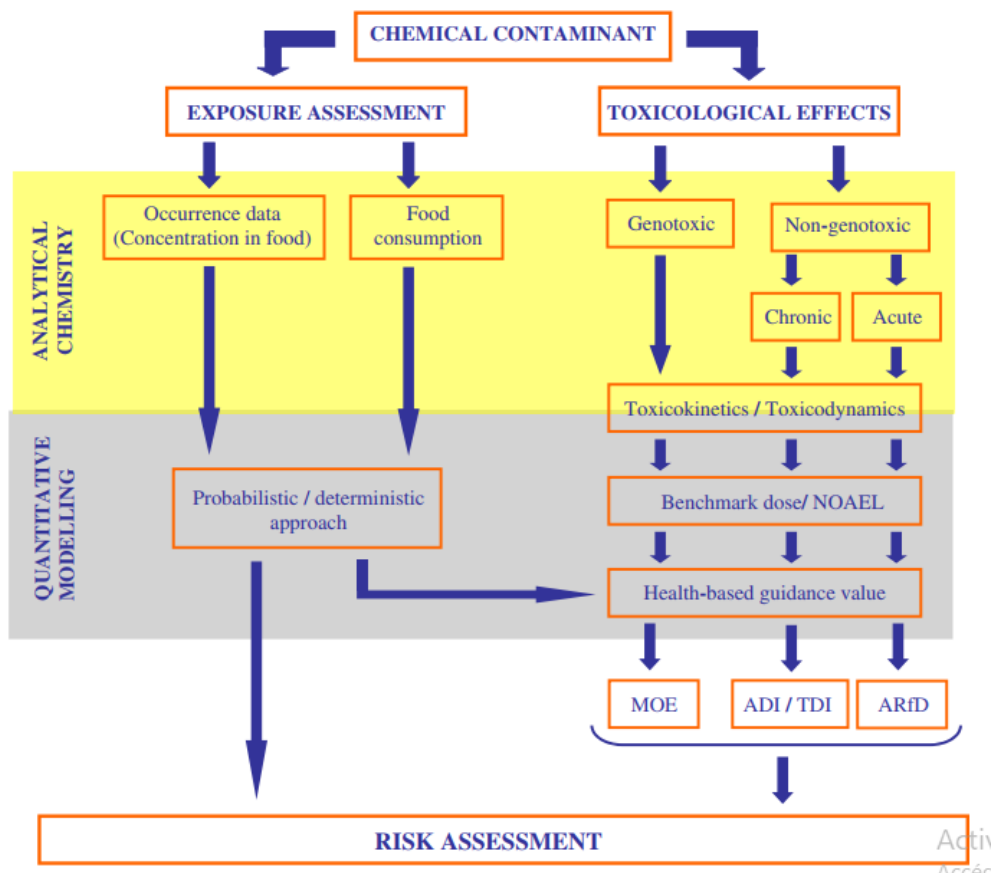


Figure 17 : Cadre multidisciplinaire combinant l'évaluation de l'exposition et les effets toxicologiques pour l'évaluation des risques des contaminants alimentaires génotoxiques et non génotoxiques (Dorne et al., 2009)

La gestion des risques est un processus distinct de l'évaluation des risques, consistant à mettre en balance les différentes politiques possibles en consultation avec toutes les parties intéressées, en tenant compte de l'évaluation des risques et d'autres facteurs ayant une importance pour la protection de la santé des consommateurs et la promotion de pratiques commerciales loyales et, au besoin, à choisir les mesures de prévention et de contrôle appropriées (FAO/WHO, 2016).

La communication sur les risques est un échange interactif, tout au long du processus d'analyse des risques, d'informations et d'opinions sur les risques, les facteurs liés aux risques et les perceptions des risques, entre les responsables de leur évaluation et de leur gestion, les consommateurs, l'industrie, les

milieux universitaires et les autres parties intéressées, et notamment l'explication des résultats de l'évaluation des risques et des fondements des décisions prises en matière de gestion des risques (FAO/WHO, 2016).

1.1.3.3. Consommation du lait et Wagashi Gassirè au Bénin

Comme expliqué dans la section précédente, l'estimation de la consommation alimentaire est réalisée grâce aux bilans alimentaires ou aux enquêtes de consommation des ménages ou par la collecte de données individuelles.

Au Bénin, la dernière enquête sur la consommation des ménages a été réalisée en 2011 et s'intitulait : « Enquête Modulaire Intégrée sur les Conditions de Vie des ménages, 2^{ème} édition ». Les données de cette enquête ont été utilisées dans l'étude : « Methodology design of the regional Sub-Saharan Africa total diet study in Benin, Cameroon, Mali and Nigeria » (Ingenbleek et al., 2017) pour estimer la moyenne de consommation et le 95^{ème} percentile (= « gros consommateurs ») à l'échelle nationale ainsi que les moyennes de consommation du lait et de ses dérivés dans les départements du Littoral au sud et du Borgou au nord du Bénin. Les départements du Littoral et du Borgou ont été choisis pour les régimes alimentaires très différents qu'on y observe. L'étude a utilisé l'Adult Male Equivalents (AME) pour uniformiser les données de consommation variables selon l'âge et le sexe dans la population. Dans cette étude, l'AME correspondait à la consommation d'un adulte de 60 kg de poids corporel. Les données de consommation du lait et de ses dérivés extraites de l'étude sont présentées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Consommation de lait et de ses dérivés au Bénin et dans les départements du Littoral et du Borgou (Ingenbleek et al., 2017)

Dérivés laitiers	Bénin (g/AME/jour)		Moyenne Littoral (g/AME/jour)	Moyenne Borgou (g/AME/jour)
	Moyenne	P95		
Lait frais/fermenté	5,1	192,1	28	4
Lait concentré/en poudre	4,0	184	16	1,7
Autres dérivés laitiers	2,4	47,4	1,8	8,2

AME : Adult Male Equivalents

En Belgique, une consommation comprise entre 250 et 500 ml/jour est recommandée pour le lait et les produits laitiers pour les adultes (CSS, 2019). Au Bénin, les recommandations alimentaires sont basées sur un régime alimentaire qui inclut 100 à 200 g de produits laitiers par jour (CAN, 2014). En 2021, la consommation de lait au Bénin était évaluée à 9,5 kg/personne/an ce qui correspond à environ 26 g de lait par jour (WPR, 2024). À ce jour et à notre connaissance, aucune donnée n'est disponible sur la consommation du Wagashi Gassirè.

1.1.4. Disponibilité alimentaire et santé publique au Bénin

1.1.4.1. Disponibilité alimentaire

Les données de l'Enquête Modulaire Intégrée sur les Conditions de Vie des ménages 2^{ème} édition indiquent que l'alimentation béninoise est basée principalement sur les céréales que sont le maïs et le riz et les tubercules, dont le manioc et l'igname. Environ 96 %, 82 %, 80 % et 60 % des ménages béninois consomment au moins un jour dans la semaine le maïs, le riz, le manioc et l'igname respectivement (INSAE, 2012). Durant la campagne de production vivrière de 2016-2017, le Bénin a produit environ 1,4 million de tonnes de maïs, 0,4 million de tonnes de riz, 3,8 millions de tonnes de manioc et 3 millions de tonnes d'igname (DSA, 2024). Malgré une évolution sensible de la production agricole béninoise, l'insécurité alimentaire globale touche 43 % des ménages (20,2 % d'insécurité alimentaire et 22,8 % de risque d'insécurité alimentaire). Cette prévalence est toutefois en baisse en comparaison aux prévalences de 2010 (55,2 %) et 2011 (45,5 %) (INSAE, 2015). Toutefois, le niveau d'insécurité alimentaire actuel demeure préoccupant. Dans le contexte d'insécurité alimentaire et pauvreté, le lait et les produits laitiers deviennent des aliments de prestige et leur consommation est plus élevée dans les ménages les plus riches que dans les ménages les plus pauvres (INSAE, 2012).

1.1.4.2. Alimentation et surveillance épidémiologique

Sur la période de 2014-2018, les données de surveillance épidémiologique au Bénin indiquent que 53,36 % des décès étaient liés à des maladies non transmissibles (MNT) dont l'anémie, la malnutrition, les affections ostéo-articulaires au diabète, l'hypertension artérielle, les maladies cardiovasculaires, les infections respiratoires dont celles induites par le tabagisme et les cancers (OMS, 2020). Chez l'homme, les principaux types de cancer sont ceux de la prostate, du foie et du colorectum tandis que les cancers du sein, du col de l'utérus et du foie sont les plus fréquents chez les femmes béninoises (GLOBOCAN, 2022). Ces cinq types de cancer comptent pour 56 % des 7 496 nouveaux cas de cancers diagnostiqués et 54 % des 5 069 morts enregistrés pour cause de cancer au Bénin en 2022 (GLOBOCAN, 2022). L'un des principaux types de cancer, le cancer du foie, peut être indu par l'ingestion d'aflatoxine et le risque est plus élevé chez les patients atteints de l'hépatite C ou B (IARC, 2002 ; EFSA, 2020). Au Bénin, la séroprévalence du virus de l'hépatite B est de 6 % et l'infection semble toucher les sujets de sexe masculin, âgés de plus de 17 ans, et ayant un niveau d'étude secondaire (Kpoussou et al., 2020). Par ailleurs, la prévalence (sur 5 ans) du cancer du foie est de 5,9 pour 100 000 personnes pour un risque cumulé de 0,8 (nombre de nouveau-nés sur 100 susceptibles de développer le cancer du foie au cours de leur vie au Bénin) (GLOBOCAN, 2022). Les principaux facteurs de risque des cancers et globalement des MNT sont la mauvaise alimentation, l'inactivité physique, l'exposition à la fumée de tabac, l'usage nocif de l'alcool ou la pollution de l'air. Peu d'études épidémiologiques sont disponibles au Bénin sur les facteurs alimentaires à la base des différentes MNT identifiées. Par exemple, Gong et al (2022) rapportèrent une association entre l'exposition aux aflatoxines par la consommation du maïs et de l'arachide et le retard de croissance chez les enfants de 9 mois à 5 ans originaires du Bénin et du Togo

sans pour autant identifier clairement que ledit retard de croissance était causé par les trop fortes expositions aux aflatoxines détectées (moyenne géométrique de 32,8 pg d'aflatoxine/mg d'albumine du sang).

1.2. Problématique, questions de recherche et objectifs de l'étude

Problématique de recherche

Au Bénin, il existe une diversité de produits laitiers. Mais à partir du lait localement produit, le WG demeure le produit laitier le plus consommé. Le WG est un fromage à pâte molle obtenu par coagulation à chaud du lait sous l'action des extraits de *Calotropis procera* (Dossou et al., 2006). Il existerait divers modes de coagulation du lait basés sur les modes d'obtention des extraits de *Calotropis procera* (MAEP, 2014). L'ensemble des extraits *Calotropis procera* mériterait d'être identifiés et leur impact sur la qualité du WG résultant doit être caractérisé. Des études réalisées au Nigéria et au Ghana indiquent que le WG est riche en protéines, graisse et minéraux (Uzeh et al., 2006 ; Appiah et al., 1998). Quant au WG produit au Bénin, peu de données sont disponibles sur ses caractéristiques physico-chimiques ainsi que sur les caractéristiques du lait servant à sa production. Aucune donnée n'est encore disponible sur les teneurs en minéraux essentiels et en acides gras du lait et du WG produit au Bénin. De plus, la qualité du lait utilisé dans la production du WG est variable. Cette variabilité de la qualité du lait est liée à plusieurs facteurs dépendant de la vache laitière (génétique et physiologie) et de son alimentation (apports nutritionnels et facteurs environnementaux de variation de l'alimentation). Les relations entre la variabilité de la composition du lait et leur impact sur la composition du WG correspondant ne sont pas connues et mériteraient d'être caractérisées. Par ailleurs, les pratiques de production et de distribution actuelles du lait et WG sont susceptibles de générer des contaminations chimiques (MAEP, 2014). En effet, les bassins laitiers du Bénin sont aussi les bassins cotonniers où l'utilisation des pesticides est largement répandue et bien documentée (Agbohessi et al., 2011 ; Adechian et al., 2015 ; Dognon et al., 2018 ; Gouda et al., 2018). A cela s'ajoute la mauvaise utilisation des antibiotiques par les éleveurs et les vétérinaires ainsi que le non-respect des délais d'attente après le traitement des animaux (Mensah et al., 2014a). Le WG est aussi vendu non emballé et la poussière qui s'y dépose est une source potentielle de contamination par le plomb (MAEP, 2014). A ce jour, aucune donnée n'existe sur les substances chimiques susceptibles de contaminer le WG. Les risques chimiques associés à la présence de certains contaminants chimiques dans le lait et le WG doivent être caractérisés. Enfin, les méthodes de conservation en cours dans les zones de production du WG ne permettent pas une conservation de longue durée. Certes, plusieurs essais ont été réalisés au Bénin afin d'améliorer la production et la conservation du WG. Toutefois, ces travaux ne sont généralement pas suivis d'un transfert de technologie réduisant les capacités d'innovation des groupes cibles. Il convient de développer, de commun accord, avec les acteurs de la filière, des techniques adaptées au contexte socio-

économique et environnemental en vue d'améliorer la qualité du WG et les méthodes de sa conservation, et de faciliter son transport, pour ainsi améliorer le revenu tiré par les principaux acteurs de la filière.

Questions de recherche

Les différents constats ci-dessus énumérés amènent à des questions de recherche dont les principales sont les suivantes :

- Quelles sont les caractéristiques des matières premières, produits et processus de fabrication et de conservation du WG ?
- Quels sont les risques chimiques encourus par le consommateur de WG ?
- Quelles sont les conditions optimales de coagulation du lait frais à l'aide des extraits de *Calotropis procera* pour l'obtention du WG répondant aux préférences des consommateurs ?
- Quelles sont les meilleures conditions de conservation du WG ?

Objectif de l'étude

L'objectif général de cette étude est d'améliorer les procédés de production et de conservation du WG au Bénin au profit des productrices, des entreprises laitières locales et des consommateurs à travers une approche participative. De façon spécifique, il s'agit de :

- ❖ **Objectif spécifique 1** : décrire les procédés traditionnels de production, les pratiques de conservation et les conditions de commercialisation du WG produit à Dassa et Nikki, deux bassins laitiers situés au centre et au nord du Bénin.
- ❖ **Objectif spécifique 2** : caractériser le WG sur les plans nutritionnels et physico-chimiques en relation avec certains facteurs de variation de la qualité du lait (saison et région) et des procédés traditionnels de production ainsi que les risques chimiques associés à sa consommation au Bénin.
- ❖ **Objectif spécifique 3** : déterminer les conditions optimales de coagulation du lait pour une production de WG de qualité physico-chimique et nutritionnelle satisfaisante et les meilleures conditions de conservation du WG par l'utilisation des procédés combinant le traitement thermique et le conditionnement sous vide.

SECTION

EXPERIMENTALE

2. SECTION EXPERIMENTALE

Méthodologie globale de recherche

En début des travaux, les procédés traditionnels de production, de conservation et les conditions de commercialisation du WG ont été décrits en faisant une enquête auprès des agro-éleveurs, des productrices de WG, des commerçants de WG et des consommateurs de WG de Dassa et Nikki (Étude 1). Cette étude compte pour le premier objectif spécifique de ce travail.

Ensuite, une étude préliminaire (Étude 2) a été réalisée sur les caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles du WG vendu dans les marchés au sud du Bénin (Abomey-Calavi), ainsi que sur quelques dangers chimiques potentiels associés à ce produit. À cet effet, des échantillons de WG rouge et blanc ont été soumis à des analyses portant sur le pH, les caractéristiques nutritionnelles (matière grasse, protéines, minéraux et acides gras) et les contaminants chimiques (dioxines, aflatoxine M1, amines biogènes, résidus de pesticides et d'antibiotiques). Egalement dans cette étude, les risques liés à l'ingestion de certains contaminants chimiques via la consommation du WG ont été caractérisés. Cette étude compte pour le deuxième objectif spécifique de ce travail et a permis de circonscrire les analyses physico-chimiques, nutritionnelles et de contaminants chimiques à réaliser pour les études ultérieures.

À la suite de l'étude 1, les technologiques de production du WG ont été évaluées par suivi de production après des productrices de Dassa et de Nikki, en saison sèche et en saison pluvieuse (Étude 3). Au terme de ce suivi, le lait et les deux types de WG (rouge et blanc) correspondants ont été collectés pour différentes analyses. Cette étude 3 compte aussi pour le deuxième objectif spécifique de ce travail. L'ensemble des travaux ci-dessus mentionnés (Études 1, 2 et 3) constituent un état des lieux sur la production et la qualité du WG.

Après l'état des lieux, deux pistes d'amélioration des procédés de production et de conservation du WG ont été étudiées. La première piste (Étude 4) porte sur l'amélioration du rendement de production et de la qualité du WG par la détermination des conditions optimales de coagulation du lait avec les extraits frais de *Calotropis procera*. Pour cela, la méthodologie de réponse surface a été utilisée afin de modéliser l'influence de la quantité du *Calotropis procera*, du rapport des feuilles de *Calotropis procera* par rapport à la tige et du temps d'extraction de l'enzyme de *Calotropis procera* sur le rendement et la qualité du WG. Vingt essais de production du WG ont donc été réalisés. Les échantillons issus de ces essais (lait et WG blanc correspondant) ont été également soumis à des analyses physico-chimiques, nutritionnelles et de contaminants chimiques que dans le cas des analyses réalisées au cours de l'état des lieux. La deuxième piste (Étude 5) était relative à l'utilisation de la combinaison du traitement thermique et du conditionnement sous vide pour la conservation du WG. Les échantillons (lait et WG blanc) issus de cette étude ont été également analysés.

Au total, cinq études ont été réalisées dans le cadre de cette thèse de doctorat dont une enquête (Étude 1) et quatre études impliquant une collecte d'échantillons (Études 2, 3, 4 et 5). Le Tableau 7 fait le point des échantillons collectés et considérés pour chacun des paramètres d'analyse (physico-chimiques, nutritionnels et contaminants chimiques) pour les quatre études.

Tableau 7 : Récapitulatif des analyses de laboratoire sur les échantillons des différentes études

Paramètres d'analyse	Étude 2		Étude 3			Étude 4		Étude 5	
	WGB (n=6)	WGR (n=9)	Lait (n=24)	WGB (n=24)	WGR (n=24)	Lait (n=20)	WGB (n=20)	Lait (n=3)	WGB (n=63)
pH	6	9	24	24	24	20	20	3	63
Acidité titrable	×	×	24	24	24	×	×	×	×
Cendres	×	×	24	24	24	×	×	×	×
Couleur	×	×	24	24	24	20	20	×	×
Aw	×	×	×	24	24	×	20	×	63
Humidité	6	9	24	24	12	20	20	3	63
Matière grasse	6	9	24	24	12	20	20	3	63
Protéines	6	9	24	24	12	20	20	3	63
Acides gras	6	9	24	24	12	20	20	3	63
Aflatoxine M1	6	9	24	18	×	20	20	3	×
Résidus d'antibiotiques	6	9	24	×	×	20	×	3	×
Résidus de pesticides	6	9	×	×	×	×	×	×	×
Dioxines et PCBs	6	9	12	12	×	8	×	3	×
Amines biogènes	6	9	×	24	×	20	20	3	63
Minéraux et ETM	6	9	12	12	×	20	20	3	63
Densité	×	×	18	×	×	20	×	3	×

Aw : activité de l'eau, *PCBs* : polychlorobiphényles, *ETM* : Éléments traces métalliques, *n* : nombre d'échantillons collectés, *WGB* : Wagashi Gassirè Blanc, *WGR* : Wagashi Gassirè rouge, × : non déterminé

ETUDE 1 :

Caractéristiques des procédés traditionnels de production et de conservation du Wagashi Gassirè au Bénin

*Publiée dans Heliyon (2022). 8, Article
e10605. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e10605.*

Processing and preservation methods of Wagashi Gassirè, a traditional cheese produced in Benin

Alphonse Wanignon Dossou^{a,b*}, Baké Marie Thérèse Seko Orou^c, Gwladys Komagbe^d, Philippe Sessou^d, Abdou Karim Issaka Youssao^e, Souaïbou Farougou^d, Djidjoho Joseph Hounhouigan^b, Jacques Mahillon^f, Rock Mongbo^c, Marc Poncelet^g, Yann Eméric Madode^b, Caroline Douny^a, Marie-Louise Scippo^a, Antoine Clinquart^a, Paulin Azokpota^b

^a*Department of Food Science & FARAHA, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium*

^b*Laboratory of Food Sciences, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^c*Laboratory of Analysis of Social Dynamics and Development, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^d*Research Unit on Communicable Diseases, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^e*Laboratory of Animal Biotechnology and Meat Technology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^f*Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Faculty of Bioscience Engineering, Catholic University of Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium*

^g*Observing Recomposing Worlds, Faculty of Social Sciences, University of Liège, Liège, Belgium*

**corresponding author: dossoual6@gmail.com*

Abstract

Purpose: Wagashi Gassirè (WG) is a traditional cheese produced from cow milk following local processing methods in Benin. The aim of this study was to describe the milk processing methods and the preservation practices with the objective of improving WG production and sanitary quality.

Methods: A survey was carried out among 390 actors (84 dairy farmers, 165 producers, 53 traders, and 88 consumers) from two municipalities (Dassa and Nikki) in Benin.

Results: WG is highly preferred by consumers for its whiteness (63.0%), softness (24.7%), smoothness (19.2%), and firmness (13.7%). WG production is based on the coagulation of milk using *Calotropis procera* extracts as coagulant. Six milk processing methods, including three new WG production methods were identified, depending on how the *C. procera* extracts were pre-treated and used during WG production. Boiling (67%) was the most widely used as WG preservation method. The use of

aluminium cooking pots (100% of WG producers), WG open-air production (66.7% of producers) and antibiotic misuse (59.3% of dairy farmers) may lead to the chemical or microbiological contamination of WG.

Conclusion: Six WG production and six preservation methods were identified after the survey among WG producers and traders. Future studies should assess the sanitary and physico-chemical quality of WG from the identified processing and preservation methods. The next step of research should be also focused on the development of specific standards to produce a better quality of WG.

Keywords: *Calotropis procera*, milk, sanitary quality, chemical contaminants, traditional cheese

1. Introduction

Around the world, a diversity of cheeses (1400 according to some estimates) is available (McSweeney et al., 2017). Cheese processing is one of the most significant methods of preserving the major milk components such as proteins, minerals, and fat. The most important step during cheese processing is milk coagulation, achieved through the addition of enzymes to the milk (Mazorra-Manzano et al., 2018). During coagulation, the casein component of the milk protein system forms a gel network that entraps fat (Mazorra-Manzano et al., 2018; Baba-Moussa et al., 2007). Four types of enzymes are used in cheese factories, which are animal rennet, genetically engineered chymosin, coagulants of microbial origin, and plant-derived clotting enzymes (Jacob et al., 2010). The plant-derived clotting enzymes are an alternative to animal rennet and have the advantage of being accessible and easy to use, even on a small scale (Rayanatou, 2017). Their use is a common practice in Mediterranean, West African, and Southern European countries. In Portugal and Spain, the extract of *Cynara cardunculus* flowers is used to produce traditional cheeses such as Serra da Estrella, Castelo Branco, Torta Del Casar, La Serena or Los Ibores (Roseiro et al., 2003). In Mexico, extracts from *Solanum elaeagnifolium* have been used for production of pasta flata cheese type, known as "Asadero" while the traditional cheese "Gybna bayda", widely consumed in Sudan, is produced using the extract of the fruits of *Solanum dubium* (Mazorra-Manzano et al., 2018; Rayanatou, 2017; Kheir et al., 2011).

In Benin, fresh cow milk is processed, generally by the sociocultural group Peulh, into a traditional local cheese called Wagashi Gassirè (WG) which remains in the country, the most consumed dairy product (Mattiello et al., 2018; Dossou et al., 2006). WG is a soft cheese obtained by hot (65 to 70°C) coagulation of fresh whole milk using *Calotropis procera* extract that contains a plant enzyme known as calotropain (Mattiello et al., 2018; Baba-Moussa et al., 2007; Dossou et al., 2006). In Benin, WG is mainly produced in the northern part of the country where dairy farming is more developed and widespread (MAEP, 2014; Kora, 2005).

WG is an important source of proteins (23-36%), fats (18-27%), and minerals (1.3-1.8%) (Adeyeye, 2016; Alalade and Adeneye, 2010; Uzeh et al., 2006; Appiah et al., 1998). It could help to meet the daily

nutritional requirements of proteins (0.8 g), calcium (2500 mg), and other nutrients for adults (CSS, 2016). WG is highly valued and consumed daily by local consumers and also by people from neighbouring countries where it is used as a meat and fish substitute in various dishes (Baba-Moussa et al., 2007). WG and other dairy products contribute to more than 50% of the annual Peulh household income (Sessou et al., 2013). Income from the marketing of dairy products provides remuneration and work motivation to Peulh women. This almost regular income allows them to provide for other household needs and gives them decision-making power and autonomy (Chabi-Toko et al., 2015). As WG also requires a vast distribution network, it is an important source of income also for other actors of this value chain besides milk processors.

Several studies have shown the presence of dioxins and polychlorinated biphenyl (0.048 pg TEQ/g wet weight) and some pesticides, such as cypermethrin (0.7 µg/kg wet weight) and chlorpyrifos-ethyl (120 µg/kg wet weight), in milk and dairy products from Benin (Vaccher et al., 2020; Ingenbleek et al., 2019; Dossou et al., 2016). However, it is not well known whether and at which step(s) of the production and distribution chain (from dairy farmers to consumers) WG may be chemically contaminated. Moreover, to our knowledge, the main factors associated with WG chemical contamination during its storage have not been precisely documented. Therefore, it is necessary to identify and describe the traditional milk processing methods to produce WG, preservation practices, and conditions of sale to propose appropriate alternatives in order to decrease the risk of chemical contamination.

2. Material and methods

The aim of this study was to identify and describe the traditional milk processing methods, WG preservation practices, and conditions of sale to develop and propose appropriate alternatives to improve WG production, storage, and sale.

2.1. Characteristics of the study area

The study was carried out in Dassa and Nikki, two municipalities of the agricultural development pole identified in Benin Republic for diversification and intensive cattle production (Figure 1). These municipalities are part of the main cattle and WG production areas in Benin. Nikki is a WG production area with a dairy processing unit. Dassa is a WG production area and a crossroad and important WG commercial and transaction area (MAEP, 2014).

2.2. Survey sample size and selection of respondents

This survey was carried out using a questionnaire to collect information on WG production/sale. The snowball method was used to identify the included people: dairy farmers (who had at least 10 cows), active processors (still active in the last year and with at least 10 years of experience in WG production), traders (still active in the last year and with at least 10 years of experience in WG sale), and

WG consumers (Johnston and Sabin, 2010). Data saturation threshold was used to determine the sample size. Consumers were randomly selected without any specific criterion.

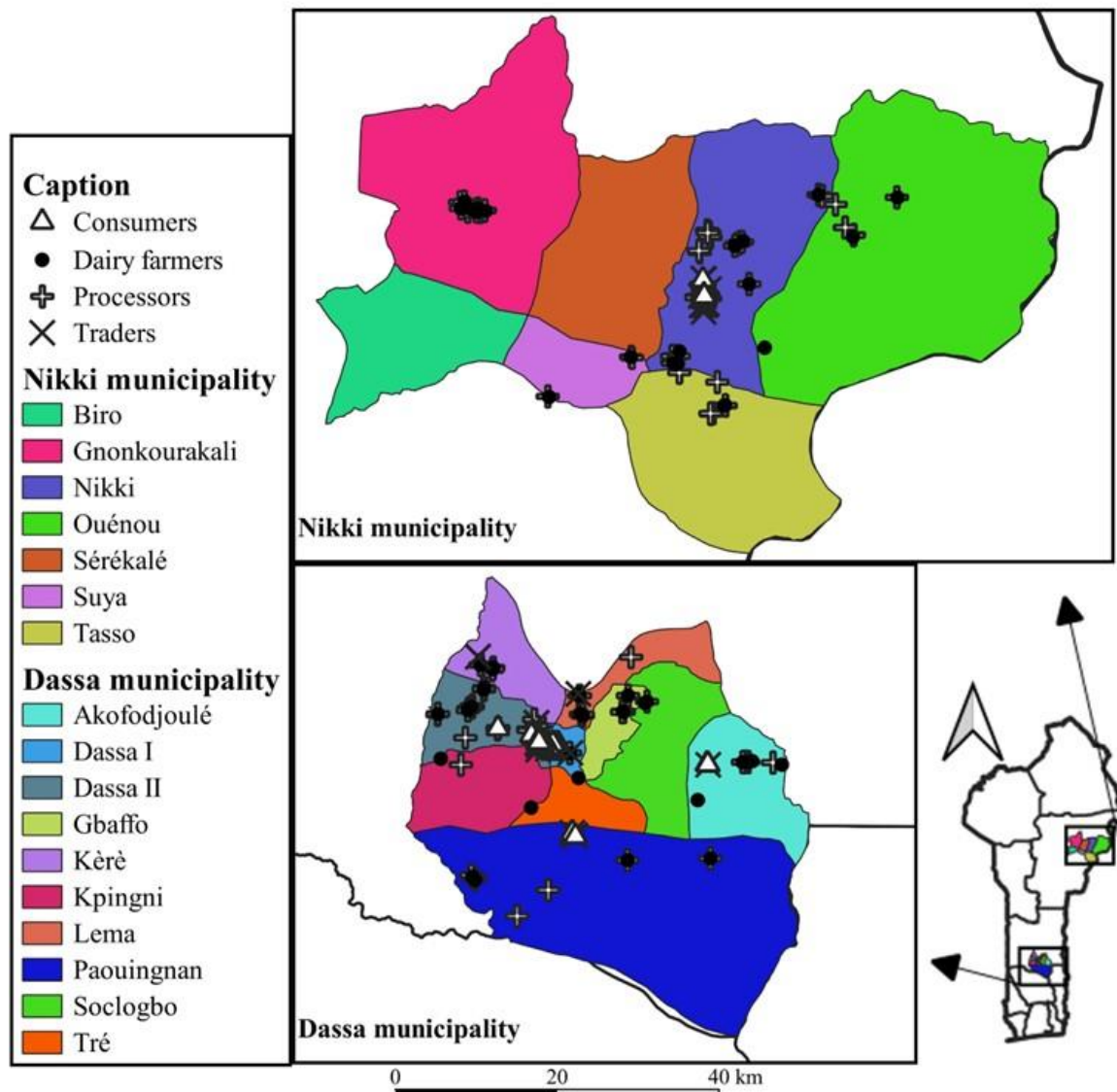


Figure 1: Geographical localization of the surveyed actors

2.3. Collected data

A semi-structured questionnaire was used for the one-to-one interviews with the different actors identified. The data collected were on: WG production (milk processing and WG preservation methods used by processors and traders); potential sources of contamination during processing, trading, quality criteria according to processors and consumers, and dairy farmers' practices that could affect the quality of the milk used as raw material to produce WG. Data were collected in the field using the Epicollect5 system through web and mobile applications (Aanensen et al., 2009).

2.4. Production monitoring

Based on the survey results, the three (3) most used methods were monitored to determine WG production yields. A total of 24 trials of productions (8 trials per processing methods) were carried out. For each unit operation (UO), time (from start to end of the UO), temperature (at the UO end), and the ingredient quantity were measured. The production yields were determined by dividing the quantity of cheese obtained by the quantity of milk used for the production.

2.5. Statistical analysis

Data from the semi-structured questionnaire were translated in a structured form and loaded in MS Excel 2013 to perform the descriptive analysis using the SAS System 9.4 software. The confidence intervals (CI) at 95% were determined for different variables before frequency comparison with the Chi-square test. The 95% CIs were calculated using the following formula:

$CI = \frac{1.96\sqrt{p(100-p)}}{n}$ where p is the proportion and n the number of respondents for the variable. The Z-test was used to compare percentages in pairs for variables with more than two classes.

For the data on production monitoring, means were compared with a simple linear regression analysis (ANOVA). Statistical significance was set at 5%.

2.6. Ethical Approval

The study protocol was approved by the Faculty of Agronomic Sciences of the University of Abomey-Calavi, Benin Republic. The survey and the production monitoring were conducted according to ethical guideline of the ethics committee of the University of Abomey-Calavi. All the interviews have been carried out with informed written consent of the respondents.

3. Results

3.1. Sociocultural status of the different actors

For this study, 390 people were interviewed using a semi-structured questionnaire in the municipalities of Dassa and Nikki (Table 1).

Table 1 : Typology of the respondents in the two municipalities

Typology of respondents	Number of respondents per municipality		Sub-total
	Dassa	Nikki	
Dairy farmers	54	30	84
Processors	90	75	165
Traders	35	18	53
Consumers	56	32	88
Total	235	155	390

Table 2 presents the sociocultural profile of the respondents. Dairy farmers (n=84) were mostly men (94.0%), married (96.4%), and illiterate (92.8%). The percentage of dairy farmers younger than 30 and older than 60 years (16.7% and 25.0%, respectively) was significantly lower ($P < 0.001$) than that of 30-60-year-old dairy farmers (58.3%). Dairy farmers belonged to the Peulh (86.9%) and Gando (13.1%) sociocultural groups. The Gando group is found exclusively in Nikki, whereas Peulh farmers are in both municipalities.

WG producers (n=165) were only women who belonged to different sociocultural groups: Peulh (61.8%), Gando (35.1%), Idaatcha (1.8%), and Fon (1.2%). These women were mainly married (95.1%) between 30 and 60 years of age (75.6%), and illiterate (92.7%).

Traders (n=53) belonged to many sociocultural groups: Peulh (32.0%), Baatonou (20.7%), Fon (13.2%), and Idaatcha (11.3%). WG trading was carried out almost exclusively by women (98.1%), generally married (92.4%). Approximately 44% of traders were literate.

Consumers (n=88) were mostly younger than 60 years of age, and belonged to the same sociocultural groups as the processors and also to other sociocultural groups (Dendi, Mina, Mahi, Yoruba, and Adja). They were mostly literate (83.2%) and 14.6% had a university diploma.

Table 2: Sociocultural profile of the different actors surveyed (% \pm CI)

Sociocultural characteristics	Dairy farmers (n = 84)	Processors (n = 165)	Traders (n = 53)	Consumers (n = 88)
Sex				
Men	94.0 \pm 5.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	1.9 \pm 3.8 ^a	51.7 \pm 10.4 ^a
Women	5.9 \pm 5.0 ^b	100 \pm 0.0 ^b	98.1 \pm 3.8 ^b	48.3 \pm 10.4 ^a
Age (in years)				
<30	16.7 \pm 9.4 ^a	12.2 \pm 7.1 ^a	40.0 \pm 16.2 ^a	50.8 \pm 12.4 ^a
>30 and <60	58.3 \pm 12.5 ^b	75.6 \pm 9.3 ^b	54.3 \pm 16.5 ^a	41.8 \pm 12.2 ^a
\geq 60	25.0 \pm 10.9 ^a	12.2 \pm 7.1 ^a	5.7 \pm 7.7 ^b	7.9 \pm 6.7 ^b
Marital status				
Married	96.4 \pm 3.9 ^a	95.1 \pm 3.3 ^a	92.4 \pm 7.1 ^a	70.8 \pm 9.4 ^a
Single	3.6 \pm 3.9 ^b	4.9 \pm 3.28 ^b	7.6 \pm 7.1 ^b	29.2 \pm 9.4 ^b
Matrimonial status				
Monogamy	45.7 \pm 10.8 ^a	43.9 \pm 7.7 ^a	48.9 \pm 14.0 ^a	79.4 \pm 9.9 ^a
Polygamy	54.3 \pm 10.8 ^a	56.1 \pm 7.7 ^a	51.0 \pm 14.0 ^a	20.6 \pm 9.9 ^b
Educational level				
None	92.8 \pm 5.5 ^a	92.7 \pm 3.9 ^a	56.6 \pm 13.3 ^a	16.8 \pm 7.8 ^a
Primary	5.9 \pm 5.0 ^b	5.4 \pm 3.4 ^b	24.5 \pm 11.6 ^b	24.7 \pm 8.9 ^a
Secondary	1.2 \pm 2.3 ^c	1.8 \pm 2.0 ^c	15.1 \pm 9.6 ^b	43.8 \pm 10.3 ^b
University	0.0 \pm 0.0 ^c	0.0 \pm 0.0 ^c	3.8 \pm 5.1 ^d	14.6 \pm 7.3 ^a
Sociocultural group				
Peulh	86.9 \pm 7.2 ^a	61.8 \pm 7.4 ^a	32.0 \pm 12.6 ^a	7.8 \pm 5.6 ^{bcd}
Gando	13.1 \pm 7.2 ^b	35.1 \pm 7.3 ^b		2.2 \pm 3.1 ^b
Fon		1.2 \pm 1.8 ^c	13.2 \pm 9.1 ^{bc}	16.8 \pm 7.8 ^{ac}
Idaatcha		1.8 \pm 2.0 ^c	11.3 \pm 8.5 ^{bc}	24.7 \pm 8.9 ^a
Mahi			3.8 \pm 5.1 ^b	2.2 \pm 3.1 ^b
Dendi			9.4 \pm 7.9 ^{bc}	2.2 \pm 3.1 ^b
Minan			5.7 \pm 6.2 ^b	
Baatonou			20.7 \pm 10.9 ^{ac}	14.6 \pm 7.3 ^{ad}
Yoruba			3.8 \pm 5.1 ^b	5.6 \pm 4.8 ^b
Adja				3.4 \pm 3.8 ^b
Others				20.2 \pm 8.3 ^a

The letters a, b, c, and d notify significant difference ($P < 0.05$) between percentages for the same variable, CI: confidence interval at 95%

3.2. Traditional milk processing methods for Wagashi Gassirè production

3.2.1. Different steps of the traditional processing methods to prepare Wagashi Gassirè

Two WG types were produced: white and coloured WG. On the basis of the processors' responses, white WG (WWG) production was performed following ten unit operations (UO) grouped into four steps (Figure 2).

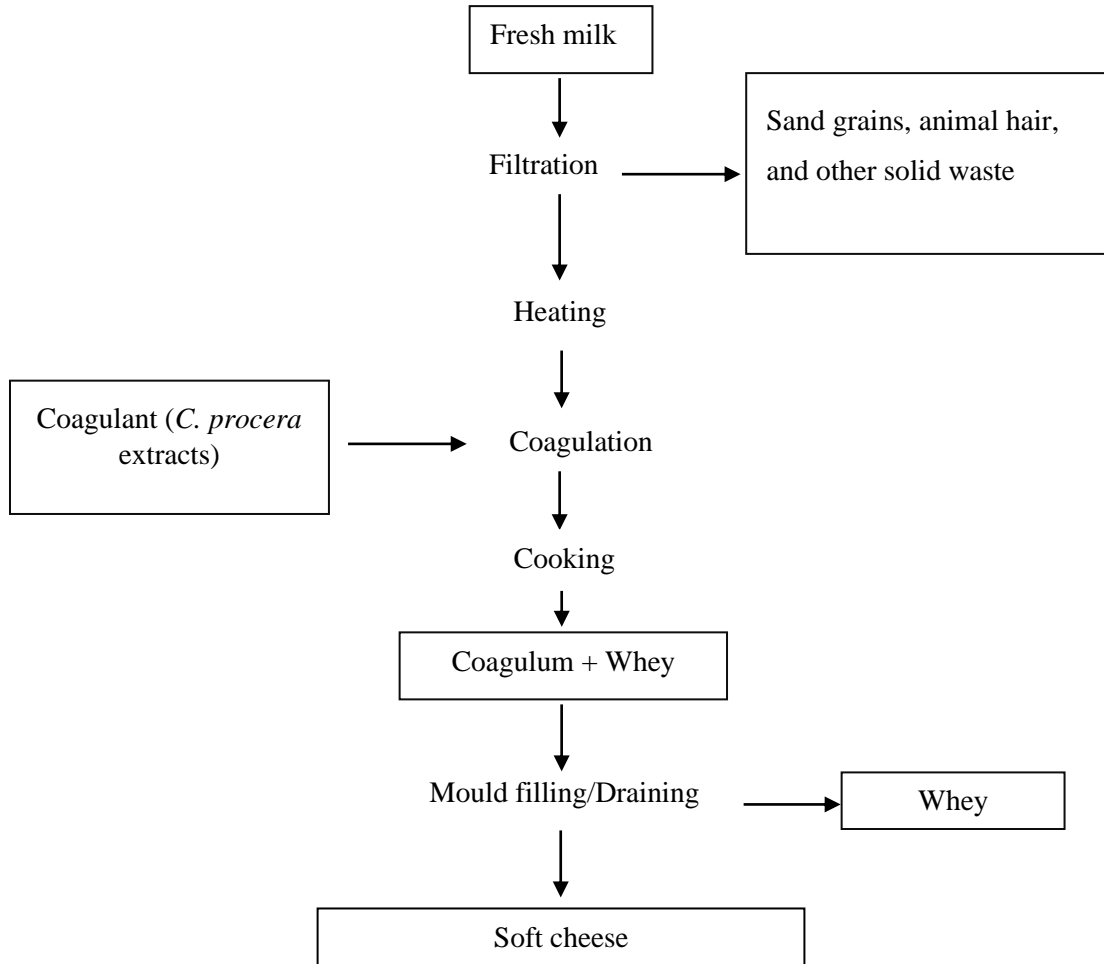


Figure 2: Fresh milk processing into Wagashi Gassirè

Step 1: Milk preparation for processing. In the first UO (UO1), milk was filtered. This UO was performed by 66.1% of processors. Then, filtered milk was heated (UO2: 59°C for 20 min). Heating was done by 82.7% of processors.

Step 2: Extract preparation. WG is produced using *C. procera* extracts. The combination of *C. procera* leaves and stem was used by 66.1%, stem alone by 32.1%, and sap by 9.1% of processors. *C. procera* leaves alone (1.8%) and *Carica papaya* leaves (1.8%) were rarely used. Fermented corn supernatant (1.2%) and salt (3.6%) also were used, but always in combination with *C. procera* extract. Usually, for the coagulant preparation, *C. procera* leaves or stems were washed using well, river or tap water (UO3:

13.5%) and crushed (UO4: 95.5%). Crushed *C. procera* was triturated (UO5: 98.7%) with heated milk (80.8%) or water (18.0%). The resulting mixture of milk/water and *C. procera* was filtered (UO6: 71.2%) and used as coagulant. Some processors (UO7: 5.5%) used all the crushed extract as coagulant and then skimmed off the *C. procera* rubble.

Step 3: Milk coagulation. The coagulant was added (UO8: 100%) to the heated milk. After the coagulant addition, the milk became solid and the coagulum obtained was cooked (91°C for 34 min, UO9: 100%).

Step 4: Mould filling/draining. The cooked coagulum was put into a mould (UO10: 100%): oval vegetable or plastic colanders of different sizes that allow the simultaneous draining.

The obtained WG is white and soft. These four steps were common to all the milk processing method variants.

3.2.2. Processing method variants

Milk processing variants to prepare WG depended on the used *C. procera* parts (sap, stem, leaves; alone or in combination) for milk coagulation, and on their pre-treatment (trituration or not in water or milk) before coagulation. In total, six WG production variants were identified on the basis of the method used to prepare the coagulant (Figure 3 and Table 3):

Method 1 (M1). *C. procera* sap was added to the heated milk for coagulation. This method was used by 9.1% of processors.

Method 2 (M2). *C. procera* crushed leaves and stems were added to the heated milk for coagulation. Then, *C. procera* rubble was skimmed. This method was used by 5.5% of processors.

Method 3 (M3). *C. procera* crushed leaves and stems were triturated in a separate small quantity of milk. The resulting solution was filtered and the filtrate was added to the heated milk for coagulation. This method was used by 49.7% of processors.

Method 4 (M4). *C. procera* crushed leaves and stems were triturated in a separate small quantity of water. The resulting solution was filtered and the filtrate was added to the heated milk for coagulation. This method was used by 9.1% of processors.

Method 5 (M5). *C. procera* crushed stem was triturated in a separate small quantity of milk. The resulting solution was filtered and the filtrate added to the heated milk for coagulation. This method was used by 26.1% of processors.

Method 6 (M6). *C. procera* crushed stem was triturated in a separate small quantity of water. The resulting solution was filtered and the filtrate added to the heated milk for coagulation. This method was used by 7.3% of processors.

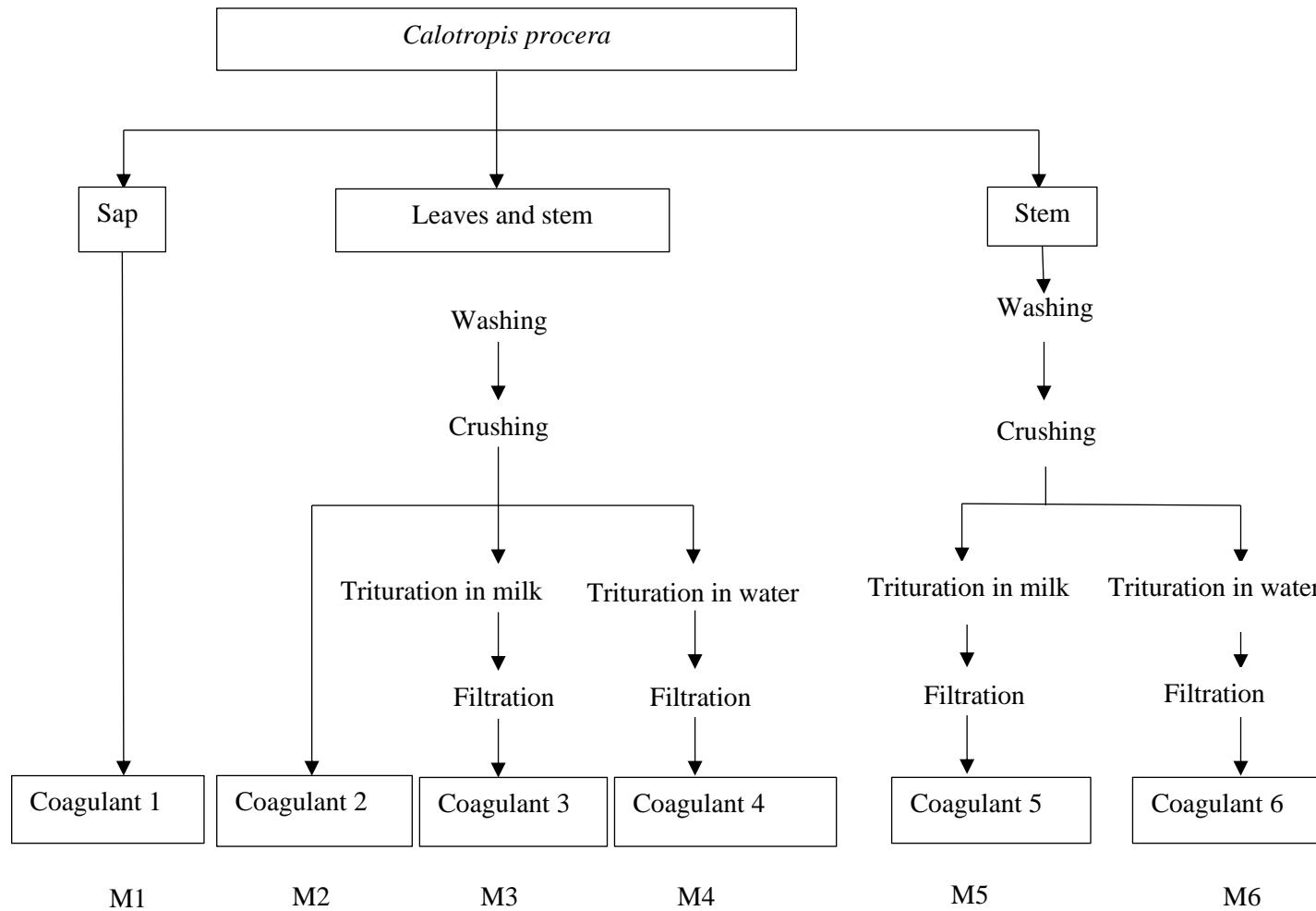


Figure 3: Different Wagashi Gassirè production methods in function of the coagulant used.

M1: sap, M2: leaves and stem without trituration or filtration followed by skimming; M3: trituration in milk of leaves and stem; M4: trituration in water of leaves and stem; M5: trituration of stem in milk; M6: trituration of stem in water.

Table 3: Utilization rate of each processing method by the different sociocultural groups

Processing method	Number of respondents (n = 165)	Percentage	Sociocultural groups
M1	15	9.1	Peulh, Gando
M2	9	5.5	Peulh
M3	82	49.7	Peulh, Gando, Fon, Idaatcha
M4	15	9.1	Peulh, Gando
M5	43	26.1	Peulh, Gando
M6	12	7.3	Peulh, Gando

M1: sap, M2: leaves and stem without trituration or filtration followed by skimming; M3: trituration in milk of leaves and stem; M4: trituration in water of leaves and stem; M5: trituration of stem in milk; M6: trituration of stem in water.

The choice of processing variant varied among sociocultural groups (Table 3). The M2 variant was used only by the Peulh group (5.5% of all processors). Conversely, the M3 variant was the most widespread (49.7%) method and the only method used by the Fon and Idaatcha sociocultural groups. The other four methods (M1, M4, M5 and M6) were used by the Peulh and Gando sociocultural groups (45.9% of all processors).

Then, for three most used processing methods (M1, M3, and M5), according to the survey results, the production conditions (heating time/temperature, cooking time/temperature, coagulant concentration for M3 and M5) and WG yield were monitored (Table 4). The ratio of milk to *C. procera* was 7.9 for M3 (i.e. 7.9 g of milk was used per gram of *C. procera* extract) and 19 for M5 (i.e. 19.0 g of milk per gram of *C. procera* extract) ($P < 0.001$). The cheese yields varied from 27.0 (M1) to 33.0% (M5), but were not significantly different among methods. These yields were obtained using coagulation (i.e. heating) temperatures that ranged from 56 to 64 °C.

Table 4: WG production conditions and yields

	Processing methods (mean \pm SD)		
	M1	M3	M5
Heating time (min)	20 \pm 12 ^a	23 \pm 8 ^a	21 \pm 8 ^a
Heating temperature ($^{\circ}$ C)	56 \pm 9 ^a	58 \pm 10 ^a	64 \pm 10 ^a
Ratio milk/ <i>C. procera</i> extract (g/g)	-	7.9 \pm 3.7 ^a	19.0 \pm 6.0 ^b
Cooking time (min)	35 \pm 7 ^a	26 \pm 12 ^a	30 \pm 11 ^a
Cooking temperature ($^{\circ}$ C)	92 \pm 3 ^a	90 \pm 7 ^a	90 \pm 5 ^a
Mould filling/draining time (min)	11 \pm 3 ^a	16 \pm 3 ^a	12 \pm 7 ^a
Cheese yield (%)	27 \pm 6 ^a	31 \pm 8 ^a	32 \pm 9 ^a

a and *b* show significant differences ($P < 0.05$) between processing methods. SD: standard deviation

3.3. Wagashi Gassirè preservation practices by processors and traders

Analysis of the semi-structured interviews of processors and traders identified six WG preservation practices: boiling, sun-drying, colouring, immersion, smoking, and frying (Table 5).

Specifically, WG was boiled in water (69.4%), in salty water (17.9%), or in water with shea leaves (1.9%). Sometimes, WG was packed in a plastic bag (20.4%) before boiling. Boiling in water (62.2%) and in plastic bags (97.6%) were more used in Dassa than in Nikki (37.8% and 2.4%; $P < 0.01$).

Sun-drying (23.3%) was more common in Nikki than in Dassa (85.4% and 14.6%; $P < 0.0001$), and more frequently done by processors than traders (85.4% and 14.6%; $P < 0.05$).

WWG was coloured to obtain red WG using various dyes, such as sorghum cobs, sorghum panicles and teak (*Tectona grandis*) leaves. Sorghum cobs and panicles were soaked and then triturated or boiled with potash, bicarbonate, or salt. WWG was then immersed in the obtained coloured water. Teak leaves were only boiled to obtain coloured water for WWG colouring. Colouring was only used by processors and more in Nikki than Dassa (80.0% and 20.0%; $P < 0.01$).

Immersion in whey (4.6%), well or tap water (3.9%) was used for short-term preservation, before selling during the same day, and only by processors.

Smoking (2.4%) and frying in oil or fat (3.8%) were less frequently used by processors and also traders. They represented less than 7.0% of all WG preservation methods. Frying was only used by traders from Nikki.

Table 5: Distribution (% \pm CI) of WG preservation methods in function of the actors, municipality, and sociocultural group

Preservation method	Cumulative percentage of processors and traders	Municipalities		Actors		Sociocultural groups
		Dassa	Nikki	Processors	Traders	
Boiling in water	69.4 \pm 6.3	62.2 \pm 7.9 ^a	37.8 \pm 7.9 ^b	72.7 \pm 7.3 ^a	27.3 \pm 7.3 ^a	Baatonou, Dendi, Fon, Gando, Idaatcha, Mahi, Mina, Peulh, Yoruba
Boiling in salty water	17.9 \pm 5.2	45.9 \pm 16.1 ^a	54.1 \pm 16.1 ^a	75.7 \pm 13.8 ^a	24.3 \pm 13.8 ^a	Baatonou, Dendi, Fon, Gando, Idaatcha, Peulh
Boiling with shea leaves	1.9 \pm 2.2	0.0 \pm 0.0 ^a	100.0 \pm 0.0 ^a	100.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	Peulh, Gando
Boiling in plastic bags	20.4 \pm 5.5	97.6 \pm 4.6 ^a	2.4 \pm 4.6 ^b	73.8 \pm 13.3 ^a	26.2 \pm 13.3 ^a	Peulh, Fon, Idaatcha, Baatonou
Sun-drying	23.3 \pm 5.8	14.6 \pm 9.9 ^a	85.4 \pm 9.9 ^b	85.4 \pm 9.9 ^a	14.6 \pm 9.9 ^b	Peulh, Gando, Idaatcha, Baatonou
Colouring	13.1 \pm 5.3	20.0 \pm 17.5 ^a	80.0 \pm 17.5 ^b	100.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	Peulh, Gando
Immersion in whey	4.6 \pm 3.3	71.4 \pm 33.5 ^a	28.6 \pm 33.5 ^a	100.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	Peulh, Gando
Immersion in water	3.9 \pm 3.1	66.8 \pm 37.7 ^a	33.3 \pm 37.7 ^a	100.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	Peulh, Fon, Idaatcha, Gando
Smoking	2.4 \pm 2.1	20.0 \pm 35.1 ^a	80.0 \pm 35.1 ^a	60.0 \pm 42.9 ^a	40.0 \pm 42.9 ^a	Peulh, Dendi, Yoruba
Frying	3.8 \pm 5.1	0.0 \pm 0.0 ^a	100.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	100.0 \pm 0.0 ^a	Dendi, Baatonou

The letters a and b notify significant difference ($P < 0.05$) between groups for the same variable, CI: confidence interval at 95%

Boiling, the main preservation practice, was used by processors and traders belonging to all identified sociocultural groups. Conversely, colouring and immersion in whey were specific to the Peulh and Gando groups. Frying was not reported by Peulh participants.

3.4. Dairy farmers' practices and Wagashi Gassirè production conditions

The dairy farmers reported that the quantities of antibiotics administered to animals did not respect the recommended doses (59.3% of interviewed farmers) and that the treated animals may be milked on treatment day (54.6%). This milk was then consumed (85.7%) or processed (83.3%). Dairy farmers said that they used herbicides (2,4-D amine salt, atrazine, prometryn, fluorometuron and glyphosate) in cotton, maize, cassava, yam, and other crop fields (79.5%).

Moreover, 66.7% of processors did not have a dedicated production room and 43.6% of the existing rooms were not protected against rain, dust, wind, and pests. The production equipment was generally rudimentary: sieves with iron filters (49.5%), plastic colanders (95.0%), aluminium cooking pots (100.0%), and plastic material for WG storage before and during selling.

According to the traders, WG sale was ambulant (28.9%) and along roads (62.2%). Containers were often uncovered (85.7%). In the various sale locations, 97.1% of traders were exposed to rain, dust, and wind.

3.5. Wagashi Gassirè quality criteria

According to the processors, WG quality mostly depended on the quality of the milk used as raw material and on the main UO of the processing methods, such as coagulation (72.4%) and cooking (14.7%). They also said that the cleanliness of the production materials, the absence of contact between milk and salt/water and the use of fresh *C. procera* leaves or stems were important measures. The milk used as raw material should have been milked on the day of production (30.1%). Milk from recently calved cows (colostrum) should not be used.

According to the consumers, the most important criteria to assess WG quality were: whiteness (63.0%), softness (24.7%), smoothness (19.2%), and firmness (13.7%). Other criteria were also used, such as hardness (8.2%) and the absence of oil on the product surface (1.4%). The same criteria were used also by processors, except for firmness and absence of oil on the product surface. However, the importance of these criteria varied in function of the actors. Three additional criteria were used by processors; cooked taste and aroma (6.9%), absence of rubble (2.8%), and milk aroma (0.7%). Whiteness was the most important criterion to differentiate between processors (77.8%) and consumers (63.0%) ($P < 0.05$).

4. Discussion

4.1. Importance of Peulh women in the Wagashi Gassirè value chain

The sociocultural group Peulh is the main actor of the WG value chain. Indeed, dairy farmers are mostly Peulh who own 95.0% of the national cattle herd (Dahouda et al., 2019; Youssao et al., 2013). In Peulh culture, milking is carried out by men and women, but milk is exclusively the property of married women who are in charge of its management (Chabi-Toko et al., 2015). In agreement, in this study, women represented less than 5.0% of dairy farmers, but more than 95.0% of processors and traders, showing their importance in this value chain. Women processed milk mainly into WG. In Benin, traditional food production actors (particularly in agri-food crafts) are mostly 30 to 50-year-old women (Assogba et al., 2019; Dah et al., 2018; Badoussi et al., 2014; Saroumi and Kpenavoun 2014). The proportion of literate participants was higher among traders than processors. Indeed, trading require skills related to travelling and accounting that are more accessible to literate people younger than 60 years of age. This may explain the higher proportion of literate and the lower proportion of older people in this group. As the main actors of WG production were illiterate women, intervention in this sector should be targeted mainly to this group.

4.2. The efficiency of milk processing and Wagashi Gassirè preservation methods

Cow milk is the main raw material used for WG production (Dossou et al., 2006). More than a third of the surveyed processors reported difficulties in obtaining milk. Milk availability depends mainly on the season. During the rainy season, milk production increases due to the abundance of fodder resources (Dah et al., 2018; Gagara et al., 2017). However, in the dry season, their scarcity leads to transhumance of dairy farmers to other areas where fodder resources are available. The transport of milk to the municipalities of origin then depends on the transport infrastructure quality (Corniaux et al., 2005).

The main operations identified for milk processing into WG were filtration, heating, coagulation, cooking, and moulding/draining, as previously reported (Anihouvi et al., 2019; Gagara et al., 2019; Dah et al., 2018; Dossou et al., 2006; Belewu et al., 2005). The main coagulant used for WG production was *C. procera* extract (Baba-Moussa et al., 2007). Six different methods to produce WG could be identified in function of the *C. procera* part used and extract pre-treatment. The utilization of these methods varied in the different sociocultural groups. The Peulh sociocultural group used all the identified methods, showing that they are the main actors of WG production. Conversely, Gando and Fon used five methods, and Idaatcha only one. Generally, the sociocultural groups living in the same geographical area used the same methods. They exchange knowledge through friendships, kinship, and intercultural marriages (Badoussi et al., 2014). Thus, the Gando, Fon, and Idaatcha might have learnt about WG production from the Peulh, who still keep some of the production secrets. Traditionally, the Gando are servants of the Peulh and would have learnt WG production while working for them (Hahonou, 2011). The Idaatcha are the largest population and the most important sociocultural group in the Dassa municipality. Their

know-how in WG production might be linked to intercultural relations with the Peulh during their transhumance through Dassa.

The coagulant activity of *C. procera* extracts is due to the presence of calotropain, a cysteine protease (Baba-Moussa et al., 2007; Dossou et al., 2006). The main plant-derived clotting enzymes with coagulant activity on milk are cysteine proteases, serine proteases, and acid proteases. Several plants with similar enzymes including calotropain from *Carica papaya*, and bromelain from *Ananas comosus* are used for milk coagulation (Rayanatou, 2017; Kheir et al., 2011; Roseiro et al., 2003). However, the cheese yields obtained with papain and bromelain are lower than those obtained with *C. procera* and the cheese flavour is bitter (Adetundji and Salawu 2008; Elogo and Courdjo 2005). Therefore, *C. procera* extracts are considered as the best coagulant for WG production (Adetundji and Salawu 2008). Only *C. procera* leaves are used in Burkina Faso (Dah et al., 2018), whereas leaves, stem, fruits, and sap are used in Nigeria and Benin (Dossou et al., 2006; Belew et al., 2005). Stem and leaves are crushed, mixed with milk and then filtered. The filtrate constitutes the coagulant (Dah et al., 2018). Our survey highlighted other traditional methods: the use of water for coagulant preparation (M4 and M6), and coagulant skimming without prior crushing or filtering (M2). These methods are new and are reported for the first time. Generally, plant-derived clotting enzymes are extracted by aqueous maceration (Jacob et al., 2011; Kheir et al., 2011). The plant organs (fresh or air-dried) are crushed and soaked in water at room temperature (28-30°C). Spain and Portugal have the largest variety and production of cheeses using extracts of *Cynara sp.* obtained by aqueous maceration (Roseiro et al., 2003). But in our study, aqueous maceration is less used than maceration in milk. The M3 method for coagulant preparation described in this study was the most used in Benin representing about 50.0% of all WG production processes. However, *C. procera* sap (M1) displays the best milk clotting activity and thus should give the best cheese yield (Baba-Moussa et al., 2007). Yet, cheese yields were similar when using methods M1, M3, and M5. Additional investigations should be done starting from a milk of standard composition because cheese yields also depend on the milk quality (Rayanatou, 2017; Jeantet et al., 2014). Cheese yield may vary from 20.0 to 33.0% when *C. procera* extracts are used (Dossou et al., 2006; Belew et al., 2005). Furthermore, coagulant skimming instead of trituration and filtering could lead to the presence of more *C. procera* rubble in WG. Some processors argued that the coagulant prepared according to the M5 method would allow obtaining WG of the same colour as the milk with a good cheese yield. Similarly, the coagulant prepared according to the M6 method should minimize coagulation failure and help to obtain the whitest WG (Dossou et al., 2006). The WG production methods using leaves and stems are ancestral and allow using less *C. procera* plants that are becoming rare. The identified production processes should be evaluated to identify the method that best meets the consumers' preferences, and provides the best cheese yield with good nutritional properties.

WG preservation by boiling is the main method used in Benin. In Burkina Faso, cold preservation also has been reported (Dah et al., 2018; Sessou et al., 2013; Dossou et al., 2006). Sun-drying would allow

longer preservation because it considerably reduces the cheese water content, thus limiting microbial development. Conversely, frying with oil favours earlier rancidity (Sessou et al., 2013; Lahlali et al., 2008; Dossou et al., 2006). Overall, the shelf life of WG at room temperature is limited due to the different sources of chemical and microbiological contamination as well as the product characteristics (Aw, pH) and environmental conditions that promote microbial growth.

4.3. Potential sources of Wagashi Gassirè contamination

Cow milk is the main raw material used in WG production (Dossou et al., 2006). As the production is traditional, all operations are done manually, sometimes without respecting good hygiene practices, such as hand and material washing (Gagara et al., 2019). This could lead to a probable microbial contamination and reducing of the shelf life of WG. Therefore, it is necessary to increase the actors' awareness about good manufacturing and good hygiene practices to obtain products of good sanitary quality for consumers.

The misuse of antibiotics by dairy farmers and the no respect of the withdrawal period after animal treatment are the main reasons of antibiotic residue presence in milk and dairy products (Mensah et al., 2014). These two behaviours were reported by the majority of the dairy farmers surveyed. In Benin and in West Africa, several studies showed that milk usually contains antibiotic residues, particularly tetracyclines, beta-lactams, aminoglycosides, penicillin, sulphonamides, and macrolides (Madougou et al., 2019; Mensah et al., 2019; Oluwafemi et al., 2018; Olatoye et al., 2016; Bagré et al., 2015; Mensah et al., 2014; Addo et al., 2011). Therefore, dairy farmers should be trained to the use of good hygiene and husbandry practices according to the legislation recommendation. In addition, the surveyed dairy farmers reported using herbicides in crop fields. The most used pesticides in northern Benin are endosulfan (a forbidden insecticide) and glyphosate (a herbicide) (Dognon et al., 2018; Gouda et al., 2018; Adechian et al., 2015; Agbohessi et al., 2011). As some pesticide residues have been found in food consumed in Benin and West Africa, they might be present also in WG (Douny et al., 2021; Ingenbleek et al., 2019; Dossou et al., 2016).

The production and marketing conditions and the materials used also are potential sources of chemical and microbial contamination. Dust could be a source of lead contamination because it deposits on WG during production and selling (Mama et al., 2013; Ekaneme, 1998). Moreover, some of the materials used for WG production and storage contain aluminium that could migrate to WG (EFSA, 2008).

4.4. Impact of the Wagashi Gassirè production method on its quality

Cheese quality depends on the conditions of milk coagulation and cooking, particularly the dose of coagulant used, the temperature, and the milk quality (pH, protein, fat, and calcium content) (Jeantet et al., 2014). In cheese factories, the milk quality is standardized through specific operations, such as physical purification by filtration or centrifugation, fat content standardization by adding cream or skim

milk, protein content standardization by adding casein or by ultrafiltration, pH adjustment by adding lactic leavening, and calcium content adjustment by adding calcium chloride (Rayanatou, 2017). These operations allow the production of cheese of regular composition and constant quality. Since the production of WG cheese is traditional, no standardization of the milk is done. This could lead to products of variable quality. Moreover, the milk-clotting enzymatic mechanism of calotropain, similar to chymosin, is in two steps: the hydrolysis of the Phe₁₀₅-Met₁₀₆ peptide bond in the casein micelle-protective protein (enzymatic phase) and the release of the hydrophilic portion known as glycomacropeptide (f₁₀₆₋₁₆₉) conducting to casein aggregation and clot formation (nonenzymatic phase) (Mazorra-Manzano et al., 2018). The enzymatic phase is temperature-dependent and affects the cheese yield and the cheese properties (Rayanatou, 2017; Jacob et al., 2011). The coagulation of the milk must therefore be performed at the optimal temperature of the clotting enzyme. For WG production, calotropain activity is optimal at 70°C (Baba-Moussa et al., 2007; Dossou et al., 2006). This temperature was not always easy to reach by processors, as shown by the monitoring performed (59°C), because the production is traditional. Plant extracts, with enough quantity of proteolytic enzymes, have the capacity to clot milk under optimum enzymatic activity conditions and affect the cheese yield (Mazorra-Manzano et al., 2018). For instance, the peptidases from *C. procera* exhibited dose-dependent milk-clotting activity up to 50–60 µg to 2 mL of milk and the doses higher than 60 µg were not effective to improve substantially the milk-clotting activity (Freitas et al., 2016). For WG processing, a significant difference was observed in the quantity of crude extract of *C. procera* used for the processing methods M3 and M5. The similar cheese yields obtained for M3 and M3 may indicate that the crude extracts are complex in proteinase composition resulting in a different milk-clotting activity (Mazorra-Manzano et al., 2018). According to WG producers, the milk to be used must have been milked on the day of production because a long interval between milking and cheese production is associated with natural milk fermentation that decreases WG yield. This needs to be confirmed by comparative studies.

In Burkina Faso, consumers choose WG for its nutritional value, aroma, and preservation properties. However, most of them find WG less attractive than foreign cheeses and less available (Dah et al., 2018). For Beninese consumers, whiteness is the most important criterion. However, the hygiene conditions during production as well as WG aroma and presentation (packaging) should be improved to interest consumers in urban centres accustomed to European cheese.

5. Conclusion

In Benin, there are various methods to produce WG that use different *C. procera* parts (sap, stem, leaves; alone or in combination) and different plant extract pre-treatment (trituration or not in water or milk) before milk coagulation. WG production process, storage and sale/distribution conditions, as well as husbandry practices, and seasonality of the milk used as raw material are all factors that could affect

WG sanitary quality. More research is needed to assess the sanitary quality of WG obtained using these different processing methods and preservation practices.

References

- Aanensen DM, Huntley DM, Feil EJ, al-Own F, Spratt BG. 2009. Epicollect: linking smartphones to web applications for epidemiology, ecology and community data collection. *Plos One*. 4(9):6968. doi:10.1371/journal.pone.0006968.
- Addo KK, Mensah GI, Aning KG, Nartey N, Nipah GK, Bonsu C, Akyeh ML, Smits HL. 2011. Microbiological quality and antibiotic residues in informally marketed raw cow milk within the coastal savannah zone of Ghana. *Tropical Medicine and International Health*.16(2):227–232. doi:10.1111/j.1365-3156.2010.02666.x.
- Adechian SA, Nasser-Baco M, Akponikpe I, Imorou-Toko I, Egah J, Affoukou K. 2015. Les pratiques paysannes de gestion des pesticides sur le maïs et le coton dans le bassin cotonnier du Bénin. *Vertigo*. 15: 2. doi:10.4000/vertigo.16534.
- Adetundji VO, Salawu OT. 2008. West African soft cheese ‘wara’ processed with *Calotropis procera* and *Carica papaya*: A comparative assessment of nutritional values. *African Journal of Biotechnology*. 7(18):3360-3362.
- Adeyeye SAO. 2017. A preliminary study on the quality and safety of street-vended warankasi (a Nigerian soft white cheese) from Ibadan, Oyo state, Nigeria. *British Food Journal*. 119 (2):322-330. doi:10.1108/BFJ-05-2016-0218.
- Agbohessi PT, Imorou-Toko I, Yabi JA, Dassoundo-Assogba JFC, Kestemont P. 2011. Caractérisation des pesticides chimiques utilisés en production cotonnière et impact sur les indicateurs économiques dans la Commune de Banikoara au nord du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 5(5): 1828-1841.
- Alalade OA, Adeneye JA. 2010. The effect of storage period on the chemical composition and coliform microflora of wara cheese. *International Journal of Dairy Science*. 1(2):126-130. doi:10.3923/ijds.2006.126.130.
- Anihouvi EL, Salih H, Anihouvi VB, Kesenkas H. 2019. Dairy Products Production in Benin. *Akademik Gıda*. 17(4):508-516. doi: 10.24323/akademik-gida.667265.
- Appiah F, Ellis WO, Mathias J, Oduro I. 1998. Studies on traditional cheese (Woagashie) production in the Ashanti region. *Journal of Ghana Science Association*. 1(1): 96–104. doi: 10.4314/jgsa.v1i1.17790.
- Assogba MF, Anihouvi DGH, Iko Afé OH, Kpoclou YE, Mahillon J, Scippo ML, Hounhouigan DJ, Anihouvi VB. 2019. Processing methods, preservation practices, and quality attributes of smoked and smoked-dried fishes consumed in Benin. *Cogent Food and Agriculture*. 5(1):1641255. doi:10.1080/23311932.2019.1641255.

- Baba-Moussa F, Baba-Moussa L, Ahissou H, Bokossa I, Capo-Chichi B, Toukourou F, Sanni A. 2007. Propriétés coagulantes de *Calotropis procera* et ses possibilités d'utilisation en industrie agro-alimentaire. *Revue Cames*. 5:7-12.
- Badoussi E, Azokpota P, Madodé YE, Kayodé PAP, Dossou A, Soumanou M, Hounhouigan DJ. 2014. Variations in the traditional processing methods of *Pentadesma butyracea* butter in northern Benin. *Food Chain*. 4(3):261-274. doi:10.3362/2046-1887.2014.026.
- Bagré TS, Samandoulougou S, Traoré M, Illy D, Tchamba GB, Bawa-Ibrahim H, Bouda SC, Traoré AS, Barro N. 2015. Détection biologique des résidus d'antibiotiques dans le lait et produits laitiers de vache consommés à Ouagadougou, Burkina Faso. *Journal of Applied Biosciences*. 87:8105-8112.
- Belewu MA, Belewu KY, Nkwunonwo CC. 2005. Effect of biological and chemical preservatives on the shelf life of West African soft cheese. *African Journal of Biotechnology*. 4(10):1076-79.
- Chabi TR, Adegbidi A, Lebailly P. 2015. Valorisation des produits laitiers dans les ménages Peul du Nord-Est du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 9(6): 2716-2726.
- Corniaux C, Duteurtre G, Dieye PN, Pocard-Chapuis R. 2005. Les minilaiteries comme modèle d'organisation des filières laitières en Afrique de l'Ouest: succès et limites. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* 58 (4):237-243. doi: 10.19182/remvt.9918.
- CSS (Conseil Supérieur de la Santé). 2016. Recommandations nutritionnelles pour la Belgique. Avis n° 9285.
- Dah PA, Guira F, Tankoano A, Traore K, Sawadogo-Lingani H, Savadogo A. 2018. Cheese processing, marketing, utilisation, and consumption in Burkina Faso. *Current Journal of Applied Science and Technology*. 29(5):1-12. doi:10.9734/CJAST/2018/42863.
- Dahouda M, Boubacar AMY, Dossa LH, Dotche OI, Ahounou SG, Kiki SP, Issaka YAK. 2019. Stratégies d'alimentation et gestion des ressources alimentaires dans les élevages bovins des Communes de Nikki, Kalalé et N'Dali au Nord Est Bénin. *Revue Internationale des Sciences Appliquées*. 2(2) : 48-70.
- Dognon SR, Dognon HR, Youssao AKA, Scippo M-L, Youssao AKI. 2018. The use of pesticides in agriculture in North East Benin. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 12(2) : 48-63.
- Dossou J, Adote S, Soulé H. 2006. Production et transformation du lait frais en fromage peulh au Bénin, Rapport de guide de bonnes pratiques. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Dossou J, Atchouke GD, Dabadé DS, Azokpota P, Montcho JK. 2016. Evaluation comparative de la qualité nutritionnelle et sanitaire du lait de différentes races de vaches de quelques zones

- d'élevage du Bénin. *European Scientific Journal*. 12(3):140-159. doi:10.19044/esj.2016.v12n3p141.
- Douny C, Zoumenou YMBG, Aïna M, Toko II, Igout A, Guedegba L, Chabi SK, Kestemont P, Scippo ML. 2021. Contamination of water, sediment and fish with residues of pesticides used in cotton production in Northern Benin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 81(3):367-385. doi: 10.1007/s00244-021-00888-2.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Safety of aluminium from dietary intake. New Jersey: John Wiley and Sons. doi :10.2903/j.efsa.2008.754.
- Ekaneme O. 1998. The street food trade in Africa: Safety and socio-environmental issues. *Food Control*. 9(14):211-215. doi:10.1016/S0956-7135 (97)00085-6.
- Elolo GO, Courdjo RL. 2005. Propriétés physico-chimiques et réactivité comparées des agents coagulants végétaux dans la fabrication du fromage frais wagasi. *Journal de la Recherche Scientifique de l'Université de Lomé*. 7(1):159-164.
- Freitas CDT, Leite HB, Oliveira JBP, Amaral JL, Egito AS, Vairo-Cavalli S, Lobo MDP, Monteiro-Moreira ACO, Ramos MV. 2016. Insights into milk-clotting activity of latex peptidases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. *Food Research International* 87: 50–59. doi: 10.1016/j.foodres.2016.06.020.
- Gagara M, Sessou P, Ahounou S, Azokpota P, Youssao I, Farougou S, Soumana GA. 2017. Analyses of constraints related to milk production in Liptako Gourma in Niger. *African Journal of Agricultural Research*. 12(23):1949-1958. doi: 10.5897/AJAR2016.12029.
- Gagara MH, Sessou P, Dossa F, Ahounou S, Azokpota P, Youssao I, Gouro AS, Farougou S. 2019. A study on the indigenous methods of processing milk in Niger. *Current Agriculture Research Journal*. 7(2):213-223. doi:10.12944/CARJ.7.2.09.
- Gouda A-I, Imorou-Toko I, Salami S-D, Richert M, Scippo M-L, Kestemont P, Schiffers B. 2018. Pratiques phytosanitaires et niveau d'exposition aux pesticides des producteurs de coton du nord du Bénin. *Cahiers. Agricultures*. 27, 65002. doi:10.1051/cagri/2018038.
- Hahonou EK. 2011. Past and present African citizenships of slave descent: lessons from Benin. *Citizenship Studies*. 15(1):75–92. doi: 10.1080/13621025.2011.534932.
- Ingenbleek L, Huc R, Pereirac LL, Paineauc A, Coletc I, Konéd AZ, Adegboyee A, Hossouf SE, Dembélé Y, Oyedelee AD, et al. 2019. Sub-Saharan Africa total diet study in Benin, Cameroon, Mali and Nigeria: Pesticides occurrence in foods. *Food Chemistry*:X. 2:100034, doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100034.
- Jacob M, Doris J, Rohm H. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. 64(1):14-33. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x.

- Jeantet R, Croguennec T, Garric G, Brulé G. 2014. Initiation à la technologie fromagère. 2^{ème} édition, Paris : Loivoisier.
- Johnston, L. G., and K. Sabin. 2010. Échantillonnage déterminé selon les répondants pour les populations difficiles à joindre. *Methodol Innovations*. 5(2):38-48. doi: 10.4256/mio.2010.0017.
- Kheir SEO, El Owni OAO, Abdalla MOM. 2011. Comparison of quality of sudanese white cheese (Gibna Bayda) manufactured with Solanum dubium fruit extract and rennet. *Pakistan Journal of Nutrition*. 10(2):106-111. doi: 10.3923/pjn.2011.106.111.
- Kora S. 2005. Contribution à l'amélioration de la technologie de production du fromage peulh au Bénin. [Thèse d'ingénieur agronome]. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Lahlali R, Bajji M, Serrhini MN, Jijakli MH. 2008. Modelling the effect of temperature, water activity, and solute on the in vitro growth of the biocontrol yeast *Pichia anomala* strain K. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*. 12(4):353-359.
- Madougou AM, Douny C, Moula N, Scippo M, Delcenserie V, Daube G, Hamani M, Korsak N. 2019. Survey on the presence of antibiotic residues in raw milk samples from six sites of the dairy pool of Niamey, Niger. *Veterinary World*. 12(12): 1970-1974.
- MAEP (Ministère de l'Agriculture de l'Élevage et de la Pêche). 2014. Etude des filières lait et viande, Rapport définitif sur la filière lait (PAFILAV). Cotonou : MAEP.
- Mama, D., B. Dimon, M. P. Aina, M. Adoukpe, J. Ahomadegbe, A. Youssao, A. Kouazoude, S. P. Kouanda, and M. Moudachirou. 2013. Transport urbain au Bénin et pollution atmosphérique: évaluation quantitative de certains polluants chimiques de Cotonou. *Int J Biol Chem Sci*. 7(1): 377-86. doi:10.4314/ijbcs.v7i1.33.
- Mattiello S, Caroprese M, Matteo CG, Fortina R, Martini A, Martini M, Parisi G, Russo C, Zecchinia M. 2018. Typical dairy products in Africa from local animal resources. *Italian Journal of Animal Science*. 15(19):740-754. doi:10.1080/1828051X.2017.1401910.
- Mazorra-Manzano MA, Moreno-Hernández JM, Ramírez-Suarez JC. 2018. Milk-clotting plant proteases for cheesemaking. In: Guevara MG, Daleo GR, editors. *Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes*. Switzerland: Springer Nature; p. 21-41.
- McSweeney PLH, Ottogalli G, Fox PF. 2017. Diversity and classification of cheese varieties: an overview. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fourth Edition. San Diego: Academic Press; p. 781-804. doi: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00031-4.
- Mensah SEP, Aboh AB, Salifou S, Mensah GA, Sanders P, Abiola FA, Koudandé OD. 2014a. Risques dus aux résidus d'antibiotiques détectés dans le lait de vache produit dans le Centre Bénin. *Journal of Applied Bioscience*. 80 :7102-7112.

- Mensah SEP, Koudandé OD, Sanders P, Laurentie M, Mensah GA, Abiola FA. 2014b. Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique: risques de santé publique. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*. 33 (3):975-986.
- Mensah SEP, Sessou P, Nata C, Adjahoutonon KYKB, Lahamy O, Farougou S. 2019. Mode d'utilisation des antibiotiques dans les élevages de bovin laitier sédentaires au nord-ouest du Bénin. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 42(2):7198-206. doi:10.35759/JANmPISci.v42-2.2.
- Olatoye IO, Daniel OF, Ishola SA. 2016. Screening of antibiotics and chemical analysis of penicillin residue in fresh milk and traditional dairy products in Oyo state, Nigeria. *Veterinary World*. 9(9): 948-954.
- Oluwafemi F, Oluwabamiwo BF, Oluwatosin OO, Akinrinade OR, Kolapo AL. 2018. Assessment of microbiological and residual antibiotics status in milk sold in Abeokuta, Ogun State. Nigeria. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 6(6):642-651. doi:10.24925/turjaf.v6i6.642-651.1415.
- Rayanatou IA. 2017. Étude de la coagulation du lait par l'extrait de feuilles de *Calotropis procera* en réponse au contexte laitier dans la région de Maradi, au Niger. [Thèse de doctorat]. Bretagne : Université Bretagne Loire Agro Campus Ouest.
- Roseiro LB, Barbosa M, Ames JM, Wilbey RA. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*. 56(2):76-85.
- Saroumi Y, Kpenavoun S.. 2014. Valorisation du lait de vache par les femmes Peulhs au Benin: analyse de l'efficacité des systèmes de transformation agro-alimentaire du lait local en fromage. Poster presented at the ILRI-CTA African Dairy Value Chain Seminar, Nairobi, Kenya, September 21.
- Sessou P, Farougou S, Azokpota P, Youssao I, Yèhouenou B, Ahounou S, Sohounhloùé DCK. 2013a. Endogenous methods for preservation of Wagashi, a Beninese traditional cheese. *African Journal of Agricultural Research*. 8 :4254-4261. doi : 10.5897/AJAR2013.6908.
- Uzeh RE, Ohenhen RE, Rojgubokan AK. 2006. Microbiological and nutritional qualities of dairy products: nono and wara. *Nature Science*. 4(3):37-40.
- Vaccher V, Ingenbleek L, Adegboye A, Hossoud ES, Konée AZ, Oyedele AD, Kisito CSKJ, Dembélég YK, Huh R, Malaka IA, et al. 2020. Levels of persistent organic pollutants (POPs) in foods from the first regional Sub-Saharan Africa total diet study. *Environment International*. 135: 105413. doi:10.1016/j.envint.2019.105413.
- Youssao AKI, Dahouda M, Attakpa EY, Koutinhoun GB, Ahounou GS, Toleba SS, Balogoun BS. 2013. Diversité des systèmes d'élevages de bovins de race bovine Borgou dans la zone soudanienne du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 7(1): 125-146.z.

ETUDE 2 :

Caractéristiques

nutritionnelles et risques

chimiques associés au

Wagashi Gassirè vendus

dans les marchés du sud du

Bénin

Publiée dans Dairy (2024). 5(2) :271-286.

doi :10.3390/dairy5020022.

Nutritional Composition and Chemical Safety of Wagashi Gassirè Cheese Sold in the Southern Benin Markets

Alphonse Wanignon Dossou^{1,2,3,*}, Baké Marie Thérèse Seko Orou⁴, Gwladys Komagbe⁵, Philippe Sessou⁵, Abdou Karim Issaka Youssao⁶, Souaïbou Farougou⁵, Joseph Djidjoho Hounhouigan³, Jacques Mahillon⁷, Roch Mongbo⁴, Marc Poncelet⁸, Samiha Boutaleb¹, Sylvie Gobert⁹, Yann Eméric Madode³, Paulin Azokpota³, Antoine Clinquart², Marie-Louise Scippo¹ and Caroline Douny¹

¹*FARAH/Laboratory of Food Analysis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Quartier Vallée 2, Avenue de Cureghem 10 (B43b), 4000, Liège, Belgium; sboutaleb@uliege.be (S.B.); mlscippo@uliege.be (M.-L.S.); cdouny@uliege.be (C.D.)*

²*FARAH/Laboratory of Food Technology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Quartier Vallée 2, Avenue de Cureghem 10 (B42), 4000, Liège, Belgium; antoine.clinquart@uliege.be*

³*Laboratory of Food Sciences and Technology, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, 03 BP 2819, Abomey-Calavi, Benin; joseph.hounhouigan@gmail.com (J.D.H.); yann.madode@gmail.com (Y.E.M.); azokpotap@yahoo.fr (P.A.)*

⁴*Laboratory of Analysis of Social Dynamics and Development Studies, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, 03 BP 2819, Abomey-Calavi, Benin; sekomarie898@gmail.com (B.M.T.S.O.); rochl_mongbo@yahoo.fr (R.M.)*

⁵*Research Unit on Communicable Diseases, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009, Abomey-Calavi, Benin; gkomagbe@yahoo.fr (G.K.); sessouphilippe@yahoo.fr (P.S.); s.farougou@yahoo.com (S.F.)*

⁶*Laboratory of Animal Biotechnology and Meat Technology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009, Abomey-Calavi, Benin; iyoussao@yahoo.fr*

⁷*Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Faculty of Bioscience Engineering, Catholic University of Louvain, Building Mendel - Floor -1 - Croix du Sud, 2 / L7.05.01, B-1348, Louvain-la-Neuve, Belgium; jacques.mahillon@uclouvain.be*

⁸*Observing Recomposing Worlds, Faculty of Social Sciences, University of Liège, Quartier Agora, Place des Orateurs 3 (B31), 4000, Liège, Belgium; marc.poncelet@uliege.be*

⁹*Laboratoire d'Océanologie, Centre MARE, Université de Liège, Sart Tilman, B6c, 4000 Liège, Belgium; sylvie.gobert@uliege.be*

**Correspondence: dossoual6@gmail.com; Tel.: +229 66963212*

Abstract: In this study, the nutritional composition and the chemical safety of Wagashi Gassirè (WG) cheese sold in southern Benin markets were assessed. For this purpose, 15 WG were analysed for fatty acids, essential minerals, and chemical hazards (dioxins, aflatoxin M1 (AFM1), biogenic amines, metals, antibiotic and pesticide residues). The risks related to arsenic, lead, aluminium, AFM1, histamine, and tyramine were calculated using the methods recommended by the European Food Safety Authority. Oleic, palmitic and stearic acids, calcium, and phosphorus were the main fatty acids and minerals detected. Lead (0.08 ± 0.06 mg/kg) and AFM1 (0.3 ± 0.0 µg/kg) were detected in all samples and exceeded the maximum level set by the international standard. Cadaverine and tyramine were the main biogenic amines found. No pesticide residues were detected using a multi-residue method targeting compounds. Residues of quinolones, tetracyclines, and colistin antibiotics were also detected. The calculated chronic exposure indicated no public health concern for the chemical contaminants targeted. Moreover, the average cancer risk related to AFM1 intake was 3×10^{-4} cases/10⁵ persons/year for the Benin population through WG consumption. This study contributes to the nutritional characterization of WG and identifies lead and AFM1 as the most relevant chemical hazards of this product.

Keywords: West Africa; dairy products; Wagashi Gassirè cheese; nutritional properties; chemical contaminants; human risk assessment

1. Introduction

World cheese production is projected to grow at 1.2% over the next decade (2020–2029) (OECD/FAO, 2020). The United States is the world's largest producer of cheese, followed by Germany, France, and Italy. Europe is the largest producing region followed by America and Asia (OECD/FAO, 2023). In Africa, Egypt, South Africa, South Sudan, Tanzania, Zambia, and Ethiopia are the countries with the largest volume of cheese production, while Niger and Nigeria are the largest producers in West Africa (Nyamakwere et al., 2021). The most widespread and consumed local cheese in Nigeria is Wagashi Gassirè (WG), which is produced by the Peuhl sociocultural group (Mattiello et al., 2018). The traditional technology of WG was developed in Benin before spreading to Nigeria, Togo, Burkina Faso, and Niger (Dossou et al., 2006).

WG is a soft, non-ripened cheese whose processing is based on the hot coagulation (65 to 70 °C) of fresh, whole cow's milk induced by *Calotropis procera* (commonly known as the apple of Sodom) extract that contains an enzyme known as calotropain (Dossou et al., 2006; Baba-Moussa et al., 2007; Mattiello et al., 2018). To obtain the extract, crushed leaves and stems are triturated in a separate small quantity of milk or water. The resulting suspension is filtered, and the filtrate is added to the heated milk for coagulation. The milk becomes solid after 25–30 min. The resulting coagulum is cooked at 90 °C for 30 min, moulded, and drained to obtain a white, soft, non-salted, and non-ripened cheese. The obtained white WG is sometimes stained to obtain red WG using various dyes, such as cobs and panicles from sorghum and teak (*Tectona grandis*) leaves (Dossou et al., 2022). WG is produced throughout

Benin, and the departments of Borgou-Alibori, Zou-Collines, Mono-Couffo, and Atocora-Donga are the main production areas (Kora, 2005; MAEP, 2014). However, WG markets are located in urban areas (Abomey-Calavi, Cotonou, Parakou, Bohicon) where there is high demand (MAEP, 2014).

WG is an important source of protein (23%), fat (18%), and minerals (1.3–1.8%) (Appiah et al., 1998; Uzeh et al., 2006). Its consumption could help the population to meet the adult recommended daily intakes of, for example, 0.83 g protein/kg body weight (bw), 1000 mg calcium, and 11 mg iron (EFSA, 2019). Currently, the available data are related to the pH and proximal composition (dry matter, titratable acidity, fat, ash, and total sugars) of WG produced in Benin (Kora, 2005; Aïssi et al., 2009). To date, and to our knowledge, no data are yet available on the nutritional values such as the essential mineral and fatty acid contents of WG produced in Benin.

The production and marketing conditions of WG in Benin are potential sources of chemical contamination (Dossou et al., 2022). The most relevant dairy product contaminants include natural toxins, polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxins, and metals such as aluminium, arsenic, cadmium, lead, or mercury. Moreover, microbiological contamination of dairy products could result in the formation of biogenic amines, produced from free amino acids subjected to decarboxylase enzymes coming from spoilage bacteria. Food intoxication due to biogenic amines is mostly related to the presence of histamine, tyramine, and cadaverine (EFSA, 2011). High histamine intake is associated with vomiting and diarrhoea, headache, hypotension, heart palpitations, asthma attacks, urticaria, and other rashes typical of allergies (Marissiaux et al., 2018). Typical signs of tyramine intoxication are migraine, headaches, and increased blood pressure (Schirone et al., 2012). Among metals, aluminium is a neurotoxic agent that could increase the probability of developing Alzheimer's disease (EFSA, 2008). Lead is well known to have detrimental effects on human health, including effects on the nervous, renal, cardiovascular, reproductive, immune, and hematologic systems. In children, lead is associated with poor child neurodevelopment (Bodeau-Livinec et al., 2016). Lead exposure from piped water and the consumption of animals killed by ammunition has been shown to present a public health concern in Benin, as the blood lead levels of pregnant women and children were shown to be above the 50 µg/L threshold set by the US Centers for Disease Control and Prevention (Guy et al., 2018; Ahmadi et al., 2020). Currently, few data are available on the chemical contaminants in WG produced in Benin. Some data are available regarding its aflatoxin M1 (AFM1) content (Aïssi et al., 2009; Sessou et al., 2013).

The main objective of this work is to determine the nutritional properties and chemical hazard contents of WG sold in the southern Benin markets and to assess potential chemical risks associated with its consumption. As WG is the most widespread and consumed local cheese in Benin, the data from this study will be useful for consumption recommendations and prevention programs for reducing and eliminating chemical hazards in WG.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

Fifteen samples of WG were purchased in Abomey-Calavi. The samples included the two forms of WG (white and red). Regarding the variety of WG processing methods, the selection retained WG (white and red) that was produced according to the method described by Dossou et al (2006), and this determination was based on the declaration made by the sellers. The WG samples were collected three days after production in three street markets: three red WG (RWG) in Godomey, six RWG in Dekougbe, and six white WG (WWG) in Calavi-Tokpa. All the collected samples of WG were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ before they were subjected to analysis to determine their pH, proximal and nutritional composition, and chemical hazard content. Description of sample preparation, conditions of instrumental analyses, and quality assurance of the analytical results are presented in the Supplementary Materials.

2.2. pH, Proximal and Nutritional Components Analysis

The pH was determined using a Knick pH meter 765 Calimatic (electrode Mettler-Toledo 406-M6-DXX-S7/25, Columbus, Ohio, USA). The moisture was determined by the difference in mass of the samples before and after freeze-drying for 48 h (Lyoquest, Telstar, Barcelona, Spain). The crude protein content was determined by the Kjeldahl method according to ISO 8968-1:2014 (ISO, 2014). The fat was extracted by the Folch method (Folch et al., 1957). After saponification and methylation, twenty-seven fatty acid methyl esters were analysed by gas chromatography (GC) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a CPSil88 fatty acid column ($100\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$; $0.2\text{ }\mu\text{m}$) (Varian, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to a PolarisQ ion trap mass spectrometer (MS) (Thermo Fisher Scientific, USA) (Douny et al., 2015). Thirty-one minerals were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Gobert et al., 2017) and classified into essential minerals (eleven) and metallic trace elements (twenty) (EFSA, 2019).

2.3. Chemical Contaminants Analysis

Dioxins and dioxin-like PCB compounds (hereafter referred to by the general term “dioxins”) were determined by DR-CALUX (Dioxin Responsive-Chemically Activated Luciferase Gene Expression) cell-based assay (Scippo et al., 2004). AFM1 was determined by the ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method using the RIDASCREEN kit of R-Biopharm (Darmstadt, Germany). UPLC-FLD (Ultra-Performance Liquid Chromatography combined with Fluorescence Detection) was used to quantify ten biogenic amines in WG samples (Douny et al., 2019). The antibiotic residues were screened by BeadyPlex using kit187 from Unisensor (Seraing, Belgium). The BeadyPlex is a flow-cytometry-based method able to detect 80 residues belonging to 10 antibiotic families. Two multi-residue chromatographic methods were used to analyse 103 pesticide residues in the WG samples: gas chromatography coupled to an electron capture detector (GC/ECD, limit of quantification (LOQ): 0.01

mg/kg wet weight) for chlorpyrifos, endosulfan, and the remaining organochlorines (19 residues), and liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry detection (LC-MS/MS, LOQ: 0.001 mg/kg wet weight) for other components (84 residues) (Gouda et al., 2019).

2.4. Exposure and Risk Assessment

To calculate the exposure, the WG consumption and body weight data used were those described by Ingenbleek et al (2017). This study determined the average daily consumption and the 95th percentile (i.e., “high-level consumption”) of the Beninese population, as well as the average daily consumption of fresh/fermented milk, concentrated/dehydrated milk, and other dairy products in the departments of Littoral in the south and Borgou in the north of Benin. As WG is the main local dairy product consumed in Benin, the WG consumption data used in this study correspond to the “other dairy products” consumption. The mean and P95 consumption for the whole of Benin were 2.4 and 47.4 g per adult of 60 kg bw per day, while the mean consumption for Littoral and Borgou were 1.8 and 8.2 g per adult of 60 kg bw per day (Ingenbleek et al., 2017). A deterministic approach was used to calculate the dietary intake of chemical contaminants. In this approach, the exposure was obtained by multiplying the WG consumption by the WG contamination expressed as the lower bound of the mean chemical contaminant content of the 15 WG (the lower bound of the mean for the 15 samples was calculated by replacing 0 with the results “<LOQ”).

The exposure and the risk were assessed for some biogenic amines (histamine and tyramine), some metals (aluminium, lead, and arsenic), and for AFM1. For carcinogenic and genotoxic substances such as lead, arsenic, and AFM1, the Margin of Exposure (MOE) approach was used, as recommended by the European Food Safety Authority (EFSA) (EFSA, 2005, 2017). The MOE is the ratio between a Benchmark Dose (BMD10 or BMDL10) and the level of exposure (EFSA, 2005, 2017). When using a BMDL based on human studies (which is the case for lead and arsenic), an MOE equal to 1 or above is considered to be of low public health concern (EFSA, 2005, 2017). For lead, the BMDL10 is 0.63 µg/kg.bw/day for nephrotoxicity in adults (EFSA, 2010). BMDL10 ranging from 0.3 to 8 µg/kg.bw/day should be used regarding the adverse effects (lung cancer, skin cancer, bladder cancer, skin lesions) of arsenic (EFSA, 2009).

When using a BMDL based on animal studies (which is the case for AFM1), an MOE of 10,000 or above is considered to be of low public health concern (EFSA, 2005, 2017).. AFM1 induces liver cancer with a potency one-tenth that of aflatoxin B1 (for AFB1, BMDL10 was 0.4 µg/kg.bw/day); therefore, a potency factor of 0.1 for the AFM1 risk assessment was used in this study (EFSA, 2020). In addition to the qualitative MOE approach used for AFM1, the quantitative approach to liver cancer risk estimation proposed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) was also used (FAO/WHO, 2018). In this approach, the population cancer risk (cancers per year per 100,000 population) was obtained using the following equation (FAO/WHO, 2018):

$$\text{Cancer risk} = [\text{PHBV}^+ \times (\text{AF exposure}) \times \text{HBV}^+] + [\text{PHBV}^- \times (\text{AF exposure}) \times (1 - \text{HBV}^+)]$$

where PHBV⁺ is the potency estimate P for the HBV⁺ fraction of the population (mean of 0.269 cancers per 100,000 person-years per ng aflatoxin/kg bw per day for HBsAg-positive), PHBV⁻ is the potency estimate P for the HBV⁻ fraction of the population (mean of 0.017 cancers per 100,000 person-years per ng aflatoxin/kg bw per day for HBsAg-negative), HBV⁺ is the population fraction of chronic HBV cases (6% in Benin adult population) (Kpoussou et al., 2020), and AF exposure is the AFM1 exposure.

For substances without genotoxic properties (histamine, tyramine, and aluminium) the exposure was compared either to a TWI (tolerable weekly intake) for aluminium or to a NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) for histamine and tyramine. The TWI was 1000 µg/kg.bw/week for neurotoxicity and embryotoxicity of aluminium (EFSA, 2008) while the NOAELs were 50 mg for histamine and 600 mg for tyramine per meal for a healthy person (EFSA, 2011).

2.5. Statistical Analysis

MS Excel 2013 was used for recording the data, and the descriptive analysis was performed using the SAS System 9.4 software. For nutritional parameters, Student's *t*-test was performed to compare the means of RWG and WWG. Means were calculated considering the samples for which the analysed nutritional parameter was detected. For chemical hazards, the lower bound means were calculated and used for Student's *t*-test. The statistical significance was set at 5%.

3. Results

3.1. pH, Proximal and Nutritional Composition of Commercial Wagashi Gassirè

Figures 1 and 2 present the pH and the proximal composition of WG. The average pH was 5.4 ± 0.3 , and the moisture, protein, and fat contents (per wet weight) were $59.1 \pm 2.9\%$, $13.5 \pm 1.2\%$, and $21.0 \pm 2.3\%$, respectively. The pH of RWG (5.6 ± 0.2) was significantly higher ($p < 0.01$) than that of WWG (5.1 ± 0.1) (Figure 1), while the proximal composition was similar in RWG and WWG (Figure 2). The data regarding the pH, moisture, fat, and protein contents of the 15 WG samples are presented in Table S1.

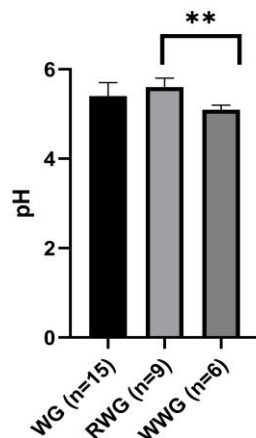


Figure 1. pH of Wagashi Gassirè sold in southern Benin markets. RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, WG: Wagashi Gassirè, n: number of samples, **: $p < 0.01$.

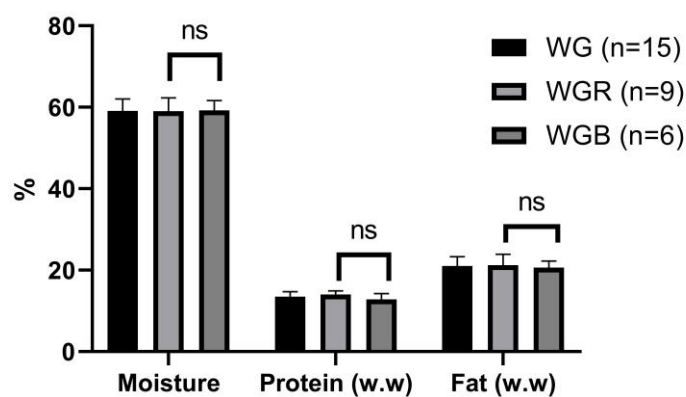


Figure 2. Moisture, protein, and fat content of Wagashi Gassirè sold in southern Benin markets. RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, WG: Wagashi Gassirè, w.w: wet weight, n: number of samples, ns (non-significant): $p > 0.05$.

The fatty acid content of the 15 WG is shown in Table S2. From the twenty-seven fatty acids subjected to the analysis, seven were found in all samples (lauric, myristic, palmitic, stearic, palmitoleic, oleic, and linoleic acids), capric acid was detected in 13 samples, and tetracosanoic and cis-10-heptadecenoic acids were detected in 4 and 3 samples, respectively (Table 1). Saturated (SFA), mono (MUFA), and polyunsaturated (PUFA) fatty acids represented 62.3 ± 3.3 , 35.1 ± 3.4 , and $2.5 \pm 0.3\%$ of the total fatty acids, respectively. Palmitic, stearic, and oleic acids were the most important fatty acids, with proportions of 31.7 ± 2.0 , 17.9 ± 1.3 , and $31.9 \pm 3.4\%$ of total fatty acids, respectively. Among the two essential fatty acids, i.e., linoleic acid (LA) and alpha linolenic acid (ALA), only LA was detected with a proportion of $2.5 \pm 0.3\%$. No significant difference was observed between fatty acid proportions in RWG and WWG.

Table 1. Fatty acid composition of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets (g/100 g total fatty acids).

Fatty Acids	WG (n = 15)	RWG (n = 9)		WWG (n = 6)	
	Mean ± SD	Mean ± SD	N1	Mean ± SD	N2
C10:0	2.3±0.5	2.3±0.4	8	2.4±0.7	5
C12:0	1.9±0.3	1.8±0.2	9	2.0±0.4	6
C14:0	8.4±0.7	8.2±0.7	9	8.7±0.6	6
C16:0	31.7±2.0	31.4±2.2	9	32.1±1.7	6
C18:0	17.9±1.3	17.6±1.2	9	18.4±1.4	6
C24:0	0.9±0.1	0.9±0.2	3	1.0*	1
C16:1	2.1±0.9	2.4±1.0	9	1.6±0.5	6
C17:1	5.4±7.8	5.4±7.8	3	<LOQ	0
C18:1,9c	31.9±3.4	31.7±3.8	9	32.1±3.0	6
C18:2,9c,12c	2.5±0.3	2.5±0.3	9	2.4±0.1	6
ΣSFA	62.3±3.3	61.4±3.6	-	63.7±2.5	-
ΣMUFA	35.1±3.4	35.9±3.8	-	33.8±2.5	-
ΣPUFA	2.5±0.3	2.5±0.3	-	2.4±0.1	-

Capric acid: C10:0, Lauric acid: C12:0, Myristic acid: C14:0, Palmitic acid: C16:0, Stearic acid: C18:0, Lignoceric acid: C24:0, Palmitoleic acid: C16:1, cis-10-heptadecenoic acid: C17:1, Oleic acid: C18:1,9c, Linoleic acid: C18:2,9c,12c (n-6), SFA: Saturated Fatty Acids, MUFA: Monounsaturated Fatty Acids, PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids, RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, WG: Wagashi Gassirè, LOQ = 0.1 g/100g g total fatty acids, N1 and N2: number of samples in which the fatty acid was detected and quantified in RWG and WWG respectively, n: number of analysed samples, SD: standard deviation, * individual value.

All the essential minerals analysed (sodium, magnesium, phosphorus, potassium, calcium, iron, manganese, copper, zinc, selenium, and molybdenum) were detected in WG samples (Table 2), although selenium was detected in only one sample out of 15 (in an RWG sample). The main minerals were calcium (2152 ± 1122 mg/kg) and phosphorus (1913 ± 577 mg/kg). Concentrations of sodium, magnesium, phosphorus, potassium, and calcium were significantly higher in WWG compared to RWG (Table S3).

Table 2. Essential mineral composition of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets (mg/kg wet weight).

Essential Minerals		WG (n = 15)	RWG (n = 9)	WWG (n = 6)		
		mean \pm SD	mean \pm SD	N1	mean \pm SD	N2
Sodium	Na	53 \pm 46	35 \pm 11 ^a	9	81 \pm 64 ^b	6
Magnesium	Mg	81 \pm 58	48 \pm 16 ^a	9	131 \pm 65 ^b	6
Phosphorus	P	1913 \pm 577	1601 \pm 389 ^a	9	2381 \pm 503 ^b	6
Potassium	K	62 \pm 81	17 \pm 9 ^a	9	129 \pm 98 ^b	6
Calcium	Ca	2152 \pm 1122	1526 \pm 680 ^a	9	3092 \pm 1010 ^b	6
Iron	Fe	4.9 \pm 2.6	5.4 \pm 2.2	9	4.3 \pm 3.4	6
Manganese	Mn	0.5 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3	9	0.3 \pm 0.1	6
Copper	Cu	0.7 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	9	0.7 \pm 0.2	5
Zinc	Zn	20 \pm 3	21 \pm 4	9	19 \pm 3	6
Selenium	Se	0.1*	0.1*	1	<LOQ	0
Molybdenum	Mo	0.020 \pm 0.008	0.021 \pm 0.008	9	0.022 \pm 0.009	6

RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, WG: Wagashi Gassirè, different superscript letters in the same row indicate a significant difference ($p < 0.05$) between RWG and WWG, LOQ (see Table S3), N1 and N2:: number of samples in which the mineral was detected and quantified in RWG and WWG respectively, n: number of analysed samples, SD: standard deviation, * individual value.

3.2. Chemical Contaminants Found in Commercial Wagashi Gassirè

Among the twenty metallic trace elements analysed (Table S4), fourteen were detected, including lithium, aluminium, chromium, nickel, arsenic, rubidium, strontium, tin, barium, thallium, lead, bismuth, uranium, and vanadium (Table 3), in generally very low concentrations (below 1 mg/kg, except for aluminium, strontium, and barium). Significant differences were found for some metallic trace elements. The lead and rubidium contents were significantly higher in WWG (0.12 ± 0.08 and 0.58 ± 0.52 mg/kg, respectively) than in RWG (0.06 ± 0.03 and 0.05 ± 0.01 mg/kg, respectively). The vanadium content was significantly lower in WWG (0.004 ± 0.005 mg/kg) than in RWG (0.041 ± 0.021 mg/kg) (Table 3). Aluminium was detected in 8/9 RWG samples and in only one WWG sample. Aluminium concentrations varied a lot between RWG samples, ranging from not-detected to 573 mg/kg (Table S4).

Table 3. Metallic trace element composition of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets (mg/kg wet weight).

Metallic Trace Elements		WG (n = 15)		RWG (n = 9)		WWG (n = 6)	
		LB Mean ± SD	LB Mean ± SD	N1	LB Mean ± SD	N2	
Lithium	Li	0.009*	<LOQ	0	0.009*	1	
Aluminium	Al	74.6±150.4	123.4±181.4	8	7.8*	1	
Chromium	Cr	0.01±0.02	0.02±0.02	6	0.01±0.01	4	
Nickel	Ni	0.004±0.013	0.02*	1	0.04 *	1	
Arsenic	As	0.022±0.008	0.020±0.009	8	0.025±0.007	6	
Rubidium	Rb	0.26±0.41	0.05±0.01 ^a	9	0.58±0.52 ^b	6	
Strontium	Sr	2.5±1.2	2.5±1.6	9	2.4±0.5	6	
Tin	Sn	0.007±0.018	0.055*	1	0.051*	1	
Barium	Ba	2.3±1.3	2.4±1.7	9	2.0±0.4	6	
Thallium	Tl	0.00019±0.00035	0.00027±0.00041	4	0.00050*	1	
Lead	Pb	0.08±0.06	0.06±0.03 ^a	9	0.12±0.08 ^b	6	
Bismuth	Bi	0.003*	0.003*	1	<LOQ	0	
Uranium	U	0.005±0.005	0.007±0.004	9	0.003±0.005	5	
Vanadium	V	0.026±0.024	0.041±0.021 ^a	9	0.004±0.005 ^b	3	

*RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, WG: Wagashi Gassirè, different superscript letters in the same row indicate a significant difference ($p < 0.05$) between RWG and WWG, LOQ (see Table S4), N1 and N2: number of samples in which the mineral was detected and quantified in RWG and WWG respectively, n: number of analysed samples, SD: standard deviation, LB: Lower Bound, * individual value.*

Mean levels of dioxins (pg/g fat), AFM1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ wet weight), and biogenic amines found in WG are presented in Table 4, while individual data for the 15 samples of WG are shown in Tables S5–S7. Dioxins were not detected in six WG samples, including four RWG and two WWG, and ranged, in contaminated samples, from 1.2 to 4.3 pg/g fat (Table S5) with a lower bound mean of 1.5 ± 1.5 pg/g fat (Table 4). AFM1 was detected in all WG samples, with a minimum and maximum content of 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Table S6), respectively, and a lower bound mean of 0.3 ± 0.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Table 4). AFM1 concentration was significantly higher in WWG than in RWG samples.

Table 4. Dioxins and PCBs, aflatoxin M1, and biogenic amine contents of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets.

Chemical Contaminants		WG (n = 15)	RWG (n = 9)	WWG (n = 6)		
		LB Mean±SD	LB Mean±SD	N1	LB Mean±SD	N2
Dioxins and PCBs (pg BEQ/g fat)		1.5±1.5	1.0±0.8	5	1.3±1.3	4
Aflatoxin M1 (µg/kg wet weight)		0.3±0.0	0.1±0.0 ^a	9	0.2±0.1 ^b	6
Biogenic amines (mg/kg wet weight)	2-phenylethylamine	0.4±0.8	0.7±1.0	3	<LOQ	0
	Putrescine	10.0±13.0	15.5±14.2 ^a	6	1.8±3.7 ^b	2
	Cadaverine	19.1±35.1	30.1±42.6	6	2.7±4.6	3
	Histamine	10.5±18.1	15.7±21.7	4	17.1*	1
	Tyramine	13.9±18.5	20.1±21.9	7	4.7±4.7	4
	Spermidine	0.4±0.6	0.3±0.6	3	0.5±0.8	2

*RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, WG: Wagashi Gassirè, BEQ: bioanalytical equivalent, different superscripts in the same row indicate significant difference ($p < 0.05$) between RWG and WWG, LOQ (Dioxins and PCBs): 0.9 pg BEQ/g fat, LOQ (aflatoxin M1): 0.1 µg/kg wet weight, LOQ (biogenic amines): 0.4 mg/kg mg/kg wet weight, N1 and N2: number of samples in which the chemical hazard was detected and quantified in RWG and WWG respectively, n: number of analysed samples, SD: standard deviation, LB: Lower Bound, * individual value.*

Among the 10 biogenic amines determined, methylamine, tryptamine, serotonin, and spermine were not detected in WG samples (Table S7). Putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, and spermidine were detected in both WWG and RWG samples (but not in all samples), while 2-phenylethylamine was detected in RWG only (Table 4). Moreover, no significant difference was observed among the two types of WG regarding the biogenic amine content except for putrescine, for which higher concentrations appeared in RWG than in WWG samples (15.5 ± 14.2 versus 1.8 ± 3.7 mg/kg), but it was detected in only two WWG samples. The main biogenic amines detected in WG samples were cadaverine (19.1 ± 35.1 mg/kg) and tyramine (13.9 ± 18.5 mg/kg). The mean histamine content was 10.5 ± 18.1 mg/kg (Table 4). The total biogenic amine content of WG samples ranged from 1 to 231 mg/kg (Table S7).

For antibiotic residues, six WG samples tested positive using the BeadyPlex (Unisensor, Seraing, Belgium) (Table S8). The BeadyPlex screening test showed that the detected antibiotic residues belonged to the families of quinolones, tetracyclines, and colistin. Quinolone and tetracycline residues were found in RWG samples while colistin was found in WWG samples.

One hundred and three pesticide residues were screened (Table S9). No pesticide residues were detected by the two methods used (LC/MSMS and GC/ECD).

3.3. Risk Assessment for Trace Elements, Biogenic Amines, and Aflatoxin M1 in Commercial Wagashi Gassirè

Dietary exposure to aluminium, lead, arsenic, and AFM1 from WG consumption in various scenarios (mean/Benin, P95/Benin, Littoral, and Borgou) and the corresponding associated risks are shown in Table 5. For all chemical hazards, the exposure in Borgou was higher than in Littoral. The dietary exposure to aluminium for high-level consumers (P95) represented 41% of the tolerable weekly intake (TWI) of 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{week}$. For the other population groups, the aluminium intake did not exceed 7% of the TWI, showing no health concern regarding aluminium exposure through WG consumption (Table 5).

Table 5. Aluminium, lead, arsenic, and aflatoxin M1 intake and associated risks.

Contaminants	Exposure * and MOE	Mean/Benin	P95/Benin	Littoral	Borgou
Aluminium	Weekly Intake ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{week}$)	20	412	15	71
	% TWI	2	41	1	7
Lead	Daily Intake ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)	0.003	0.069	0.002	0.011
	MOE (BMDL = 0.63 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)	179	9	239	53
Arsenic	Daily Intake ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)	0.0009	0.0178	0.0006	0.0030
	MOE (BMDL = 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)	333	17	443	97
Aflatoxin M1	Daily Intake ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)	0.000010	0.000199	0.000007	0.000034
	MOE (BMDL = 4 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)	395,826	20,042	527,768	115,852
Histamine	Daily Intake (mg/adult/day)	0.02	0.5	0.01	0.08
Tyramine	Daily Intake (mg/adult/day)	0.03	0.6	0.02	0.1

*MOE: Margin of Exposure, TWI (aluminium): Tolerable Weekly Intake of 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{week}$ (EFSA, 2008); BMDL (arsenic) = 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$ for adverse effects (lung cancer, skin cancer, bladder cancer, skin lesions) of arsenic in adults (EFSA, 2009); BMDL (lead) = 0.63 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$ for nephrotoxicity of lead in adults (EFSA, 2010), BMDL (aflatoxin M1) = 4 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$ for liver carcinogenicity of aflatoxin M1 in animals (obtained with the BMDL of 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$ for AFB1 and the potency factor of 0.1) (EFSA, 2020), * exposure calculated using lower bound mean of chemical contaminant.*

For lead and arsenic, the estimated dietary exposures were below the BMDL values, with the MOEs ranging from 17 to 443 and from 9 to 239, respectively. These MOEs above 1 indicate an absence of concern regarding the lead and arsenic exposure of the Beninese population through WG consumption (Table 5). This conclusion is the same for AFM1 exposure, as the obtained MOE ranged from 20,042 to 527,768, far above 10,000 (Table 5). Moreover, the calculated cancer risks were 0.0003, 0.006, 0.0002, and 0.001 cases/100,000 persons/year, respectively, for mean, P95, Littoral, and Borgou WG consumers.

The lower bound mean of histamine and tyramine in WG were 10.5 and 13.9 mg/kg wet weight, respectively, corresponding to an exposure ranging from 0.01 to 0.5 and 0.02 to 0.6 mg/adult/day, respectively. These intakes are far lower than the NOAEL of 50 mg of histamine and 600 mg of tyramine per meal for a healthy person. Thus, exposure to histamine and tyramine through WG consumption is of low health concern.

4. Discussion

4.1. Physicochemical Parameters and Proximal Composition of Wagashi Gassirè

pH is the first physicochemical parameter used to assess product quality. The average pH (5.4) of WG samples of this study was found to be lower compared to the literature, which reported an average pH of 6.2 to 6.8 (Aïssi et al., 2009; Benyahia-Krid et al., 2016). These reported pHs were close to the pH of the milk. Indeed, the pH of cow milk is about 6.5 (Dossou et al., 2016; Djibril et al., 2019).. As WG is non-salted and non-ripened cheese sold unpacked, the lower pH reported in this study could indicate fermentative activity related to the development of the microflora naturally present in the milk before processing or to post-production contamination during storage, transport, and marketing (Gram et al., 2002). This fermentative activity would be more important with time, as the WG samples of this study were analysed three days after production. The growth and activity of spoilage microflora are mostly a function of substrate base and chemical and physical parameters such as temperature, pH, water activity, and atmosphere (Gram et al., 2002). Abomey-Calavi is characterized by a sub-equatorial climate with an average temperature between 27 and 29 °C and rainfall ranging from 1100 to 1300 mm/year. In this city, most of the markets are spaces where food products, often unpacked such as WG, are exposed to ambient air. In such hot and humid environments, unpacked foodstuffs, like WG, with high water content (59.1% in the case of WG samples) may be subjected to the rapid growth of microflora. This growth may be more rapid in WWG than RWG, as the pH of WWG was significantly lower than that of RWG. Based on the declarations made by the WG sellers in this study, RWG was obtained by boiling WWG in the coloured water obtained by soaking and triturating sorghum cobs (Dossou et al., 2006). This hot colouring would destroy some lactic bacteria, as they are generally sensitive to high temperatures; this would explain the lower pH of WWG compared to RWG (Gram et al., 2002).

In Nigeria, protein content of 23% and fat content of 18% have been reported for WG (Uzeh et al., 2006). The concentration of protein (13.5%) in the WG samples in this study was lower than expected. However, lower fat content (6–11%) was reported in comparison to the fat content (21.0%) of the WG of this study (Adeyeye, 2017). These contradictory data are related to the moisture content of WG samples from the studies mentioned. WG production involves the use of calotropain, a protease for milk coagulation (Baba-Moussa et al., 2007). This enzymatic coagulation is the step where the casein component of the milk protein system forms a gel network that entraps fat. Thus, the protein and fat contents of the cheese depend on the milk used and the coagulation process. Fat and protein contents in

milk from Girolando, Borgou, Borgou-Gir, and Lagunaire cattle breeds raised in Benin were 3.8 and 3% respectively (Dossou et al., 2016; Djibril et al., 2019). During the processing of the milk into WG, the cheese yield varied from 20 to 33% (Dossou et al., 2006, 2022). This would correspond to 8–12% of protein and 12–18% of fat in WG, based on the cows' milk composition, the common WG yield, and assuming that 75% of the total protein and 95% of the total fat in milk were recovered in rennet-coagulated cheeses (Fox and McSweeney, 2017). These expected protein and fat concentrations are lower than the WG samples analysed in this study (13.5% of proteins and 21.5% of fat). This could be due to the fact that the milk used by the WG processors would contain more protein and fat than the values reported in the literature.

4.2. Nutritional Values of Wagashi Gassirè

Fat content is essential in cheese for a wide range of functional properties. The fat content and the fatty acid profile of cheeses were directly related to those of the milk used (Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2013). Cow milk fatty acids include saturated (SFA), monounsaturated (MUFA), and polyunsaturated fatty acids (PUFA), which represent about 69, 27, and 4% of the total fat, respectively (Pereira, 2014). Cow milk has also a high content of palmitic, stearic, and oleic acids, and within SFA, the major ones are palmitic (30%), myristic (11%), and stearic (12%) acids (Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2013; Pereira, 2014). These fatty acid profiles of cow milk fat are similar to those found in this study for the WG. Milk, cheese, and other dairy products suffer from an adverse nutritional image largely due to a perceived association of some SFA, particularly lauric, myristic, and palmitic acids, with an increase in cardiovascular risk, obesity, and some cancers (Haug et al., 2007; González-Martín et al., 2020). However, up-to-date research does not support an association between biomarkers of dairy fat intake and the risk of diabetes mellitus or cardiovascular diseases. Furthermore, the observational evidence does not endorse the hypothesis that high-fat dairy foods contribute to metabolic syndrome or cardiovascular risk and even indicate that dairy fat consumption within typical dietary patterns is inversely associated with this risk (González-Martín et al., 2020). For high consumers of dairy products (P95/Benin) (Ingenbleek et al., 2017), the daily consumption of WG would correspond to an intake of 6.2 g SFA/day based on the levels of SFA in the WG samples of the present study. SFA daily intake is recommended to be as low as possible (EFSA, 2019). Unlike SFA, PUFA has attracted increasing attention regarding its health-promoting biological properties (González-Martín et al., 2020). Due to a lack of appropriate enzymes, mammals may not synthesize *de novo* two PUFAs: α -linolenic acid and linoleic acid, which are considered essential fatty acids. These fatty acids play multiple roles (cell membrane structure, cell signalling, etc.) (Haug et al., 2007; Pereira, 2014). Only linoleic acid was found in the WG samples in this study, in an average proportion of 2.5% of total fatty acids. Daily consumption of WG (P95/Benin) of 47.4 g (according to Ingenbleek et al., 2017) represents 1.6% of the adequate daily intake of linoleic acid (4% of energy intake, i.e., 14.8 g) set for very active male adults (18–29 years) according to EFSA (2019).

A large portion of worldwide milk production is used to make cheese, which contains a wide range of mineral elements. The mineral composition of cheeses is mainly associated with raw milk and the conditions of milk coagulation (Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2013; González-Martín et al., 2020). Calcium and phosphorus are the minerals present in the highest concentration in dairy products such as the WG (Pereira, 2014). In human nutrition, adequate calcium and phosphorus intake is essential. Obtaining enough calcium and phosphorus in the diet gives healthy bones and teeth, and calcium may also help prevent hypertension, decrease the odds of developing colon or breast cancer, improve weight control, and reduce the risk of developing kidney stones (Haug et al., 2007). The adequate daily intake of phosphorus is 550 mg/day for adults (≥ 18 years), and the population reference intake of calcium is 1000 mg/day for male adults (18–24 years) (EFSA, 2019). Daily consumption of WG would cover these recommendations at 16.4% for phosphorus and 10.2% for calcium for heavy consumers (Ingenbleek et al., 2017). Therefore, consumption of WG could increase the intake of calcium and phosphorus and thus contribute to the solution of deficiency of essential minerals. Significant differences were found between WWG and RWG regarding essential mineral (sodium, magnesium, phosphorus, potassium, and calcium) contents. Indeed, WWG was richer in minerals (essentials and metals) than RWG. Mineral losses were more than 50% for calcium, potassium, magnesium, sodium and rubidium, but less for phosphorus. These differences are linked to the colouring process. Boiling produced the highest loss of minerals, followed by heating with steam, stewing, and frying, due to the water solubility of minerals, which increases with the temperature (Barciela-Alonso and Bermejo-Barrera, 2015). Then the minerals leached from WWG into the coloured water during the colouring process. However, this conclusion needs to be confirmed by further studies that determine the mineral contents before and after colouring.

4.3. Risk Assessment

4.3.1. Risk Assessment of Arsenic and Lead in Wagashi Gassirè Cheese

Arsenic and lead are environmental contaminants that can be found in foodstuffs and that have carcinogenic and genotoxic properties (EFSA, 2009, 2010). As explained above, the collection point of WG samples of this study may be susceptible to environmental contamination. WG is sold unpacked, and dust could be a source of lead contamination because it deposits on WG during production and selling. Furthermore, the trace metal contamination may be related to the raw milk and materials used for WG production. In Benin, sources of lead exposure are varied; key risk factors for human exposure include water sources (piped water), hunting (animals killed with lead-contaminated bullets), food (fish, meat, rice), occupation, and soil (Guy et al., 2018; Ahmadi et al., 2020). The average lead contamination of WG observed in the present study was 0.08 mg/kg wet weight, exceeding the maximum level set by Beninese regulations (MAEP, 2007), the European Commission (EC, 2023), and the CODEX (FAO/WHO, 2019), i.e., 0.02 mg/kg in milk and dairy products. This lead content in WG samples was higher than that reported (0.002 mg/kg) by Jitaru et al (2019) in milk and dairy products from Borgou

and Littoral during their Sub-Saharan Africa Total Diet Study. Arsenic occurs naturally in the earth's crust, and it is a constituent of more than 200 mineral species, especially those including sulphide. Anthropogenic sources of arsenic release to the environment include industrial emissions, mainly from non-ferrous mining and smelting, metal-using industry, and the production of energy from fossil fuels (EFSA, 2009). The average arsenic content in WG samples (0.02 mg/kg wet weight) was lower than that found in milk and dairy products (0.003 mg/kg) in Benin (Jitaru et al., 2019). The lead content was significantly higher in WWG than in RWG, probably due to the colouring process as explained above for minerals (Barciela-Alonso and Bermejo-Barrera, 2015). Lead is well known to have detrimental effects on human health, including on the nervous, renal, cardiovascular, reproductive, immune, and hematologic systems. In children, lead is associated with poor child neurodevelopment (Bodeau-Livinec et al., 2016). The main adverse effects reported to be associated with long-term ingestion of inorganic arsenic in humans are skin lesions, cancer, developmental toxicity, neurotoxicity, cardiovascular diseases, abnormal glucose metabolism, and diabetes (EFSA, 2009). The calculated risk for lead and arsenic based on the nephrotoxicity of lead and the adverse effects of arsenic (lung cancer, skin cancer, bladder cancer, skin lesions) showed an MOE greater than 1 in all cases. These MOEs above 1 indicate an absence of concern regarding the lead and arsenic intake from WG consumption (EFSA, 2009, 2010). However, these estimates need to be extended to all dietary sources of lead and arsenic. Lead presents a public health concern in Benin. In Sô-Ava (Abomey-Calavi, Benin), 31.3% of blood lead levels of pregnant women were above the 50 µg/L threshold set by the US Centers for Disease Control and Prevention (Guy et al., 2018). In Allada (Benin), the prevalence of blood lead levels higher than the 50 µg/L threshold in children was 54.8% at 1 year of age and 59.5% at 6 years of age, showing an increase in lead exposition during life (Ahmadi et al., 2020). An increase in blood lead levels of 12 µg/L in the child may decrease the intelligence quotient score by one point (EFSA, 2010). Lead exposure continues to be a major public health concern as no level of lead exposure can be considered safe. Due to the chronic exposure of consumers and the potential long-term health effects of lead and arsenic exposure, a monitoring program should be designed to reduce their prevalence in foodstuffs.

4.3.2. Risk Assessment of Aluminium in Wagashi Gassirè Cheese

Aluminium has been extensively used in the industry, and it is currently added to a vast number of products available to everyone. However, food and water represent the most common forms of human exposure to this metal (Colomina and Peris-Sampedro, 2017). As with lead, aluminium content in WG samples (74.6 mg/kg wet weight) was found to be higher than that reported (0.37 and 0.09 mg/kg wet weight in Littoral and Borgou, respectively) by Jitaru et al (2019). In developing countries, inexpensive aluminium cookware made from mixed scrap metal, including engine and electronic appliance parts, cans, and other aluminium scraps, is widely used. Aluminium, lead, and other metals leach from cookware during cooking, increasing metal exposure through food consumption (EFSA, 2008, Jitaru et al., 2019). Jitaru et al (2019) compared concentrations of foods prepared in stainless steel and artisanal

cookware. Mean concentrations of aluminium and lead were 6.7 and 26 times higher, respectively, when tomatoes were cooked in artisanal aluminium cookware compared to stainless steel. In Benin, the production equipment of WG was generally rudimentary: sieves with iron filters, plastic colanders, aluminium cooking pots, and plastic material for storage before and during selling (Dossou et al., 2022). The use of aluminium cooking pots may explain the highest concentration found for aluminium and lead in the WG samples in this study. Ingenbleek et al (2020) reported mean aluminium dietary exposures of 457 and 2358 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{week}$, in Littoral and Borgou, respectively. In this study, aluminium exposures of 15 and 71 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{week}$ were found in Littoral and Borgou, respectively. The worst case showed an exposure of 412 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{week}$, representing 41% of the TWI of 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{week}$ (EFSA, 2008). This means an absence of concern about the aluminium intake from WG consumption. However, actions should be taken to reduce this exposure, as aluminium is considered to produce neurotoxicity and embryotoxicity, as well as to affect the male reproductive system. In addition, aluminium could increase the probability of developing Alzheimer's disease (Colomina and Peris-Sampedro, 2017).

4.3.3. Risk Assessment of Histamine and Tyramine in Wagashi Gassirè Cheese

Synthesis of biogenic amines is possible by the conjugation of several conditions: the availability of the substrate amino acids, the presence of microorganisms with the appropriate catabolic pathway activated, and environmental conditions favourable to the decarboxylation activity ((Linares et al., 2011, 2012). These conditions depend on several factors, such as the milk treatment, use of starter cultures, NaCl concentration, time, the temperature of ripening and preservation, pH, temperature, and post-ripening technological processes (Linares et al., 2012; Visciano et al., 2012). The main biogenic amines generally found in cheeses are putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, and tryptamine (EFSA, 2011). This pattern was observed in WG samples in this study as well, except for tryptamine. Spermidine is converted by microorganisms to spermine, and its concentration is generally lower than that of spermine (Linares et al., 2011). The non-detection of spermine in the WG samples indicates low microbial activity. Intake of low amounts of biogenic amines normally does not have harmful effects on human health. However, when the amount in food is too high and the detoxification ability is inhibited or disturbed, biogenic amines could cause adverse health effects (Doeun et al., 2017).. In some non-ripened cheeses, 82 to 477 mg of biogenic amines have been detected per kilogram of cheese (Doeun et al., 2017; Linares et al., 2011). In this study, the biogenic amine content of WG samples was between 1 and 231 mg/kg wet weight, similar to the values reported by the literature. According to the European Food Safety Authority, a threshold level of 50 mg/meal for histamine and 600 mg/meal for tyramine in healthy persons should be considered (EFSA, 2011). These established NOAEL are higher than the exposure levels calculated in this study, indicating an absence of concern about the histamine and tyramine intake from WG consumption.

4.3.4. Risk Assessment of Aflatoxin M1 in Wagashi Gassirè Cheese

The prevalence of AFM1 in WG samples is due to the contamination of feed eaten by lactating cows with AFB1 and its subsequent biotransformation into AFM1 excreted in the milk. Nearly 0.3–6.2% of the AFB1 ingested by lactating cows is converted into AFM1 in the milk, and the level of AFM1 is approximately 3–5 times greater in cheese than in the original milk due to the concentration effect of the coagulation process (Khaneghah et al., 2021). The AFM1 content of the milk used to produce the WG analysed in this study may range from 0.1 to 0.06 µg/kg wet weight, based on the lower bound mean AFM1 of the WG samples. This is lower than or just above the maximum level set by the Beninese regulations (MAEP, 2007) and the European Commission (EC, 2023), i.e., 0.05 µg/kg, and that of the CODEX (FAO/WHO, 2019), i.e., 0.5 µg/kg, in raw milk. A few reports have been published on AFM1 in milk (Dossou et al., 2016) and WG produced in The Republic of Benin (Aïssi et al., 2009; Sessou et al., 2013). The difference between the results reported by these authors (no detection of AFM1 in WG) and the ones in this study may be related to the different levels of AFM1 in the milk used to produce WG or to the analytical method used. The different levels of AFM1 in the milk used to produce WG could also be explained by the significant difference regarding AFM1 concentration between WWG and RWG in this study. Indeed, AFM1 concentration was significantly higher in WWG than in RWG samples, suggesting that the milk used to produce WWG would be more contaminated than that used for RWG production (Khaneghah et al., 2021). The calculated MOE for liver cancer due to AFM1 intake were far above 10,000, indicating an absence of concern about the AFM1 intake from WG consumption (EFSA, 2020). Kortei et al (2022) reported a health concern about AFM1 intake, as MOEs lower than 10,000, through raw cow milk consumption, were obtained in different regions of Ghana. These authors also reported a cancer risk of 1.94×10^{-3} – 0.07 cases/100,000 person/year for AFM1 intake, which is lower than that obtained in this study (0.2×10^{-3} – 10^{-3} cases/100,000 person/year).

4.4. Dioxins Content, Antibiotics, and Pesticides Residues of Wagashi Gassirè

Dioxins are persistent organic pollutants (POPs) found everywhere in the environment, including in plants, animals, and human beings. In this study, dioxins were found in some WG samples below the maximum level set by the Beninese regulations (MAEP, 2007), i.e., 6 pg/g, and the European Commission (EC, 2023), i.e., 4 pg/g fat for the sum of dioxins and dioxin-like PCBs in milk and dairy products. Many human activities, such as road traffic, directly or indirectly generate dioxins. Emissions from the combustion of plastic wastes in household furnaces contribute to significant air pollution containing dioxins and PCBs (EFSA, 2018). The collection point of the WG samples in this study may be susceptible to environmental contamination. WG is sold unpacked, and dioxins and PCBs could deposit on WG during selling since atmospheric deposition is generally the dominant pathway of PCBs into agricultural food chains (EFSA, 2018). Furthermore, the dioxin and PCB contamination may be related to the raw milk used for WG production.

The misuse of antibiotics by dairy farmers and the lack of respect given to the withdrawal period until milking are the main reasons for the antibiotic residue presence in milk and dairy products (Mensah et al., 2014). Tetracyclines, fluoroquinolones, and colistin were the antibiotic residues detected in the WG samples in this study. In West Africa, the most commonly used antibiotics by dairy farmers and detected in milk and dairy products are tetracyclines, beta-lactams, aminoglycosides, penicillin, sulphonamides, and macrolides (Mensah et al., 2014).

Most of the selected pesticide residues tested in this study were those commonly used in agriculture in Benin (Dognon et al., 2018). Therefore, finding them in WG is expected. However, no pesticide residues were detected from the 103 pesticides tested. This indicates that the milk used for WG production was not contaminated or that the WG preservation processes caused a degradation of the pesticide residues tested below their detection limit. Indeed, Gafour (2018) showed that pasteurization, sterilization, fermentation, or coagulation cause a net degradation of malathion: 82.2% for pasteurization in 20 min versus 91.2% for sterilization in 15 min. The most used pesticides in northern Benin are endosulfan (a forbidden insecticide) and glyphosate (an herbicide) (Dognon et al., 2018; Gouda et al., 2018). Endosulfan was tested in this study but glyphosate was not. Cypermethrin (lower bound mean of 0.5 and upper bound mean of 0.7 µg/kg wet weight) and chlorpyrifos (lower bound mean of 0.0 and upper bound mean of 0.3 µg/kg wet weight) are some pesticide residues found in some dairy products consumed in Benin (Ingenbleek et al. 2019).

5. Conclusions

This study contributed to the physicochemical and nutritional characterization of WG and the assessment of some chemical risks associated with its consumption. The detection of linoleic acid, an essential fatty acid, and the essential minerals and protein contents argue for the good nutritional properties of WG. Colouring WG was associated with important essential mineral losses. The observed concentrations of AFM1 and lead indicate they are the most relevant chemical hazards of WG. The dietary exposure to arsenic, lead, aluminium, AFM1, histamine, and tyramine indicated no public health concern related to these chemical contaminants through WG consumption. Regarding the sample size in this study, it would be appropriate to conduct a larger study to confirm the influence of colouring on WG quality. Moreover, studies should be conducted to identify the main sources of chemical contamination of WG, from production to consumption, to propose strategies for reducing chemical contamination of WG. Finally, risk assessment of aluminium, arsenic, lead, AFM1, histamine, and tyramine should be extended to all dietary sources of these chemical contaminants.

References

Adeyeye SAO. 2017. A preliminary study on the quality and safety of street-vended warankasi (a Nigerian soft white cheese) from Ibadan, Oyo state, Nigeria. *British Food Journal*. 119 (2):322-330. doi:10.1108/BFJ-05-2016-0218.

- Ahmadi S, Le Bot B, Zoumenou R, Durand S, Fiévet N, Ayotte P, Massougbdji A, Alao MJ, Cot M, Glorennec P, et al. 2020. Follow-up of elevated blood lead levels and sources in a cohort of children in Benin. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17, 8689. doi:10.3390/ijerph17228689.
- Aïssi VM, Soumanou MM, Bankolè H, Toukourou F, de Souza CA. 2009. Evaluation of hygienic and mycological quality of local cheese marketed in Benin. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3(3): 2397-2404.
- Appiah F, Ellis WO, Mathias J, Oduro I. 1998. Studies on traditional cheese (Woagashie) production in the Ashanti region. *Journal of Ghana Science Association*. 1(1): 96–104. doi: 10.4314/jgsa.v1i1.17790.
- Baba-Moussa F, Baba-Moussa L, Ahissou H, Bokossa I, Capo-Chichi B, Toukourou F, Sanni A. 2007. Propriétés coagulantes de *Calotropis procera* et ses possibilités d'utilisation en industrie agro-alimentaire. *Revue Cames*. 5:7-12.
- Barciela-Alonso C, Bermejo-Barrera P. 2015. Variation of food mineral content during industrial and culinary processing. In: de la Guardia M, Garrigues S, editors. *Handbook of Mineral Elements in Food*. Chichester: John Wiley and Sons; p. 645–668.
- Benyahia-Krid FA, Aissaoui-Zitoun O, Boughellout H, Adoui F, Harkati A, Bakou CR, Wodo D, Zidoune MN. 2016. Fresh cheese “Peulh type”: Characterization and sensory aspects. *Advances in Dairy Research*. 4(4) :1000163. doi:10.4172/2329-888X.1000163.
- Bodeau-Livinec F, Glorennec P, Cot M, Dumas P, Durand S, Massougbdji A, Ayotte P, Le Bot B. 2016. Elevated blood lead levels in infants and mothers in Benin and potential sources of exposure. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 13, 316. doi:10.3390/ijerph1303031.
- Colomina MT, Peris-Sampedro F. Aluminium and Alzheimer's Disease. In: Aschner M, Costa LG, editors. *Neurotoxicity of Metals, Advances in Neurobiology*. Tarragona: Springer International Publishing; p. 183–197. doi: 10.1007/978-3-319-60189-2_9.
- Djibril ASD, Bothon FTD, Agbangnan DPC, Avlessi F. 2019. Girolando and Borgou cow's milk: physico-chemical and nutritional characterization. *American Journal of Food Science and Technology*. 7(6):242-245. doi: 10.12691/ajfst-7-6-12.
- Doeun D, Davaatseren M, Chung MS. 2017. Biogenic amines in foods. *Food Science and Biotechnology*. 26(6):1463–1474. doi:10.1007/s10068-017-0239-3.
- Dognon SR, Dognon HR, Youssao AKA, Scippo M-L, Youssao AKI. 2018. The use of pesticides in agriculture in North East Benin. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 12(2) : 48-63.
- Dossou J, Adote S, Soulé H. 2006. Production et transformation du lait frais en fromage peulh au Bénin, Rapport de guide de bonnes pratiques. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.

- Dossou J, Atchouke GD, Dabadé DS, Azokpota P, Montcho JK. 2016. Evaluation comparative de la qualité nutritionnelle et sanitaire du lait de différentes races de vaches de quelques zones d'élevage du Bénin. *European Scientific Journal*. 12(3):140-159. doi:10.19044/esj.2016.v12n3p141.
- Dossou WA, Seko Orou BMT, Komagbe G, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, et al. 2022. Processing and preservation methods of Wagashi Gassirè, a traditional cheese produced in Benin. *Heliyon*. 8, Article e10605. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e10605.
- Douny C, Benmedjadi S, Brose F, Iko Afé OH, Igout A, Hounhouigan DJ, Anihouvi VA, Scippo ML. 2019. Development of an analytical method for the simultaneous measurement of 10 biogenic amines in meat: application to Beninese grilled pork samples. *Food Analytical Methods*. 12:2392–2400. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.06.013.
- Douny C, El Khoury R, Delmelle J, Brose F, Degand G, Moula N, Farnir F, Clinquart A, Maghuin-Rogister G, Scippo ML. 2015. Effect of storage and cooking on the fatty acids profile of omega-3 enriched eggs and pork meat marketed in Belgium. *Food Science and Nutrition*. 3(2):140-152. doi:10.1002/fsn3.197.
- EC (European Commission). 2023. Commission regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. Brussels: EC.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2005. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2005.282.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Safety of aluminium from dietary intake. New Jersey: John Wiley and Sons. doi :10.2903/j.efsa.2008.754.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2009. Scientific opinion on arsenic in food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2009.1351.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Scientific Opinion on lead in food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi :10.2903/j.efsa.2010.1570.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2011. Scientific Opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2011.2393.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2017. Update: Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2017.4658.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2018. Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5333.

- EFSA (European Food Safety Authority). 2019. Dietary reference values for the EU. <https://multimedia.efsa.europa.eu/drvs/index.htm?lang=en>. Assessed 2023 June 30.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2020. Risk assessment of aflatoxins in food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2020.6040.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2018. Safety Evaluation of Certain Contaminants in Food. Rome: FAO/WHO
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2019. General standard for contaminants and toxins in food and feed CODEX STAN 193-1995. Rome: FAO/WHO
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226(1):497-509.
- Gafour WAS. 2018. Impact of cow milk manufacturing processes on the degradation of malathion pesticide residues. *American Journal of Food Science and Technology*. 6(6):290-294. doi: 10.12691/ajfst-6-6-9.
- Gobert S, Pasqualini V, Dijoux J, Lejeune P, Durieux EDH, Marengo M. 2017. Trace element concentrations in the apex predator swordfish (*Xiphias gladius*) from a Mediterranean fishery and risk assessment for consumers. *Marine Pollution Bulletin*. 120:364-369. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.05.029.
- González-Martín MI, Vivar-Quintan AM, Revilla I, Salvador-Esteban J. 2020. The determination of fatty acids in cheeses of variable composition (cow, ewe's, and goat) by means of near infrared spectroscopy. *Microchemical Journal*. 156,104854. doi:10.1016/j.microc.2020.104854.
- Gouda A-I, Imorou-Toko I, Salami S-D, Richert M, Scippo M-L, Kestemont P, Schiffers B. 2018. Pratiques phytosanitaires et niveau d'exposition aux pesticides des producteurs de coton du nord du Bénin. *Cahiers. Agricultures*. 27, 65002. doi:10.1051/cagri/2018038.
- Gouda AI, Imorou-Toko I, Imorou-Idrissou M, Spanoghe P, Scippo ML, Sidi Z, Djangbe T, Kestemont P, Schiffers B. 2019. The transfer of insecticides used in cotton production to aquatic ecosystems in the cotton basin in Northern Benin. *International Journal of Scientific Research in Environmental Science and Toxicology*. 4(1):1-15.
- Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M. 2002. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 78(1):79-97. doi:10.1016/S0168-1605(02)00233-7.
- Guy M, Accrombessi M, Fievet N, Yovo E, Massougbodji A, Le Bot B, Glorennec P, Bodeau-Livinece F, Briand V. 2018. Toxics (Pb, Cd) and trace elements (Zn, Cu, Mn) in women during pregnancy and at delivery, South Benin, 2014–2015. *Environmental Research*. 167:198–206. doi: 10.1016/j.envres.2018.06.054.

- Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. 2007. Bovine milk in human nutrition-a review. *Lipids Health Diseases*. 6,25. doi:10.1186/1476-511X-6-25.
- Ingenbleek L, Huc R, Pereirac LL, Paineauc A, Coletc I, Konéd AZ, Adegbooyee A, Hossouf SE, Dembélé Y, Oyedelee AD, et al. 2019. Sub-Saharan Africa total diet study in Benin, Cameroon, Mali and Nigeria: Pesticides occurrence in foods. *Food Chemistry:X*. 2:100034, doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100034.
- Ingenbleek L, Jazet E, Dzossa DA, Adebayo BS, Ogungbangbe J, Dansou S, Diallo JZ, Kouebou C, Adegboye A, Hossou E, et al. 2017. Methodology design of the regional Sub-Saharan Africa total diet study in Benin, Cameroon, Mali and Nigeria. *Food and Chemical Toxicology*. 109(1):155-165. doi:10.1016/j.fct.2017.08.017.
- Ingenbleek L, Verger P, Gimou MM, Adegboye A, Adebayo SB, Hossou SE, Koné AZ, Jazet E, Dzossa AD, Ogungbangbe J, et al. 2020. Human dietary exposure to chemicals in sub-Saharan Africa: Safety assessment through a total diet study. *Lancet Planetary Health*. 4(7):292-300. doi: 10.1016/S2542-5196(20)30104-2.µ.
- ISO (International Organization for Standardization). 2014. Milk and milk products-Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation ISO 8968-1:2014. Geneva, Switzerland: ISO.
- Jitaru P, Ingenbleek L, Marchonda N, Laurenta C, Adegboye A, Hossou SE, Koné AZ, Oyedelee AD, Kisito CSKJ, Dembélé YK, et al. 2019. Occurrence of 30 trace elements in foods from a multi-centre Sub-Saharan Africa Total Diet Study: Focus on Al, As, Cd, Hg, and Pb. *Environment International*. 133, 105197. doi:10.1016/j.envint.2019.105197.
- Khaneghah AM, Moosavi M, Omar SS, Oliveira CAF, Karimi-Dehkordi M, Fakhri Y, Huseyn E, Nematollahi A, Farahani M, Sant'Ana AS. 2021. The prevalence and concentration of aflatoxin M1 among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Food Control*. 125, 107960. doi:10.1016/j.foodcont.2021.107960.
- Kora S. 2005. Contribution à l'amélioration de la technologie de production du fromage peulh au Bénin. [Thèse d'ingénieur agronome]. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Kortei NK, Annan T, Kyei-Baffour V, Essuman EK, Boakye AA, Tettey CO, Boadi NO. 2022. Exposure assessment and cancer risk characterization of aflatoxin M1 (AFM1) through ingestion of raw cow milk in southern Ghana. *Toxicology Report*. 9: 1189–1197. doi:10.1016/j.toxrep.2022.05.015.
- Kpoussou AR, Paraiso MN, Sokpon CM, Alassan KS, Vignon RK, Keke RK, Bigot C, Domonhédou C, Gbédo SE, Séhonou J et al. 2020. Hépatite virale B lors d'une campagne de dépistage en population générale au Bénin: Séroprévalence et facteurs associés. *Pan African Medical Journal*. 37 (247). doi : 10.11604/pamj.2020.37.247.26070.

- Linares DM, Del Río B, Ladero V, Martínez N, Fernández M, Martín MC, Álvarez MA. 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*. Article 180. doi:10.3389/fmicb.2012.00180.
- Linares DM, Martín MC, Ladero V, Alvarez MA, Fernández M. 2011. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(7):691-703. doi: 10.1080/10408398.2011.582813.
- MAEP (Ministère de l'Agriculture de l'Élevage et de la Pêche). 2014. Etude des filières lait et viande, Rapport définitif sur la filière lait (PAFILAV). Cotonou : MAEP.
- MAEP (Ministère de l'Agriculture de l'Élevage et de la Pêche). 2007. Arrêté N° 0362/ MAEP/D-CAB/SGM/DRH/DP/SA du 30 octobre 2007 de fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en République du Bénin. Cotonou: MAEP.
- Marissiaux L, Scippo ML, Daube G, Botteldoorn N, Gobert S, Ghuysen A, Denayer S, Scholtes B. 2018. An awkward fishing expedition. *Acta Anaesthesiologica Belgica*. 69(2): 1–4.
- Mattiello S, Caroprese M, Matteo CG, Fortina R, Martini A, Martini M, Parisi G, Russo C, Zecchinia M. 2018. Typical dairy products in Africa from local animal resources. *Italian Journal of Animal Science*. 15(19):740-754. doi:10.1080/1828051X.2017.1401910.
- Mensah SEP, Koudandé OD, Sanders P, Laurentie M, Mensah GA, Abiola FA. 2014c. Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique: risques de santé publique. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*. 33 (3):975-986.
- Nyamakwere F, Esposito G, Dzama K, Raffrenato E. A review of artisanal cheese making: An African perspective. *South African Journal of Animal Science*. 51 (3):296–309. doi: 10.4314/sajas.v51i3.3.
- OECD/FAO (Organisation for Economic Co-operation and Development/ Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2020. *Agricultural Outlook 2020–2029*. Paris: France. doi: 10.1787/1112c23b-en.
- OECD/FAO (Organisation for Economic Co-operation and Development/ Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2023. *Cheese projections: Production and trade*. In: OECD/FAO, editors. *Agricultural Outlook 2023–2032*. Paris : OECD/FAO; p. 64. doi: 10.1787/ed3f32b9-en.
- Pereira PC. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 30:619-627. doi:10.1016/j.nut.2013.10.011.
- Schirone M, Tofalo R, Visciano P, Corsetti A, Suzzi G. 2012. Biogenic amines in Italian Pecorino cheese. *Front. Microbiol*. 3:171. doi: 10.3389/fmicb.2012.00171.
- Scippo ML, Epe G, De Pauw E, Maghuin-Rogister G. 2004. DR-CALUX screening of food samples: evaluation of the quantitative approach to measure dioxin, furans and dioxin-like PCBs. *Talanta*. 63(5):1193-202. doi: 10.1016/j.talanta.2004.05.037.63.

- Sessou P, Farougou S, Yèhouenou B, Agbangnan P, Azokpota P, Issaka Y, Sohounhloue D. 2013. Investigation on aflatoxin M1 content of traditional cheese wagashi produced in Benin. *African Journal of Food Science and Technology*. 4(4):76-79.
- Uzeh RE, Ohenhen RE, Rojugbokan AK. 2006. Microbiological and nutritional qualities of dairy products: nono and wara. *Nature Science*. 4(3):37–40.
- Visciano P, Schirone M, Tofalo R, Suzzi G. 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. *Frontiers in Microbiology*. Article 188. doi: 10.3389/fmicb.2012.00188.
- Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. 2013. Milk and dairy product composition. In: Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D, editors. *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome: FAO; p. 41-102.

Supplementary data

Table S1: pH and proximal composition of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets

Samples number	Type of WG	pH	Moisture (%)	Protein (% ww)	Fat (% ww)
1	RWG	6,1	52,4	13,7	25,9
2	RWG	5,9	63,3	12,2	19,1
3	RWG	5,9	59,0	15,4	24,7
4	RWG	5,3	60,5	14,3	22,1
5	RWG	5,3	56,5	13,1	22,0
6	RWG	5,5	62,8	14,3	20,3
7	RWG	5,7	60,5	15,2	17,3
8	RWG	5,7	57,6	14,3	19,7
9	RWG	5,4	59,1	14,3	20,3
10	WWG	5,5	58,2	11,3	20,9
11	WWG	5,2	60,8	14,0	19,9
12	WWG	5,2	61,3	13,6	19,8
13	WWG	5,1	61,9	10,8	18,6
14	WWG	5,0	55,6	13,1	23,2
15	WWG	5,0	57,5	14,2	21,7
	Mean	5,5	59,1	13,6	21,0
	SD	0,3	2,9	1,3	2,3

RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, ww: wet weight

Table S2: Fatty acids composition of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets (g/100 g total fatty acids)

Type of WG	RWG										WWG				
Samples number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C10:0	1,77	<LOQ	2,17	2,54	2,08	2,29	3,17	2,00	2,56	3,73	2,76	1,88	<LOQ	2,17	1,89
C12:0	1,48	1,56	1,97	1,75	1,70	1,68	2,38	1,79	1,90	2,74	2,33	1,95	1,99	1,71	1,62
C13:0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C14:0	7,33	8,17	8,11	8,33	7,85	7,39	9,75	8,94	8,43	9,32	9,49	9,04	8,99	7,97	7,90
C16:0	29,37	30,29	30,67	35,67	31,78	28,24	34,01	31,21	31,46	33,60	32,59	32,52	31,76	28,76	33,60
C17:0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C18:0	17,51	17,50	19,97	16,71	18,98	16,87	16,37	16,45	18,43	16,82	19,91	17,36	18,12	20,54	18,17
C20:0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C22:0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C24:0	<LOQ	<LOQ	0,71	1,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,12	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,01
C16:1	1,91	3,33	0,92	2,77	3,63	1,42	2,48	3,71	1,46	2,48	1,94	1,68	1,28	1,00	1,77
C17:1	<LOQ	1,08	<LOQ	<LOQ	<LOQ	14,48	<LOQ	0,85	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C18:1,9t	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C18:1,9c	38,73	35,38	32,24	28,92	31,47	25,53	29,04	32,60	31,89	28,87	28,48	33,45	35,22	35,21	31,56
C18:2,9c,12c	1,90	2,70	3,23	2,31	2,51	2,10	2,81	2,46	2,74	2,45	2,50	2,11	2,64	2,64	2,48
C18:2,9t,12t	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C18:2,9c,11t	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C18:2,9t,11t	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C18:3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C20:2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

C20:4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C18:3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C18:4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C20:3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C20:5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C22:5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
C22:6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
SFA	57,46	57,52	63,61	66,01	62,40	56,47	65,68	60,38	63,91	66,21	67,08	62,75	60,86	61,14	64,20
MUFA	40,64	39,78	33,16	31,69	35,10	41,43	31,51	37,16	33,35	31,34	30,42	35,14	36,50	36,22	33,33
PUFA	1,90	2,70	3,23	2,31	2,51	2,10	2,81	2,46	2,74	2,45	2,50	2,11	2,64	2,64	2,48
PUFA/SFA	0,03	0,05	0,05	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04
w6	1,90	2,70	3,23	2,31	2,51	2,10	2,81	2,46	2,74	2,45	2,50	2,11	2,64	2,64	2,48
w3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

C10:0 (Capric acid), C12:0 (Lauric acid), C13:0 (Tridecanoic acid), C14:0 (Myristic acid), C16:0 (Palmitic acid), C17:0 (Heptadecanoic acid), C18:0 (Stearic acid), C20:0 (Arachidic acid), C22:0 (Behenic acid), C24:0 (Lignoceric acid), C16:1 (Palmitoleic acid), C17:1 (cis-10-heptadecenoic acid), C18:1,9t (Elaidic acid), C18:1,9c (Oleic acid), C18:2,9c,12c (Linoleic acid), C18:2,9t,12t (Linolelaidic acid), C18:2,9c,11t (Rumenic acid), C18:2,9t,11t (Isolinoleic acid), C18:3 (Gama-Linoleic acid), C20:2 (cis-11,14-Eicosadienoic acid), C20:4 (Arachidic acid), C18:3 (Alpha-Linoleic acid), C18:4 (Stearidonic acid), C20:3 (Eicosatrienoic acid), C20:5 (Timmodonic acid), C22:5 (Cupladonic acid), C22:6 (Cervonic acid), SFA (Saturated Fatty acids), MUFA (Mono-Unsaturated Fatty Acids), PUFA (Poly-Unsaturated Fatty Acids), WG (Wagashi GAssirè), RWG (Red WG), WWG (White WG), LOQ (0,1 g/100 g total fatty acids)

Table S3: Essential minerals composition of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets (mg/kg wet weight)

Samples number	Type of WG	Na	Mg	P	K	Ca	Fe	Mn	Cu	Zn	Se	Mo
1	RWG	28	69	2111	16	2401	7	1,1	0,5	29	<LOQ	0,02
2	RWG	29	35	1211	12	866	2	0,3	0,4	17	<LOQ	0,02
3	RWG	29	36	1272	14	997	4	0,6	0,7	21	<LOQ	0,01
4	RWG	27	30	1280	11	729	3	0,4	0,7	15	<LOQ	0,03
5	RWG	26	52	1470	10	1460	9	0,7	1,2	24	<LOQ	0,04
6	RWG	25	52	1554	11	1452	4	0,4	0,7	20	<LOQ	0,02
7	RWG	51	72	2076	27	2375	7	1,1	0,9	25	<LOQ	0,02
8	RWG	54	62	2117	38	2352	7	1,2	0,8	24	<LOQ	0,01
9	RWG	46	33	1321	21	1107	4	0,4	0,8	19	0,10	0,01
10	WWG	22	62	1686	41	1806	10	0,5	1,2	18	<LOQ	0,02
11	WWG	33	82	2157	54	2667	2	0,3	0,8	21	<LOQ	0,01
12	WWG	26	82	2020	46	2228	4	0,4	0,7	19	<LOQ	0,02
13	WWG	176	217	2902	271	4385	1	0,2	0,4	20	<LOQ	0,03
14	WWG	129	191	2907	214	3860	6	0,6	0,7	25	<LOQ	0,04
15	WWG	105	157	2616	152	3610	3	0,3	<LOQ	16	<LOQ	0,02
	LOQ	5	1,2	1,9	2,3	4,2	0,5	0,01	0,3	0,3	0,09	0,004
	Mean	53,7	81,9	1913,3	62,5	2153,0	5,0	0,6	0,7	20,9	0,1	0,0
	SD	46,0	58,6	577,4	81,9	1122,5	2,7	0,3	0,3	3,9		0,0

RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, LOQ: limit of quantification, SD: standard deviation

Table S4: Metallic trace elements composition of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets (mg/kg wet weight)

Type of WG	RWG								
Samples number	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Li	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Al	151	32	120	0	11	6	180	573	39
Cr	0,08	<LOQ	0,02	<LOQ	0,02	0,02	0,02	0,03	<LOQ
Ni	<LOQ	0,03	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
As	<LOQ	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02
Rb	0,06	0,05	0,05	0,03	0,04	0,03	0,07	0,09	0,05
Sr	4,22	1,14	1,84	0,99	2,20	1,68	3,90	5,70	1,29
Sn	0,06	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ba	4,16	1,03	2,27	0,85	1,65	1,25	4,43	5,46	1,25
Tl	0,0004	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0004	0,0012	0,0004
Pb	0,14	0,08	0,04	0,02	0,05	0,04	0,05	0,08	0,03
Bi	0,004	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
U	0,009	0,004	0,010	0,002	0,011	0,003	0,010	0,015	0,005
V	0,055	0,021	0,049	0,015	0,039	0,016	0,064	0,076	0,035
Ag	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
B	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Be	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Co	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Sb	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Cd	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

WWG: White Wagashi Gassirè, RWG: Red Wagashi Gassirè

Table S4 (continuous): Metallic trace elements composition of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets (mg/kg wet weight)

Type of WG Samples number	WWG						LOQ
	10	11	12	13	14	15	
Li	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,009	<LOQ	<LOQ	0,006
Al	8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,2
Cr	0,04	0,02	<LOQ	0,01	0,02	<LOQ	0,01
Ni	0,05	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,02
As	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,01
Rb	0,12	0,17	0,14	1,18	1,23	0,68	0,006
Sr	1,80	2,45	1,76	2,87	3,01	3,01	0,03
Sn	0,05	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,009
Ba	1,40	2,75	1,86	1,92	2,16	2,42	0,01
Tl	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0005	<LOQ	0
Pb	0,04	0,03	0,23	0,12	0,15	0,20	0,01
Bi	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,003
U	0,001	0,000	0,001	<LOQ	0,002	0,014	0
V	0,013	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,009	0,006	0,005
Ag	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,007
B	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,7
Be	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,03
Co	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,01
Sb	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,05
Cd	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,003

WWG: White Wagashi Gassirè, RWG: Red Wagashi Gassirè

Table S5: Dioxins and aflatoxin M1 contents of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets

Samples number	Type of WG	Dioxins and PCBs (pg BEQ/g fat)
1	RWG	2,57
2	RWG	2,31
3	RWG	2,24
4	RWG	4,34
5	RWG	<LOQ
6	RWG	<LOQ
7	RWG	2,46
8	RWG	<LOQ
9	RWG	<LOQ
10	WWG	<LOQ
11	WWG	1,71
12	WWG	1,30
13	WWG	1,87
14	WWG	<LOQ
15	WWG	1,28

RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, LOQ=0,9 pg/g fat

Table S6: aflatoxin M1 contents of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets

Samples number	Type of WG	AFM1 (µg/kg wet weight)
1	RWG	0,46
2	RWG	0,23
3	RWG	0,21
4	RWG	0,28
5	RWG	0,48
6	RWG	0,27
7	RWG	0,38
8	RWG	0,23
9	RWG	0,22
10	WWG	0,22
11	WWG	0,17
12	WWG	0,20
13	WWG	0,15
14	WWG	0,14
15	WWG	0,15

RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, LOQ=0,1 µg/kg wet weight

Table S7: Biogenic amines contents (mg/kg wet weight) of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets

Type of WG	RWG								
Samples number	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2-Phenylethylamine	2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2	<LOQ	<LOQ	2	<LOQ
Putrescine	35	19	<LOQ	36	23	<LOQ	10	17	<LOQ
Cadaverine	110	15	<LOQ	18	96	<LOQ	30	<LOQ	3
Histamine	12	<LOQ	<LOQ	<LOQ	50	<LOQ	30	50	<LOQ
Tyramine	23	4	2	<LOQ	60	17	27	49	<LOQ
Spermidine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1	<LOQ	<LOQ	2	1	<LOQ
Methylamine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tryptamine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Serotonin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Spermine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Total Biogenic amine content	182	38	2	55	231	17	99	119	3

RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, LOQ=0,4 mg/kg wet weight

Table S7 (contnous): Biogenic amines contents (mg/kg wet weight) of Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets

Type of WG	WWG					
Samples number	10	11	12	13	14	15
2-Phenylethylamine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Putrescine	9	2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Cadaverine	<LOQ	12	1	2	<LOQ	1
Histamine	17	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tyramine	9	4	<LOQ	4	11	<LOQ
Spermidine	2	<LOQ	<LOQ	1	<LOQ	<LOQ
Methylamine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tryptamine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Serotonin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Spermine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Total Biogenic amine content	37	18	1	7	11	1

RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè, LOQ=0,4 mg/kg wet weight

Tables S8: Screening of antibiotic residues in Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets

Samples number	Type of WG	BeadyPlex
1	RWG	Negative
2	RWG	Quinolones
3	RWG	Quinolones
4	RWG	Negative
5	RWG	Quinolones
6	RWG	Tetracyclines
7	RWG	Negative
8	RWG	Negative
9	RWG	Quinolones
10	WWG	Negative
11	WWG	Negative
12	WWG	Colistine
13	WWG	Negative
14	WWG	Not determined
15	WWG	Negative

RWG: Red Wagashi Gassirè, WWG: White Wagashi Gassirè

Table S9: Pesticide residues tested in Wagashi Gassirè sold in the southern Benin markets

Pesticide residues	Analytical Method		
		Bitertanol	LCMS MS
		Cadusafos	LCMS MS
		Chlorpyrifos	LCMS MS
		Cymoxanil	LCMS MS
		Iprodione	LCMS MS
		Linuron	LCMS MS
		Oxamyl	LCMS MS
		Propanil	LCMS MS
		Tebuconazole	LCMS MS
		Terbutryn	LCMS MS
		Thiofanate-methyl	LCMS MS
		Carbendazim	LCMS MS
		Diazinon	LCMS MS
		Imazalil	LCMS MS
		Imidacloprid	LCMS MS
		Kresoxim-methyl	LCMS MS
		Metsulfuron-methyl	LCMS MS
		Nicosulfuron	LCMS MS
		Parathion	LCMS MS
		Profenofos	LCMS MS
		Propiconazole	LCMS MS
		Pyrachlostrobine	LCMS MS
		Terufos	LCMS MS
		Triademinol	LCMS MS
		2,4-D	LCMS MS
		Cyflufenamid	LCMS MS
		Cypermethrin	LCMS MS
		Penconazole	LCMS MS
		Pirimiphos-methyl	LCMS MS
		Spirodiclofen	LCMS MS
		Tebufenozide	LCMS MS
		Temephos	LCMS MS
		Thiacloprid	LCMS MS
		Atrazine	LCMS MS
		Benalaxyl	LCMS MS
		Chlorotoluron	LCMS MS
		Cyanazine	LCMS MS
		Epoxiconazole	LCMS MS
		Fenoxycarb	LCMS MS
		Hexythiazox	LCMS MS
		Isoproturon	LCMS MS
		Propazine	LCMS MS
		Simazine	LCMS MS
		Terbutylazine	LCMS MS
Acephate	LCMS MS		
Acetamiprid	LCMS MS		
Difenconazole	LCMS MS		
Fenpropimorf	LCMS MS		
Methiocarb	LCMS MS		
Methomyl	LCMS MS		
Pirimicarb	LCMS MS		
Prochloraz	LCMS MS		
Pyrimethanil	LCMS MS		
Tebuthiuron	LCMS MS		
Thifensulfuron-methyl	LCMS MS		
Thiodicarb	LCMS MS		
Trifloxystrobine	LCMS MS		
Amethryn	LCMS MS		
Boscalid	LCMS MS		
Butachlor	LCMS MS		
Carbaryl	LCMS MS		
Dimethomorph	LCMS MS		
Hexaconazole	LCMS MS		
Malathion	LCMS MS		
Propoxur	LCMS MS		
Prosulfocarb	LCMS MS		
Spinosad a	LCMS MS		
Spinosad d	LCMS MS		
Spiroxamine	LCMS MS		
Thiabendazole	LCMS MS		
Thiametoxam	LCMS MS		
Carbofuran	LCMS MS		
Dimethoate	LCMS MS		
Diuron	LCMS MS		
Ethoprophos	LCMS MS		
Fenamiphos	LCMS MS		
Fenbuconazole	LCMS MS		
Fludioxonil	LCMS MS		
Metalaxyl	LCMS MS		
Methribuzin	LCMS MS		
Monocrotophos	LCMS MS		
Pendimehtanil	LCMS MS		
Pyrazosulfuron-ethyl	LCMS MS		
Tirazophos	LCMS MS		
Azoxystrobine	LCMS MS		
Bentazon	LCMS MS		

Section expérimentale_Etude 2

Alachlor	GC ECD	DDT	GC ECD
Aldrin	GC ECD	Deltamethrin	GC ECD
Bèta- HCH	GC ECD	Dieldrin	GC ECD
Bifenthrin	GC ECD	Endosulfan	GC ECD
Chlorothalonil	GC ECD	Endrin	GC ECD
Cyhalothrin	GC ECD	Heptachlor	GC ECD
Cypermethrin	GC ECD	Hexachlorobenzene	GC ECD
DDD	GC ECD	Methoxychlor	GC ECD
DDE	GC ECD		

LOQ (LCMS MS) : 0,00125 mg/kg wet weight, LOQ (GC-ECD) : 0,01125 mg/kg wet weight

ETUDE 3_Partie I :
Impact de la saison et de la
région sur la qualité du lait
et du Wagashi Gassirè
produit au Bénin

Soumis pour publication à Dairy

Physicochemical characteristics, nutritional composition, and chemical hazards content of Wagashi Gassirè cheese from Benin: seasonal and regional variation

Alphonse Wanignon Dossou^{*a,b,c}, Gwladys Komagbe^{d,e}, Baké Marie Thérèse Seko Orou^{f,g}, Stella Saizonou^c, Philippe Sessou^e, Abdou Karim Issaka Youssao^h, Souaïbou Farougou^e, Joseph Djidjoho Hounhouigan^c, Jacques Mahillon^d, Roch Mongbo^g, Marc Poncelet^f, Samiha Boutaleb^a, Sylvie Gobert^{i,j}, Yann Eméric Madode^c, Paulin Azokpota^c, Marie-Louise Scippo^a, Antoine Clinquart^b, Caroline Douny^a

^aFARAH/Laboratory of Food Analysis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Quartier Vallée 2, Avenue de Cureghem 10 (B43b), 4000, Liège, Belgium; sboutaleb@uliege.be (S.B.); mlscippo@uliege.be (M.-L.S.); cdouny@uliege.be (C.D.)

^bFARAH/Laboratory of Food Technology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Quartier Vallée 2, Avenue de Cureghem 10 (B42), 4000, Liège, Belgium; antoine.clinquart@uliege.be

^cLaboratory of Food Sciences and Technology, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, 03 BP 2819, Abomey-Calavi, Benin; saizonoustel-la1@gmail.com (S.S.); joseph.hounhouigan@gmail.com (J.D.H.); yann.madode@gmail.com (Y.E.M.); azokpotap@yahoo.fr (P.A.)

^dResearch Unit on Communicable Diseases, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009, Abomey-Calavi, Benin; gkomagbe@yahoo.fr (G.K.); sessouphilippe@yahoo.fr (P.S.); s.farougou@yahoo.com (S.F.)

^eLaboratory of Analysis of Social Dynamics and Development Studies, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, 03 BP 2819, Abomey-Calavi, Benin; sekonomie898@gmail.com (B.M.T.S.O.); rochl_mongbo@yahoo.fr (R.M.)

^fLaboratory of Animal Biotechnology and Meat Technology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009, Abomey-Calavi, Benin; iyous-sao@yahoo.fr

^gLaboratory of Food and Environmental Microbiology, Faculty of Bioscience Engineering, Catholic University of Louvain, Building Mendel - Floor -1 - Croix du Sud, 2 / L7.05.01, B-1348, Louvain-la-Neuve, Belgium; jacques.mahillon@uclouvain.be

^hObserving Recomposing Worlds, Faculty of Social Sciences, University of Liège, Quartier Agora, Place des Orateurs 3 (B31), 4000, Liège, Belgium; marc.poncelet@uliege.be

ⁱLaboratoire d'Océanologie, Centre MARE, Université de Liège, Sart Tilman, B6c, 4000 Liège, Belgium; sylvie.gobert@uliege.be

*Correspondence: dossoual6@gmail.com; Tel.: +229 66963212

Abstract

In this study, the seasonal and regional variations of cow milk characteristics and their impact on the corresponding Wagashi Gassirè (WG) cheese were assessed. The production of 24 WG cheeses was conducted in Nikki (North) and Dassa-Zounmè (South) of Benin during the dry and rainy seasons of 2022, with six productions per season in each region. The milk used for WG production and the corresponding WG were subjected to analyses for pH, colour, moisture, ash, density, water activity, protein, fat, fatty acid profile, essential minerals, metallic trace elements, aflatoxin M1 (AFM1), dioxins and biogenic amines. The protein and total fat contents of rainy milk samples (3.1 ± 0.3 and 5.4 ± 0.8 g/100g ww, respectively) were significantly higher than the dry one (2.7 ± 0.4 and 4.8 ± 0.5 g/100g ww respectively). However, the protein and total fat contents of WG samples were similar throughout the season, but significantly different between regions (Nikki > Dassa). The most abundant fatty acids in WG (i.e. palmitic acid and oleic acids) were not significantly different between regions. Moreover, magnesium, potassium, and sodium contents of WG samples were significantly higher in Dassa than in Nikki. Contamination of milk samples with AFM1 was significantly lower during the rainy season than the dry season with no impact on the AFM1 contamination of WG samples. These results contribute to the nutritional characterisation of WG, identify geographical region and season of production of cow milk as factors contributing to the differences in WG composition, and are of significant importance in the scope of its standardisation.

Keywords: dairy products, Wagashi Gassirè cheese, chemical contaminants, season, region, nutritional composition

1. Introduction

Milk and dairy products are important components of human diets as they are sources of proteins, essential minerals, essential fatty acids, and vitamins (Wijesin-ha-Bettoni and Burlingame, 2013). The composition of raw milk determines, to a large extent, the nutritional value and the technological properties of milk and dairy products (Rayanatou, 2017). Therefore, the composition of milk is of great importance for the dairy industry and there is great interest in changing the composition of milk (Heck et al., 2009). Indeed, the composition of bovine milk is influenced by many factors including genetic (breed and selection), physiological (stage of lactation, lactation period, animal comfort), nutritional (energy value and feed composition), and environmental (season, geographical location, climatic conditions) factors (Haug et al., 2007; Schwendel et al., 2015; Tyasi et al., 2015).

In Benin, fresh cow milk is processing into a traditional local cheese called Wagashi Gassirè (WG), which remains the most consumed dairy products (Dossou et al., 2006; Mattiello et al., 2018). WG is a soft cheese obtained by hot coagulation (65 to 70°C) of fresh whole milk using *Calotropis procera* (Apple of Sodom, Apocynaceae) extracts that contain an enzyme known as calotropin (Baba-Moussa et al., 2007; Dossou et al., 2006; Mattiello et al., 2018). Currently, few data are available on the nutritional

values and physicochemical properties of WG produced in Benin, and the existing data show disparities. Regarding chemical hazards, only data on aflatoxin M1 (AFM1) are available (Aïssi et al., 2009; Sessou et al., 2013). As the nutritional value and the technological properties of dairy products depend on the milk quality, the WG physicochemical characteristics and nutritional composition may also vary according to the raw milk variation. To gain insight into the WG composition in Benin, it is therefore essential to examine the composition of the milk used for its production.

When determining the composition of raw milk, it is important to realize that within one country the composition is not constant. Milk composition varies considerably throughout the seasons and regions, as shown by Lindmark-Månsson et al (2003) and Lock and Garnsworthy (2003). These seasonal changes offer problems and opportunities for dairy manufacturers. For Dutch and Swedish, milk protein is higher during fall and winter than in spring and summer (Heck et al., 2009; Lindmark-Mansson et al., 2003). Higher protein content in milk may be an opportunity for rennet coagulating cheese processors as significant improvement in milk coagulation properties (shorter coagulation and cutting time, higher curd firming rate, and curd firmness) occurs with increasing protein level (Guinee et al., 1997). In Benin and to our knowledge, no data are available on the seasonal and regional variation of bovine milk used for WG production.

The objective of this study was to determine the effects of season and geographical location on the physicochemical properties, nutritional composition, and chemical hazards content of milk produced in Benin and their impact on the WG obtained. Altogether, these data will be useful for setting up the prescription documents to guarantee the typicality, quality and reputation of WG useful for its standardisation.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The study was carried out in Dassa (Center-South) and Nikki (North-East), two regions of the agricultural development pole identified in the Benin Republic for diversification and intensive cattle production. These municipalities are parts of the main cattle and WG production areas in Benin. Nikki is a WG production area with a dairy processing unit while Dassa is a WG production area and an important crossroad for WG commercial and transaction (MAEP, 2014). Dassa and Nikki are characterised by Soudano-Guinean climate with two seasons: a dry season occurring from April to October, and a rainy season from November to March. Mean annual precipitation and temperature are 1100 mm and 32 °C in Dassa and 1050 mm and 28 °C in Nikki. Dassa landscape is dominated by outcrop vegetation (small forests and savannah), while the peneplain is covered by woodland and wood savannah. Nikki is characterised by a mosaic of woodland, dry dense forests, tree and shrub savannas, and gallery forests.

2.2. Milk sampling and Wagashi Gassirè production

In each region, three dairy farms were selected as WG production stations. Each farm has a cattle herd and the cow milk mixture was used for the WG production. WG was produced according to the method described by Dossou et al (2022). For the production of WG, the milk collected after milking was immediately filtered, heated (60°C, 20 min), and coagulated (70°C, 28 min) with *C. procera* extracts. After coagulation, the WG was cooked (90°C, 35 min), moulded, and drained (14 min, room temperature) (Figure 1). Six WG productions per season in each region were conducted leading to 24 productions. The rainy season productions were conducted in September 2022 and the dry season productions were conducted in December 2022. All dairy farms and processors of this study had already been identified in a previous work (Dossou et al., 2022). For each production, a milk sample from the dairy cows was collected before each production. At the end of each production, the resulting WG was also collected leading to 24 milk samples and 24 WG samples.

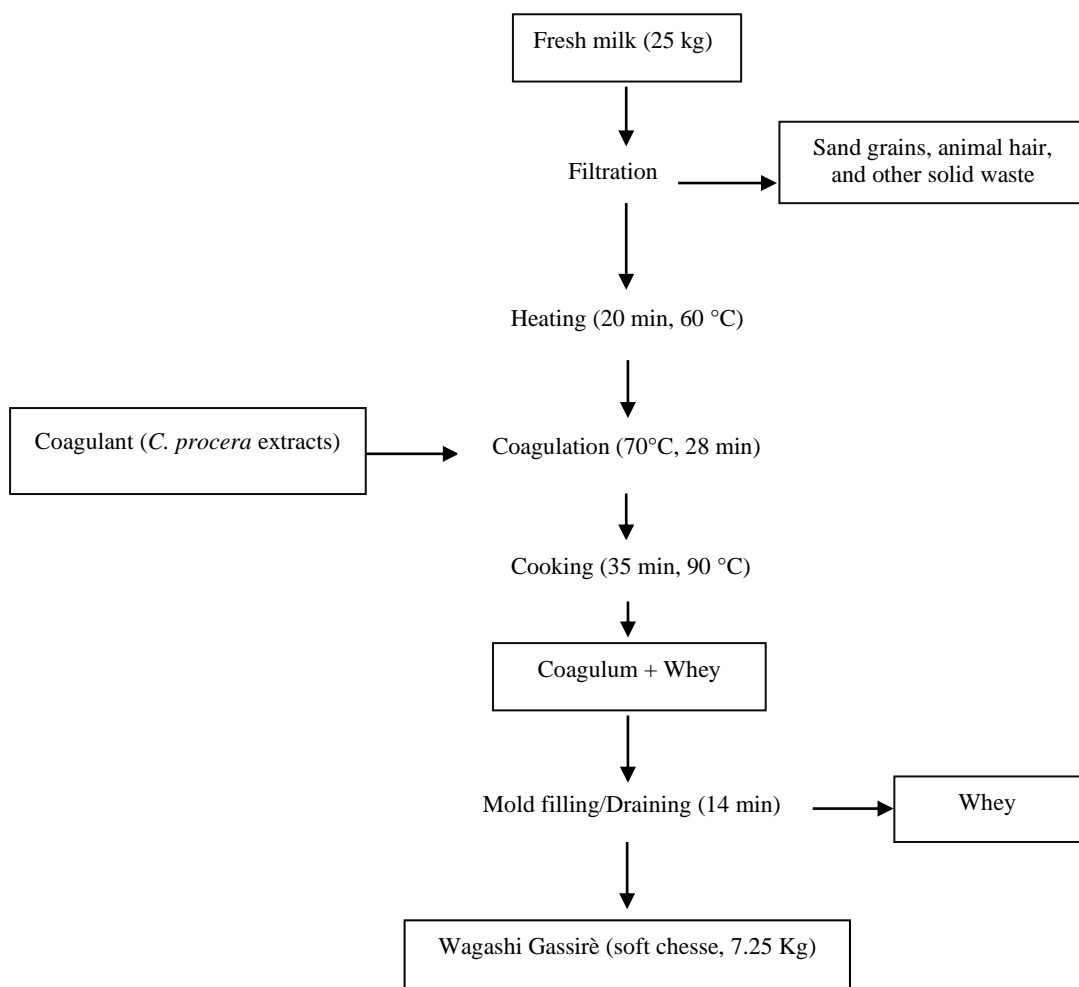


Figure 1: Fresh milk processing into Wagashi Gassirè (Dossou et al., 2022)

2.3. Physicochemical, nutritional, and chemical hazards analyses

2.3.1. Physicochemical analyses

The pH of the milk was determined at the production station using Hanna Instruments HI991001 (electrode HI12963, Lingo Tanneries Cedex, France) pH-meter. The pH of the WG was determined after production using a Knick pH-meter 765 Calinatic (electrode 406-M6-DXX-S7/25, Columbus, Ohio, USA). The colour of the samples was determined using a Konica Minolta chromameter CR400 (Carrières-sur-Seine, Ile de France, France) in the trichromatic system (CIE LAB L* a* b* ΔE) calibrated with a white reference ceramic with the colour coordinates: X= 0.3194; Y= 86.1 and Z= 0.3369. The moisture was determined by the difference in mass of the samples after and before freeze-drying for 48 h (Lyoquest, Telstar, Barcelona, Spain). The milk's apparent density and temperature were measured using a lactodensimeter MV LA.1015-1045 of Grosseron (Couëron, France). The apparent density was corrected using the following formula: corrected density = apparent density + 0.2 (milk temperature - 20 °C) (Seme et al., 2015). Water activity was determined according to ISO 18787:2017 using AQUALAB 4TE 2A@250V Aw-meter of AQUALAB Europe (München, Germany) (ISO, 2017).

2.3.2. Nutritional analyses

The total ash content was determined by the AOAC method after incinerating 5 g of the sample at 550 °C for 24 h in a furnace F30420C-33 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (AOAC, 1995). The crude protein content was determined by the Kjeldahl method according to ISO 8968-1:2014 (ISO, 2014). The fat was extracted by the Folch method (Folch et al., 1957). After saponification and methylation, twenty-nine fatty acid methyl esters were analysed by gas chromatography (GC) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a CPSil88 fatty acid column (100 m × 0.25 mm; 0.2 μm) (Varian, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) coupled to a PolarisQ ion trap mass spectrometer (MS) (Thermo Fisher Scientific, USA) (Douny et al., 2015). Thirty-two minerals were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Gobert et al., 2017) and classified into essential minerals (eleven) and other minerals (twenty-one) (EFSA, 2019).

2.3.3. Chemical hazards analyses

Dioxins and dioxin-like PCB compounds (hereafter referred to by the general term “dioxins”) were determined by DR-CALUX (Dioxin Responsive-Chemically Activated Luciferase Gene Expression) cell-based assay (Scippo et al., 2004). AFM1 was determined by the ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method using the RIDASCREEN kit of R-Biopharm (Darmstadt, Germany). UPLC-FLD (Ultra-Performance Liquid Chromatography combined with Fluorescence Detection) was used to quantify ten biogenic amines (Douny et al., 2019).

All 24 milk samples as well as the 24 WG samples were analysed for the parameters described above except for minerals and dioxins. For these chemical contaminants, 12 milk samples and 12 corresponding WG samples were analysed (one sample per season and per region).

2.4. Statistical analysis

Data from the physicochemical, nutritional, and chemical hazard analyses were entered into MS Excel 2013 to perform statistical analysis using the SAS System 9.4 software. For physicochemical and nutritional parameters, an ANOVA test was performed to compare the means between seasons and regions. Means were calculated considering the samples for which the analysed physicochemical and nutritional parameters were detected (results > LOQ: limit of quantification). For chemical hazards, the lower bound mean (mean calculated by replacing by 0 the “< LOQ” results) was used for the ANOVA test. The statistical significance was set at 5%.

3. Results

3.1. Seasonal variation of physicochemical characteristics, nutritional composition, and chemical hazards content of cow milk and Wagashi Gassirè

According to the Table 1, the protein (3.1 ± 0.3 g/100 g ww) and total fat (5.4 ± 0.8 g/100 g ww) contents of the rainy season milk samples were significantly higher ($P < 0.05$) than those of the dry season (2.7 ± 0.4 , and 4.8 ± 0.5 g/100 g ww, respectively). Regarding the pH, Aw, density, moisture, ash and colour parameters, no significant differences were observed between rainy and dry seasons for milk (Table 1). However, WG from the dry season (94.0 ± 0.1) were clearer ($P < 0.001$) than that of the rainy season (93.1 ± 0.6). The green/red index (a^*) (-0.1 ± 0.2) in the rainy season was significantly higher ($P < 0.001$) than that of the dry season (-0.4 ± 0.1) (Table 1).

Table 1: Seasonal variation of fresh milk and Wagashi Gassirè (physico-chemical parameters and proximal composition, mean±sd)

Physico-chemical parameters and proximal composition	Milk		Wagashi Gassirè		
	Rainy (n=12)	Dry (n=12)	Rainy (n=12)	Dry (n=12)	
pH	6.5± 0.05	6.5± 0.07	6.5± 0.1	6.4± 0.1	
Aw	nd	nd	1.0± 0.0	1.0± 0.0	
Density (g/L)	1028.3± 0.8	1028.3± 1.6	nd	nd	
Moisture (%)	86.8± 1.1	87.7± 1.2	63.4± 4.2	66.9± 5.1	
Ash (g/100g ww)	0.6± 0.06	0.6± 0.08	1.5± 0.2	1.5± 0.1	
Protein (g/100g ww)	3.1± 0.3 ^a	2.7± 0.4 ^b	12.4± 1.7	11.2± 1.8	
Total fat (g/100g ww)	5.4± 0.8 ^a	4.8± 0.5 ^b	19.8± 3.4	17.3± 3.5	
Colour	L*	92.0± 3.8	90.0± 2.0	93.1± 0.6 ^a	94.0± 0.1 ^b
	a*	-1.1± 2.2	0.007± 1.0	-0.1± 0.2 ^a	-0.4± 0.1 ^b
	b*	9.3± 3.9	11.0± 2.2	4.7± 2.4	4.1± 0.1
	ΔE	18.0± 3.8 ^a	22.0± 2.2 ^b	14.0± 2.7 ^a	25.8± 0.1 ^b

n: number of analysed samples, *sd*: standard deviation, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) between rainy and dry season, L*: lightness, a*: green/red index, b*: blue/yellow index, ΔE: overall colour difference, ww: wet weight, nd: not determined

Among the fatty acids quantifiable in all analysed samples, palmitic acid content in fat milk samples was significantly higher during the rainy season compared to the dry season while the lauric and myristic acids contents were significantly higher during the dry season compared to the rainy season in both milk and WG samples (Table 2). Total SFA (Saturated Fatty Acids) was also higher in milk sampled during the rainy season, and two of them (behenic and arachidic acids) were found only in rainy season milk samples. During the dry season, elaidic acid was higher in milk but lower in WG, compared to rainy season, while oleic acid was higher in WG but no significant difference was recorded in milk (Table 2). Most of the PUFA (Polyunsaturated Fatty Acids) tested were not detected except linoleic (LA), rumenic, alpha-linolenic (ALA), stearidonic, and eicosapentaenoic (EPA) acids. LA content in milk fat was similar while its content in WG fat was higher in dry season compared to the rainy season. ALA and stearidonic acids were found only in milk collected during the dry season in low amount (1 and 0.5 % of total fatty acids, respectively) (Table 2).

Most of the essential minerals content were present in all milk and WG samples analysed and did not significantly change neither in milk, nor in WG, produced during the rainy season compared to those produced during the dry season (Table 3). Copper was found at levels close to 1 mg/kg dw in 2 (out of 6) and 5 (out of 6) rainy and dry season milk samples, respectively, while in WG, it was found in all samples, in higher amount in the dry season samples than in the rainy season ones (Table 3). Selenium was only found in 2 rainy season WG samples.

Table 2: Seasonal variation of fresh milk and Wagashi Gassirè fatty acids composition (mean±sd).

	Fatty acids (g/100g total fatty acids)	Milk				Wagashi Gassirè			
		Rainy (n=12)	N	Dry (n=12)	N	Rainy (n=12)	N	Dry (n=12)	N
SFA	Capric acid (C10:0)	2.7±0.4 ^a	5	2.2± 0.3 ^b	12	2.3± 0.4	11	2.2± 0.5	9
	Lauric acid (C12:0)	1.8± 0.4 ^a	12	2.7± 0.4 ^b	12	2.2± 0.2 ^a	12	2.8± 0.3 ^b	12
	Tridecanoic acid (C13:0)	2.2± 0.6	5	2.7± 0.0	3	2.6± 0.6	7	2.7± 0.1	3
	Myristic acid (C14:0)	9.0± 0.6 ^a	12	9.8± 0.8 ^b	12	8.6± 0.7 ^a	12	10.2± 1.1 ^b	12
	Palmitic acid (C16:0)	31.6± 3.1 ^a	12	27.5± 3.2 ^b	12	29.7± 2.7	12	28.1± 5.0	12
	Heptadecanoic acid (C17:0)	0.8± 0.1	12	0.8± 0.0	6	0.7± 0.0 ^a	11	1.0± 0.0 ^b	6
	Stearic acid (C18:0)	17.4± 1.4	12	17.8± 1.4	12	18.2± 1.4	12	17.0± 2.0	12
	Arachidic acid (C20:0)	0.5± 0.0	12	<LOQ	0	0.5± 0.0	6	0.5± 0.0	2
	Behenic acid (C22:0)	0.7± 0.0	10	<LOQ	0	0.7± 0.1	10	0.6± 0.0	2
	Lignoceric acid (C24:0)	2.8± 1.4	12	3.1± 1.2	12	2.6± 0.7	12	2.8± 0.6	12
MUFA	Palmitoleic acid (C16:1)	1.8± 0.1	12	2.2± 0.7	12	2.0± 0.7	12	2.2± 0.6	9
	cis-10-heptadecenoic acid (C17:1)	<LOQ		<LOQ		<LOQ		<LOQ	
	Elaidic acid (C18:1,9t)	3.3± 1.0 ^a	12	4.6± 0.6 ^b	12	4.1± 0.6 ^a	12	3.2± 0.6 ^b	12
	Oleic acid (C18:1,9c)	27.2± 2.0	12	26.6± 3.1	12	25.4± 1.2 ^a	12	28.7± 3.3 ^b	12
	Cis-vacenic acid (C18:1,11c)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Erucinic acid (C22:1)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
PUFA	Linoleic acid (LA, C18:2,9c,12c, n-6)	1.5± 0.2	3	1.5± 0.4	11	1.5± 0.0 ^a	5	1.9 0.2 ^b	12
	Linolelaidic acid (C18:2,9t,12t, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Rumenic acid (C18:2,9c,11t, n-6)	1.8*	1	1.1± 0.2	2	1.2± 0.1	2	<LOQ	0
	Isolinoleic acid (C18:2,9t,11t, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	γlinolenic acid (C18:3, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Eicosadienoic acid (C20:2, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Arachidonic acid (C20:4, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	αlinolenic acid (ALA, C18:3, n-3)	<LOQ	0	1.0± 0.0	2	1.2± 0.0	3	<LOQ	0
	Stearidonic acid (C18:4, n-3)	<LOQ	0	0.5± 0.0	2	0.6*	1	<LOQ	0
Eicosatrienoic acid (C20:3, n-3)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	

Eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5, n-3)	0.1± 0.01	3	<LOQ	0	1.0± 0.3	3	<LOQ	0
Docosapentaenoic acid (DPA, C22:5, n-3)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6, n-3)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
ΣSFA (g/100g total fat)	66.9± 1.9 ^a	-	64.5± 2.8 ^b	-	66.9± 3.1	-	64.3± 4.0	-
ΣMUFA (g/100g total fat)	32.4± 1.3	-	33.5± 2.7	-	31.5± 2.9	-	33.7± 4.0	-

N: number of samples in which the fatty acid was detected and quantified, *n*: number of analysed samples, *sd*: standard deviation, *SFA*: Saturated Fatty Acids, *MUFA*: Monounsaturated Fatty Acids, *PUFA*: Polyunsaturated Fatty Acids, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) between rainy and dry season, <LOQ: 0.1% of total fatty acids, *individual value, Means are calculated for samples in which the fatty acid was > LOQ

Table 3: Seasonal variation of fresh milk and Wagashi Gassirè essential minerals composition (mean±sd).

Essential minerals (mg/kg dw)	Milk				Wagashi Gassirè			
	Rainy (n=6)	N	Dry (n=6)	N	Rainy (n=6)	N	Dry (n=6)	N
Calcium (Ca)	9603± 1297	6	8817± 1143	6	12530± 1343	6	12739± 923	6
Copper (Cu)	0.7± 0.2	2	0.6± 0.1	5	0.6± 0.1 ^a	6	1.0± 0.2 ^b	6
Iron (Fe)	2.4± 0.6	6	2.4± 1.1	6	4.8± 1.0	6	7.1± 6.0	6
Magnesium (Mg)	698± 83	6	732± 90	6	553± 22	6	520± 31	6
Manganese (Mn)	0.2± 0.0	6	0.2± 0.0	6	0.5± 0.2	6	0.8± 0.3	6
Molybdenum (Mo)	0.10± 0.03	6	0.10± 0.01	6	0.06± 0.01	6	0.06± 0.01	6
Phosphorus (P)	6602± 540	6	7284± 644	6	7146± 595	6	7315± 1020	6
Potassium (K)	724± 121	6	870± 180	6	257± 65	6	259± 33	6
Selenium (Se)	<LOQ	0	<LOQ	0	0.2± 0.0	2	<LOQ	0
Sodium (Na)	1489± 195	6	1714± 324	6	609± 108	6	596± 92	6
Zinc (Zn)	32± 4	6	25± 10	6	50± 8	6	48± 3	6

Ni: number of samples in which the mineral was detected and quantified, *n*: number of analysed samples, *sd*: standard deviation, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) between rainy and dry season, LOQ: see Table S3, dw: dry weight, Means are calculated for samples in which the mineral was > LOQ

No significant differences were observed between levels of metallic trace elements found in WG produced during both rainy and dry seasons (except for arsenic), while significantly lower concentrations ($P<0.05$) of boron, lithium, and thallium were observed in the rainy season milk samples compared to the dry season ones, but these chemicals were present at very low levels (Table S1). The proportion of milk samples contaminated with AFM1 was significantly lower ($P<0.0001$) during the rainy season (3/12 analysed samples) than during the dry season (12/12). However, AFM1 content of the rainy season milk samples ($0.1\pm 0.2 \mu\text{g/kg dw}$) was significantly lower ($P<0.05$) than that of the dry season ($0.4\pm 0.4 \mu\text{g/kg dw}$) (Table S1).

3.3. Regional variation of physicochemical characteristics, nutritional composition, and chemical hazards content of cow milk and Wagashi Gassirè

Regarding pH, Aw, density, ash, and colour parameters, no significant differences were observed between the Nikki and Dassa regions for both milk and WG (Table 4). Water content was higher in milk and WG produced in Dassa (87.9 ± 1.3 and 68.6 ± 3.8 %, respectively) than in those produced in Nikki (86.7 ± 0.7 and 61.7 ± 3.1 %, respectively, $P<0.01$), while proteins were more abundant ($P<0.05$) in milk and WG samples from Nikki (3.1 ± 0.3 and 13.0 ± 1.1 g/100g ww respectively) than that from Dassa (2.6 ± 0.4 and 10.6 ± 1.6 g/100g ww respectively) (Table 4). No significant difference was observed for the fat content in milk samples from both regions, while it was higher ($P<0.05$) in WG samples from Nikki (20.9 ± 2.9 g/100g ww) than from Dassa (16.2 ± 2.6 g/100g ww) (Table 4).

Table 4: Regional variation of fresh milk and Wagashi Gassirè physico-chemical characteristics and proximal composition (mean \pm sd).

Physico-chemical and proximal parameters	Milk		Wagashi Gassirè		
	Dassa (n=12)	Nikki (n=12)	Dassa (n=12)	Nikki (n=12)	
pH	6.5 \pm 0.06	6.5 \pm 0.08	6.5 \pm 0.1	6.4 \pm 0.1	
Aw	nd	nd	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	
Density (g/L)	1028.0 \pm 1.2	1029.0 \pm 1.4	nd	nd	
Moisture (%)	87.9 \pm 1.3 ^a	86.7 \pm 0.7 ^b	68.6 \pm 3.8 ^a	61.7 \pm 3.1 ^b	
Ash (g/100g ww)	0.6 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	1.4 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	
Protein (g/100g ww)	2.6 \pm 0.4 ^a	3.1 \pm 0.3 ^b	10.6 \pm 1.6 ^a	13.0 \pm 1.1 ^b	
Total fat (g/100g ww)	5.1 \pm 0.5	5.1 \pm 0.9	16.2 \pm 2.6 ^a	20.9 \pm 2.9 ^b	
Colour	L*	90.0 \pm 2.5	92.0 \pm 3.4	93.6 \pm 0.5	93.5 \pm 0.7
	a*	-0.4 \pm 1.9	-0.7 \pm 1.7	-0.2 \pm 0.2	-0.3 \pm 0.2
	b*	11.0 \pm 2.8	9.4 \pm 3.5	4.2 \pm 0.6	4.7 \pm 2.3
	ΔE	20.0 \pm 2.8	20.0 \pm 4.2	19.5 \pm 6.5	20.3 \pm 6.2

n: number of analysed samples, *sd*: standard deviation, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P<0.05$) between Dassa and Nikki, *L**: lightness, *a**: green/red index, *b**: bleu/yellow index, ΔE : overall colour difference, *ww*: wet weight, *nd*: not determined

The proportion of the most abundant fatty acid in milk and WG, i.e. palmitic acid, was not significantly different in products from Dassa or Nikki (Table 5). For the second major fatty acid (oleic acid), no difference was observed in WG, but a higher content was observed in milk from Dassa compared to the milk from Nikki (Table 5). Linoleic acid was found more often in milk and WG samples from Dassa (in 9 and 10 samples out of 12, respectively) than in those from Nikki (in 5 and 7 samples out of 12, respectively) (Table 5). WG samples from Nikki were richer in copper than those from Dassa, while the magnesium, potassium and sodium contents of WG samples were significantly higher in Dassa than in Nikki (Table 6).

Regarding chemical hazards, it was observed that strontium was present in all milk and WG samples with a higher concentration ($P < 0.05$) in samples from Nikki than in those from Dassa (Table S2). High amounts of tryptamine were observed in all WG samples from Dassa (27.3 ± 3.5 mg/kg dw) compared to Nikki (21.5 ± 2.1 mg/kg dw).

Table 5: Regional variation of fresh milk and Wagashi Gassirè fatty acids composition (mean±sd).

Fatty acids (g/100g total fatty acids)	Milk				Wagashi Gassirè				
	Dassa (n=12)	N	Nikki (n=12)	N	Dassa (n=12)	N	Nikki (n=12)	N4	
SFA	Capric acid (C10:0)	2.2±0.3	7	2.5± 0.4	10	2.1± 0.4	11	2.5± 0.4	9
	Lauric acid (C12:0)	2.2± 0.8	12	2.3± 0.4	12	2.5± 0.3	12	2.5± 0.4	12
	Tridecanoic acid (C13:0)	2.5± 0.9	2	2.3± 0.4	6	2.9± 0.3 ^a	5	2.2± 0.4 ^b	5
	Myristic acid (C14:0)	9.5± 0.8	12	9.4± 0.7	12	9.2± 1.4	12	9.6± 0.9	12
	Palmitic acid (C16:0)	30.1± 3.5	12	29.0± 3.9	12	28.5± 4.1	12	29.3± 4.2	12
	Heptadecanoic acid (C17:0)	0.9± 0.1 ^a	7	0.8± 0.0 ^b	11	0.8± 0.0	6	0.8± 0.1	11
	Stearic acid (C18:0)	16.9± 1.2 ^a	12	18.4± 1.0 ^b	12	17.2± 1.7	12	18.1± 1.8	12
	Arachidic acid (C20:0)	0.6± 0.0 ^a	6	0.4±0.0 ^b	6	<LOQ	0	0.5± 0.0	8
	Behenic acid (C22:0)	0.7± 0.0	5	0.6±0.0	5	0.7± 0.1	5	0.7± 0.0	7
	Lignoceric acid (C24:0)	3.1± 1.7	12	2.8± 0.7	12	2.8± 0.7	12	2.6± 0.7	12
MUFA	Palmitoleic acid (C16:1)	2.1± 0.4	12	2.0± 0.6	12	2.5± 0.7 ^a	10	1.8± 0.4 ^b	11
	cis-10-heptadecenoic acid (C17:1)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Elaidic acid (C18:1,9t)	3.6± 1.3	12	4.3± 0.7	12	3.7± 0.9	12	3.6± 0.5	12
	Oleic acid (C18:1,9c)	28.2± 2.1 ^a	12	25.6± 2.3 ^b	12	27.4± 2.9	12	26.6± 3.0	12
	Cis-vaccenic acid (C18:1,11c)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Erucinic acid (C22:1)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
PUFA	Linoleic acid (LA, C18:2,9c,12c, n-6)	1.3± 0.2 ^a	9	1.8± 0.4 ^b	5	1.6± 0.2 ^a	10	2.0 0.3 ^b	7
	Linolelaidic acid (C18:2,9t,12t, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Rumenic acid (C18:2,9c,11t, n-6)	<LOQ	0	1.3± 0.4	3	1.2± 0.1	2	<LOQ	0
	Isolinoleic acid (C18:2,9t,11t, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	γlinolenic acid (C18:3, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Eicosadienoic acid (C20:2, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Arachidonic acid (C20:4, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	αlinolenic acid (ALA, C18:3, n-3)	<LOQ	0	1.0± 0.0	2	1.2± 0.0	3	<LOQ	0
	Stearidonic acid (C18:4, n-3)	<LOQ	0	0.5± 0.0	2	0.6*	1	<LOQ	0
	Eicosatrienoic acid (C20:3, n-3)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0

Eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5, n-3)	<LOQ	0	0.1±0.01	3	1.0± 0.3	3	<LOQ	0
Docosapentaenoic acid (DPA, C22:5, n-3)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6, n-3)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
Σ SFA (g/100g total fat)	64.8± 2.5	-	66.6± 2.6	-	64.4± 3.3	-	66.8± 3.9	-
Σ MUFA (g/100g total fat)	34.1± 2.1 ^a	-	31.9± 1.6 ^b	-	33.3± 3.4	-	31.9± 3.2	-

N: number of samples in which the fatty acid was detected and quantified, *n*: number of analysed samples, *sd*: standard deviation, *SFA*: Saturated Fatty Acids, *MUFA*: Monounsaturated Fatty Acids, *PUFA*: Polyunsaturated Fatty Acids, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P<0.05$) between Dassa and dry Nikki, <LOQ: 0.1% of total fatty acids, *individual value, Means are calculated for samples in which the fatty acid was > LOQ

Table 6: Regional variation of fresh milk and Wagashi Gassirè essential minerals composition (mean±sd).

Essential minerals (mg/kg dw)	Milk				Wagashi Gassirè			
	Dassa (n=6)	N	Nikki (n=6)	N	Dassa (n=6)	N	Nikki (n=6)	N
Calcium (Ca)	8762± 314	6	9658± 1668	6	12203± 1355	6	13066± 630	6
Copper (Cu)	0.6± 0.1	2	0.6± 0.1	5	0.6± 0.1 ^a	6	0.9± 0.2 ^b	6
Iron (Fe)	2.4± 1.0	6	2.4± 0.7	6	6.5± 6.3	6	5.4± 0.7	6
Magnesium (Mg)	681± 79	6	749± 82	6	555± 25 ^a	6	518± 24 ^b	6
Manganese (Mn)	0.2± 0.0	6	0.2± 0.0	6	0.6± 0.3	6	0.7± 0.2	6
Molybdenum (Mo)	0.10± 0.02 ^a	6	0.10± 0.00 ^b	6	0.06± 0.01	6	0.05± 0.01	6
Phosphorus (P)	6909± 736	6	6977± 664	6	6916± 1062	6	7546± 215	6
Potassium (K)	724± 144	6	871± 161	6	287± 51 ^a	6	229± 27 ^b	6
Selenium (Se)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	0.2±0.02	2
Sodium (Na)	1534± 307	6	1669± 262	6	666± 83 ^a	6	539± 60 ^b	6
Zinc (Zn)	27± 3	6	29± 11	6	47± 5	6	52± 6	6

N: number of samples in which the mineral was detected and quantified, *n*: number of analysed samples, *sd*: standard deviation, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P<0.05$) between Dassa and Nikki, LOQ: see Table S3, dw: dry weight, Means are calculated for samples in which the mineral was > LOQ

4. Discussion

4.1. Impact of season and region on the nutritional composition of milk and Wagashi Gassirè

Seasonal and regional variations of milk and dairy products components are mainly related to changes in the availability and quality of pasture during the year and other feedstuffs used in cow feeding (Johansen et al., 2002; Nudda et al., 2005). In the present study, season and region affected significantly the milk and WG components.

4.1.1. Impact of season and region on the protein and fat contents

The milk samples from the rainy season showed higher protein and fat contents compared to the dry season. This suggests the feed resources available for the cattle during the rainy season in Benin are low in fiber and ALA but high in carbohydrates in comparison to the dry season. Indeed, low fiber and high carbohydrates in feed resources were associated to high proteins content in milk while low ALA in feed resources was associated to high fat content in milk (Heck et al., 2009; Johansen et al., 2002). In addition, ALA was not detected in rainy milk samples. Feed resources in Nikki may be concentrated in carbohydrates in comparison to Dassa as milk samples from Nikki showed higher proportion of protein content. In Nikki, cattle feeding is predominantly based on herbaceae in the rainy season. In the cold dry season, animals are fed with crop residues from sorghum, maize, soybean and cowpea. When crop residues become scarce in the hot dry season, the animals are fed on woody species (Dahouda et al., 2019). There is thus a difference in composition in natural pastures between the different climatic seasons of the year in the different regions included in this study. The implications of these compositional differences are not known at the physicochemical level (Babatounde et al., 2011). However, seasonal differences in protein and fat contents of the milk samples of the present study did not affect the protein and fat contents of the corresponding WG samples. Moreover, the WG from Nikki is richer in protein than those produced in Dassa. This would be related to the high protein concentration of the Nikki milk samples compared to those from Dassa.

4.1.2. Impact of season and region on the fatty acids profile

Among the main cow milk components, fat shows the highest variations (Capuano et al., 2014; Heck et al., 2009; Tyasi et al., 2015). The SFA content in milk samples of this study was significantly higher during the rainy season compared to the dry season. However, this variation did not affect the corresponding WG. In the USA, averages for SFA in cow milk were similar among regions and across seasons (O'Donnell-Megarò et al., 2011). In contrast, a wide seasonal variation was observed in SFA of milk fat in samples from Swedish and Dutch dairy plants (Heck et al., 2009; Lindmark-Mansson et al., 2003). Lock and Garnsworthy (2002) reported rumenic acid and short-chain fatty acids concentrations in milk from UK to be higher in May, June, July (end of spring, beginning of summer) than other months. From the eighteen fatty acids detected in the milk samples of this study, five showed

seasonal (capric, lauric, myristic, palmitic, and elaidic acids) and regional variation (heptadecanoic, stearic, arachidic, oleic, and linoleic acids) indicating low fatty acids variability in the milk samples analysed. Moreover, the WG samples showed low regional variability (three out of eighteen fatty acids detected) in comparison to the milk samples. The seasonal patterns in concentrations of the individual fatty acids of milk were most likely the result of many interdependent factors such as the supply of fatty acids through the diet and the rumen microbial metabolism (Heck et al., 2009). For example, fresh grass is rich in ALA, and increasing the dietary fresh grass content generally increases ALA concentration of the diet and consequently increases milk fat concentrations of stearic, oleic, rumenic acids and decreases concentrations of de novo synthesized shorter chain fatty acids (Elgersma et al, 2006; Larsen et al., 2010). For the present study, regional variation was observed for oleic acid in milk (Dassa > Nikki) indicating that cattle would be fed more forages from natural pastures in Dassa than Nikki (Babatoude et al., 2011; Capuano et al., 2014). In addition, the diet indirectly influences the fatty acid composition of milk by altering the rumen bacterial populations or their metabolism. It is the case of long-chain fatty acids, which are derived almost exclusively from the diet, as such or after biohydrogenation in the rumen by the local microflora (Capuano et al., 2014; Heck et al., 2009).

4.1.3. Impact of season and region on the essential minerals content

The mineral composition of cow milk is expected to undergo only minor changes over the course of the year (de la Fuente and Juarez, 2015). For example, concentrations of calcium and magnesium in milk are highly heritable and only marginally influenced by diet (Haug et al., 2007; Schwendel et al., 2015). Thus, the effect of season and region should be minimal on the essential minerals detected in the milk samples of this study. Indeed, no seasonal variation was observed for milk samples regarding the essential minerals contents while molybdenum was the only essential mineral with a regional variation. The same is true for the essential minerals detected in the WG samples, which showed little seasonal variation (one out of eleven essential minerals detected). However, more important regional variation was observed for essential minerals of WG samples and concerns copper, magnesium, potassium, and sodium. In Sweden, seasonal variation were reported for calcium, potassium, and phosphorus content in milk while no regional variation was observed (Lindmark-Mansson et al., 2003). In South Africa, Nantapo and Muchenje (2013) observed a significant difference in the concentration of most minerals except calcium and potassium in milk. Winter milk had higher values for copper, iron, magnesium, manganese, zinc, and sodium while phosphorus was higher in spring milk. These authors attributed the variation of the mineral to the animal feeding behavior and changes in pasture composition with more succulent, less fibrous (thus ash) material being available for the animal in spring than in winter months. This contrasts with the findings of Heck et al (2009). For these authors, the winter diet is generally associated with lower levels of fiber. These contradictory results could be explained by the different locations where these studies were conducted: South Africa (Nantapo and Muchenje, 2013) and the Netherlands (Heck et al., 2009).

4.2. Impact of season and region on the chemical hazards content of milk and Wagashi Gassirè

4.2.1. Impact of season and region on dioxins and metallic trace elements

Dioxins and metallic trace elements, such as lead and arsenic, are environmental contaminants found in foodstuffs. They are found in the environment both from natural occurrence and from anthropogenic activity (EFSA, 2009, 2010, 2018). These chemical hazards found in milk and WG samples of this study are expected to undergo only minor changes regarding the season and the region (de la Fuente and Juarez, 2015). Among the six metallic trace elements detected in all milk and WG samples of this study, one metal (strontium) detected in milk samples and three metals (barium, mercury, and strontium) detected in WG samples showed a regional variation. According to season, two metals (boron and lithium) metals found in milk samples presented a variation. No seasonal or regional variation was observed for dioxin contents. The average lead contamination of milk and WG observed in the present study were lower than the maximum level set by the Beninese legislation (MAEP, 2007), European Commission Regulation (EC, 2023), and Codex General Standard (FAO/WHO, 2019) i.e. 0.02 mg/kg in milk and dairy products. Moreover, dioxins were found below the maximum level set by the Beninese legislation (MAEP, 2007) i.e. 6 pg TEQ/g, and the European Commission Regulation (EC, 2023) i.e. 4 pg TEQ/g fat for dioxins in milk and dairy products. Processors involved in this study did not have a dedicated production room and the existing rooms were not protected against rain, dust, and wind (Dossou et al., 2022). In such an environment, dust could be a source of lead, arsenic, or dioxin contamination because they deposit on WG during production. For dioxins, the smoke produced when burning wood could also be a source of dioxin emissions and cheese contamination. Furthermore, the trace metal contamination may be related to the materials used for WG production. In this study, the production equipment consisted into sieves with iron filters, plastic colanders, aluminium cooking pots, and plastic material (Dossou et al., 2022). Aluminium, lead, and other metals leach from cookware during cooking increasing metal exposure through food consumption (Weidenhamer et al., 2017; Jitaru et al., 2019).

4.2.1. Impact of season and region on aflatoxin M1 content

The potential presence of AFM1 in WG samples is due to the contamination of feed eaten by lactating cows with aflatoxin B1 (AFB1) and its subsequent biotransformation into AFM1 excreted in the milk (Khaneghah et al., 2021; Zinedine et al., 2021). In the present study, the AFM1 concentrations in milk samples from dry season and Dassa were significantly higher ($P < 0.05$) than those obtained in rainy season and from Nikki. This suggests the feed resources available for the cattle during the dry season in Dassa are most contaminated with AFB1. Indeed, the literature reported higher concentration of AFM1 in milk in dry periods or during winter due to the greater amounts of mixed supplementary feedstuff, dry hay, and corn contaminated with high levels of AFB1 used for feeding cattle (Bahrami et al., 2016). In Nikki as in Dassa, animals are fed with crop residues and woody species in dry season (Dahouda et

al., 2019). The AFM1 content found in this study is lower than the maximum level set by the Beninese legislation (MAEP, 2007), Eu-ropean Commission Regulation (EC, 2023) i.e. 0.05 µg/kg, and that of the Codex general standard (FAO/WHO, 2019) i.e. 0.5 µg/kg in raw milk.

Conclusion

This work indicated that the type of milk, geographical region, and season of production were factors in contributing to the differences in WG composition in Benin. The fatty acids profile of milk varies according to the season and the region. Particularly notable were the differences in the magnesium, potassium, sodium and copper contents of WG between the two regions. These results contribute to the nutritional characterisation of milk and WG from Benin and are of significant importance in the scope of the WG standardisation.

References

- Aïssi VM, Soumanou MM, Bankolè H, Toukourou F, de Souza CA. 2009. Evaluation of hygienic and mycological quality of local cheese marketed in Benin. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3(3): 2397-2404.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 1995. *Official methods of analysis*. 16th edition. Washington DC, USA: AOAC.
- Baba-Moussa F, Baba-Moussa L, Ahissou H, Bokossa I, Capo-Chichi B, Toukourou F, Sanni A. 2007. Propriétés coagulantes de *Calotropis procera* et ses possibilités d'utilisation en industrie agro-alimentaire. *Revue Cames*. 5:7-12.
- Babatoundé S, Sidi H, Houinato M, Oumorou M, Mensah GA, Sinsin BA. 2011. Valeur alimentaire des fourrages consommés par les taurillons Borgou sur les parcours naturels du centre du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 5(6): 2382-2394.
- Bahrami R, Shahbazi Y, Nikousefat Z. 2016. Aflatoxin M1 in milk and traditional dairy products from west part of Iran: Occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure. *Food Control*. 62 :250-256. doi :10.1016/j.foodcont.2015.10.039.
- Capuano E, van der Veer G, Boerrigter-Eenling R, Elgersma A, Rademaker J, Sterian A, van Ruth SM. 2014). Verification of fresh grass feeding, pasture grazing and organic farming by cows farm milk fatty acid profile. *Food Chemical*. 164:234-241. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.011.
- Dahouda, M., Boubacar, A. M. Y., Dossa, L. H., Dotche, O. I., Ahounou, S. G., Kiki, S. P., & Issaka, Y. A. K. (2019). Stratégies d'alimentation et gestion des ressources alimentaires dans les élevages bovins des Communes de Nikki, Kalalé et N'Dali au Nord Est Bénin. *Revue Internationale des Sciences Appliquées*, 2, 48-70.
- de la Fuente MA, Juárez M. 2015. Milk and dairy products. In: de la Guardia M, Garrigues S, editors. *Handbook of mineral elements in Food*. Oxford: John Wiley and Sons; p. 645-668.

- Dossou J, Adote S, Soulé H. 2006. Production et transformation du lait frais en fromage peulh au Bénin, Rapport de guide de bonnes pratiques. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Dossou WA, Seko Orou BMT, Komagbe G, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, et al. 2022. Processing and preservation methods of Wagashi Gassirè, a traditional cheese produced in Benin. *Heliyon*. 8, Article e10605. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e10605.
- Douny C, Benmedjadi S, Brose F, Iko Afé OH, Igout A, Hounhouigan DJ, Anihouvi VA, Scippo ML. 2019. Development of an analytical method for the simultaneous measurement of 10 biogenic amines in meat: application to Beninese grilled pork samples. *Food Analytical Methods*. 12:2392–2400. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.06.013.
- Douny C, El Khoury R, Delmelle J, Brose F, Degand G, Moula N, Farnir F, Clinquart A, Maghuint-Rogister G, Scippo ML. 2015. Effect of storage and cooking on the fatty acids profile of omega-3 enriched eggs and pork meat marketed in Belgium. *Food Science and Nutrition*. 3(2):140-52. doi:10.1002/fsn3.197.
- EC (European Commission). 2023. Commission regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. Brussels: EC.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2009. Scientific opinion on arsenic in food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2009.1351.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Scientific opinion on lead in food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2010.1570.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2018. Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2018.5333.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2019. Dietary reference values for the EU. <https://multimedia.efsa.europa.eu/drvs/index.htm?lang=en>. Assessed 2023 June 30.
- Elgersma A, Tamminga S, Ellen G. 2006. Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*. 131: 207-225. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.012.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2019. General standard for contaminants and toxins in food and feed CODEX STAN 193-1995. Rome: FAO/WHO
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226(1):497-509.
- Gobert S, Pasqualini V, Dijoux J, Lejeune P, Durieux EDH, Marengo M. 2017. Trace element concentrations in the apex predator swordfish (*Xiphias gladius*) from a Mediterranean fishery and risk assessment for consumers. *Marine Pollution Bulletin*. 120:364-369. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.05.029.

- Guinee TP, Gorry CB, O'Callaghan DJ, O'Kennedy BT, O'Brien N, Fenelon MA. 1997. The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation properties of milk. *International Journal of Dairy Technology*. 50:99–106.
- Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. 2007. Bovine milk in human nutrition-a review. *Lipids Health Diseases*. 6,25. doi:10.1186/1476-511X-6-25.
- Heck JML, van Valenberg HJF, Dijkstra J, van Hooijdonk ACM. 2009. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science*. 92:4745-4755. doi:10.3168/jds.2009-2146.
- ISO (International Organization for Standardization). 2014. Milk and milk products-Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation ISO 8968-1:2014. Geneva, Switzerland: ISO.
- ISO (International Organization for Standardization). 2017. Foodstuffs-Determination of water activity. ISO 18787:2017. Geneva, Switzerland: ISO.
- Jitaru P, Ingenbleek L, Marchonda N, Laurenta C, Adegboye A, Hossou SE, Koné AZ, Oyedele AD, Kisito CSKJ, Dembélé YK, et al. 2019. Occurrence of 30 trace elements in foods from a multi-centre Sub-Saharan Africa Total Diet Study: Focus on Al, As, Cd, Hg, and Pb. *Environment International*. 133, 105197. doi:10.1016/j.envint.2019.105197.
- Johansen AG, Vegarud GE, Skeie S. 2002. Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-type and Dutch-type cheeses. *International Dairy Journal*. 12:621-629. doi:10.1016/S0958-6946(02)00054-7.
- Khaneghah AM, Moosavi M, Omar SS, Oliveira CAF, Karimi-Dehkordi M, Fakhri Y, Huseyn E, Nematollahi A, Farahani M, Sant'Ana AS. 2021. The prevalence and concentration of aflatoxin M1 among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Food Control*. 125, 107960. doi:10.1016/j.foodcont.2021.107960.
- Larsen MK, Nielsen JH, Butler G, Leifert C, Slots T, Kristiansen GH, Gustafsson AH. 2010. Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. *Journal of Dairy Science*. 93:2863-2873. doi:10.3168/jds.2009-2953.
- Lindmark-Mansson H, Fonden R, Pettersson HE. 2003. Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal*. 13:409-425. doi:10.1016/S0958-6946(03)00032-3.
- Lock AL, Garnsworthy PC. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and delta9-desaturase activity in dairy cows. *Livestock Production Science*. 79:47-59. doi:10.1016/S0301-6226(02)00118-5.
- MAEP (Ministère de l'Agriculture de l'Élevage et de la Pêche). 2014. Etude des filières lait et viande, Rapport définitif sur la filière lait (PAFILAV). Cotonou : MAEP.
- MAEP (Ministère de l'Agriculture de l'Élevage et de la Pêche). 2007. Arrêté N° 0362/ MAEP/D-CAB/SGM/DRH/DP/SA du 30 octobre 2007 de fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en République du Bénin. Cotonou: MAEP.

- Mattiello S, Caroprese M, Matteo CG, Fortina R, Martini A, Martini M, Parisi G, Russo C, Zecchinia M. 2018. Typical dairy products in Africa from local animal resources. *Italian Journal of Animal Science*. 15(19):740-754. doi:10.1080/1828051X.2017.1401910.
- Nantapo CTW, Muchenje V. 2013. Winter and spring variation in daily milk yield and mineral composition of Jersey, Friesian cows and their crosses under a pasture-based dairy system. *South African Journal of Animal Science*. 43:17-21. doi:10.4314/sajas.v43i5.3.
- Nudda A, McGuire MA, Battacone G, Pulina G. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and ricotta. *Journal of Dairy Science*. 88(4):1311-1319. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72797-1.
- O'Donnell-Megaró AM, Barbano DM, Bauman DE. 2011. Survey of the fatty acid composition of retail milk in the United States including regional and seasonal variations. *Journal of Dairy Science*. 94:59-65. doi:10.3168/jds.2010-3571.
- Rayanatou IA. 2017. Étude de la coagulation du lait par l'extrait de feuilles de *Calotropis procera* en réponse au contexte laitier dans la région de Maradi, au Niger. [Thèse de doctorat]. Bretagne : Université Bretagne Loire Agro Campus Ouest.
- Schwendel BH, Wester TJ, Morel PCH, Tavendale MH, Deadman C, Shadbolt NM, Otter DE. 2015. Invited review: Organic and conventionally produced milk-An evaluation of factors influencing milk composition. *Journal of Dairy Science*. 98 :721–746. doi : 10.3168/jds.2014-8389.
- Scippo ML, Eppe G, De Pauw E, Maghuin-Rogister G. 2004. DR-CALUX screening of food samples: evaluation of the quantitative approach to measure dioxin, furans and dioxin-like PCBs. *Talanta*. 63(5):1193-202. doi: 10.1016/j.talanta.2004.05.037.63.
- Seme K, Pitala W, Osseyi GE. 2015. Qualité nutritionnelle et hygiénique de laits crus de vaches allaitantes dans la région maritime au sud-Togo. *European Scientific Journal*. 11: 359-376.
- Sessou P, Farougou S, Yèhouenou B, Agbangnan P, Azokpota P, Issaka Y, Sohounhlou D. 2013. Investigation on aflatoxin M1 content of traditional cheese Wagashi produced in Benin. *African Journal of Food Science and Technology*. 4(4):76-79.
- Tyasi TL, Gxasheka M, Tlabela CP. 2015. Assessing the effect of nutrition on milk composition of dairy cows: A review. *International Journal of Current Science*.17:56-63.
- Weidenhamer JD, Fitzpatrick MP, Biro AM, Kobunski PA, Hudson MR, Corbin RW, Gottesfeld P. 2017. Metal exposures from aluminum cookware: An unrecognized public health risk in developing countries. *Sciences of the Total Environment*. 579:805-813. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.023.
- Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. 2013. Milk and dairy product composition. In: Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D, editors. *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome: FAO; p. 41-102.
- Zinedine A, Salah-Abbes JB, Tantaoui-Elaraki SA. 2021. Aflatoxin M1 in Africa: exposure assessment, regulations, and prevention strategies – a review. In : de Voogt P, editor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Switzerland: Springer Nature; p. 73-108. doi:10.1007/398_2021_73.

Supplementary data

Table S1: Seasonal variation of fresh milk and Wagashi Gassirè chemical hazard contents (LB mean±sd).

Chemical hazards	Milk				Wagashi Gassirè			
	Rainy	N	Dry	N	Rainy	N	Dry	N
Aluminium (Al)	<LOQ	0	1.4± 2.3	2	2.5± 2.0	4	8.3± 8.5	4
Arsenic (As)	0.13± 0.01	6	0.10± 0.01	6	0.04± 0.03 ^a	4	0.08± 0.01 ^b	6
Barium (Ba)	2.8± 0.7	6	2.9± 1.5	6	4.5± 1.2	6	5.7± 1.7	6
Beryllium (Be)	0.0030± 0.0040	4	0.0010± 0.0010	4	0.002*	1	0.002± 0.002	5
Boron (B)	0.20± 0.02 ^a	6	0.30± 0.07 ^b	6	0.02± 0.04	2	0.07± 0.04	5
Chromium (Cr)	0.1*	1	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
Cadmium (cd)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	0.004*	1
Lead (Pb)	0.02*	1	<LOQ	0	0.030± 0.040	4	0.020± 0.020	3
Lithium (Li)	0.08± 0.09 ^a	6	0.20± 0.09 ^b	6	0.04± 0.04	6	0.07± 0.04	6
Mercury (Hg)	0.0060± 0.0009	6	0.0050± 0.0010	6	0.0070± 0.0020	6	0.0080± 0.0020	6
Nickel (Ni)	0.10± 0.04	6	0.09± 0.03	6	0.20± 0.10	6	0.20± 0.03	6
Rubidium (Rb)	15.2± 9.1	6	19.4± 8.4	6	4.8± 1.8	6	5.5± 1.6	6
Strontium (Sr)	6.2± 1.3	6	7.5± 3.3	6	8.7± 1.4	6	12.6± 4.5	6
Thallium (Tl)	0.0002± 0.0003 ^a	3	0.0007± 0.0003 ^b	5	0.0002± 0.0002	3	0.0004± 0.0002	5
Uranium (U)	0.0004*	1	0.0006*	1	0.0003± 0.0004	3	0.0005± 0.0006	3
Tin (Sn)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	0.02*	1
Vanadium (V)	<LOQ	0	0.009*	1	0.008*	1	0.008± 0.010	3
Dioxins (pg BEQ/g fat, n=6)	1.3 – 1.6**	3	1.0 - 1.3**	5	1.1 - 1.8**	2	1.4 – 2.3**	3
Aflatoxin M1 (µg/kg dw, n=12)	0.10± 0.20 ^a	3	0.40± 0.40 ^b	12	0.2 - 0.3**	2	0.4 – 1.1**	5
Tryptamine (mg/kg dw, n=12)					23.6± 3.6	12	25.2± 4.5	12

Different superscripts in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) between rainy and dry season, BEQ: bioanalytical equivalent, LB: Lower bound, N: number of samples in which the chemical hazard was detected and quantified, n: number of analysed samples per season for each product, sd: standard deviation, LOQ (metallic trace elements): see Table S3, LOQ (dioxins): 0.9 pg BEQ/g fat, LOQ (aflatoxin M1): 0.03 µg/kg dw for milk and 0.2 µg/kg dw for WG, LOQ (tryptamine): 1.1 mg/kg dw, dw: dry weight, *individual value, ** minimum – maximum.

Table S2: Regional variation of fresh milk and Wagashi Gassirè chemical hazard contents (LB mean±sd).

Chemical hazards	Milk				Wgashi Gassirè			
	Dassa	N	Nikki	N	Dassa	N	Nikki	N
Aluminium (Al)	5.4*	1	3.2*	1	4.8± 8.9	3	5.9± 4.1	5
Arsenic (As)	0.10± 0.02	6	0.10± 0.01	6	0.08± 0.01	3	0.04± 0.03	4
Barium (Ba)	2.3± 0.3	6	3.4± 1.4	6	3.9± 0.8 ^a	6	6.4± 1.0 ^b	6
Beryllium (Be)	0.0020± 0.0010	5	0.0020± 0.0040	3	0.0009± 0.0010	2	0.0020± 0.0020	4
Boron (B)	0.20± 0.07	6	0.30± 0.10	6	0.07± 0.04	5	0.03± 0.05	2
Chromium (Cr)	<LOQ	0	0.1*	1	<LOQ	0	<LOQ	0
Cadmium (cd)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	0.004*	1
Lead (Pb)	<LOQ	0	0.02*	1	0.02*	1	0.05± 0.02	6
Lithium (Li)	0.10± 0.10	6	0.10± 0.10	6	0.08± 0.04	6	0.03± 0.03	6
Mercury (Hg)	0.0050± 0.0010	6	0.0060± 0.0009	6	0.0090± 0.0020 ^a	6	0.0060± 0.0010 ^b	6
Nickel (Ni)	0.10± 0.01	6	0.10± 0.06	6	0.10± 0.08	6	0.20± 0.04	6
Rubidium (Rb)	14.7± 11.3	6	19.9± 4.5	6	4.9± 2.1	6	5.4± 1.3	6
Strontium (Sr)	5.2± 0.7 ^a	6	8.4± 2.7 ^b	6	8.0± 1.0 ^a	6	13.2± 3.7 ^b	6
Thallium (Tl)	0.0002± 0.0003 ^a	2	0.0007± 0.0002 ^b	6	0.0002± 0.0002	3	0.0004± 0.0002	5
Uranium (U)	<LOQ	0	0.00010± 0.00020	2	0.00030± 0.00040	2	0.00050± 0.00050	4
Tin (Sn)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	0.02*	1
Vanadium (V)	0.009*	1	<LOQ	0	0.006± 0.010	2	0.003± 0.005	2
Dioxins (pg BEQ*/g fat, n=6)	1.2 – 1.6**	5	1.0 – 1.6**	3	1.1 – 2.3**	4	1.8*	1
Aflatoxin M1 (µg/kg dw, n=12)	0.50± 0.40 ^a	9	0.04± 0.06 ^b	6	0.40± 0.30	7	<LOQ	0
Tryptamine (mg/kg dw, n=12)					27.3± 3.5 ^a	12	21.5± 2.1 ^b	12

BEQ: bioanalytical equivalent, LB: Lower bound, N: number of samples in which the chemical hazard was detected and quantified, n: number of analysed samples per region for each product, sd: standard deviation, LOQ (metallic trace elements): see Table S3, LOQ (dioxins): 0.9 pg BEQ/g fat, LOQ (aflatoxin M1): 0.03 µg/kg dw for milk and 0.2 µg/kg dw for WG, LOQ (tryptamine): 1.1 mg/kg dw, dw: dry weight, *individual value, ** minimum – maximum.

Table S3: Limit of quantification (LOQ) for minerals.

Minerals	LOQ (mg/kg dw)		LOQ (mg/kg ww)	
	Milk	Wagashi Gassirè	Milk	Wagashi Gassirè
Lithium (Li)	0.00012	0.00012	0.00002	0.00004
Beryllium (Be)	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Boron (B)	0.05846	0.05846	0.00733	0.02070
Sodium (Na)	0.85893	0.85895	0.10774	0.30415
Magnesium (Mg)	1.15738	1.15741	0.14518	0.40983
Aluminium (Al)	2.88630	2.88638	0.36205	1.02204
Phosphorus (P)	7.55685	7.55705	0.94790	2.67589
Potassium (K)	0.08515	0.08515	0.01068	0.03015
Calcium (Ca)	4.88334	4.88348	0.61255	1.72920
Vanadium (V)	0.00600	0.00600	0.00075	0.00212
Chromium (Cr)	0.05305	0.05306	0.00665	0.01879
Iron (Fe)	1.13790	1.13794	0.14273	0.40293
Manganese (Mn)	0.01881	0.01881	0.00236	0.00666
Cobalt (Co)	0.00227	0.00227	0.00028	0.00080
Nickel (Ni)	0.00549	0.00549	0.00069	0.00194
Copper (Cu)	0.42409	0.42410	0.05320	0.15017
Zinc (Zn)	0.05914	0.05914	0.00742	0.02094
Arsenic (As)	0.03586	0.03587	0.00450	0.01270
Selenium (Se)	0.25724	0.25725	0.03227	0.09109
Rubidium (Rb)	0.00105	0.00105	0.00013	0.00037
Strontium (Sr)	0.04392	0.04392	0.00551	0.01555
Molybdenum (Mo)	0.01252	0.01252	0.00157	0.00443
Silver (Ag)	0.00378	0.00378	0.00047	0.00134
Cadmium (Cd)	0.00329	0.00329	0.00041	0.00116
Tin (Sn)	0.01280	0.01280	0.00161	0.00453
Antimony (Sb)	0.00777	0.00777	0.00097	0.00275
Barium (Ba)	0.01905	0.01905	0.00239	0.00674
Thallium (Tl)	0.00033	0.00033	0.00004	0.00012
Lead (Pb)	0.02447	0.02447	0.00307	0.00866
Bismuth (Bi)	0.01058	0.01058	0.00133	0.00375
Uranium (U)	0.00046	0.00046	0.00006	0.00016

dw: dry weight, ww: wet weight

ETUDE 3_Partie II :

Impact des technologies sur

la qualité du Wagashi

Gassirè produit au Bénin

Projet de publication en préparation

Physicochemical characteristics, nutritional composition, and chemical hazards content of Wagashi Gassirè cheese from three processing methods

Alphonse Wanignon Dossou^{*a,b,c}, Gwladys Komagbe^{d,e}, Baké Marie Thérèse Seko Orou^{f,g}, Stella Saizonou^c, Philippe Sessou^e, Abdou Karim Issaka Youssao^h, Souaïbou Farougou^e, Joseph Djidjoho Hounhouigan^c, Jacques Mahillon^d, Roch Mongbo^g, Marc Poncelet^f, Samiha Boutaleb^a, Sylvie Gobert^{i,j}, Yann Eméric Madode^c, Paulin Azokpota^c, Marie-Louise Scippo^a, Antoine Clinquart^b, Caroline Douny^a

^a*FARAH/Laboratory of Food Analysis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium*

^b*FARAH/Laboratory of Food Technology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium*

^c*Laboratory of Food Sciences and Technology, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^d*Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Faculty of Bioscience Engineering, Catholic University of Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium*

^e*Research Unit on Communicable Diseases, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^f*Observing Recomposing Worlds, Faculty of Social Sciences, University of Liège, Liège, Belgium*

^g*Laboratory of Analysis of Social Dynamics and Development Studies, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^h*Laboratory of Animal Biotechnology and Meat Technology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

ⁱ*Laboratoire d'Océanologie, Centre MARE, Université de Liège, Sart Tilman, B6c, 4000 Liège, Belgium*

^j*Station de Recherches Sous-marines et Océanographiques, Punta Revellata, BP33, 20260 Calvi, France*

**corresponding author: Alphonse Wanignon Dossou, dossoual6@gmail.com, 01 BP 2009 Cotonou, University of Abomey-Calavi, Benin Republic*

Abstract

In this study, the effect of the processing methods on the quality of Wagashi Gassirè (WG) cheese was determined. For this purpose, the production of a total of 24 white WG (WWG) cheeses were conducted using three traditional processing methods (M1, M2 and M3). Then, the obtained WWG were coloured using sorghum panicles leading to 24 red WG (RWG). The milk used for WG production and the corresponding WG (white and red) were subjected to analyses for pH, colour, moisture, ash, density, water activity, protein, fat, fatty acid profile, essential minerals, metallic trace elements, aflatoxin M1 (AFM1), dioxins and biogenic amines. The average moisture, crude protein, fat, and ash contents of the milk samples were 87.3 ± 1.2 , 22.9 ± 2.0 , 41.0 ± 7.0 , and 5.1 ± 0.8 g/100 g dw, respectively. Regarding the processing methods, the physicochemical characteristics, nutritional composition and chemical hazards content of the obtained WWG were similar except for water activity and manganese content. As expected, WWG and RWG were significantly different regarding the colour parameters. Indeed, RWG has higher lightness and lower green/red index and bleu/yellow index in comparison to the WWG. These results contribute to the nutritional characterisation of WG and are of significant importance in the scope of its standardisation.

Keywords: dairy products, cheese, chemical contaminants, processing methods, colouration, nutritional composition

1. Introduction

Around the world, a diversity of cheeses (1400 according to some estimates) is available (McSweeney et al., 2017). This diversity is related to the milk (cow, buffalo, goat, and sheep) and the processing methods used (Rayanatou, 2017). The most important step during cheese processing is milk coagulation, achieved through the addition of enzymes to the milk (Mazorra-Manzano et al., 2018). Four types of enzymes are used in cheese factories, which are animal rennet, genetically engineered chymosin, coagulants of microbial origin, and plant-derived clotting enzymes (Jacob et al., 2010). The plant-derived clotting enzymes are an alternative to animal rennet and have the advantage of being accessible and easy to use, even on a small scale (Rayanatou, 2017). Their use is a common practice in Mediterranean, West African, and Southern European countries. In Benin and some West African countries, fresh cow milk is processed into a traditional local cheese called Wagashi Gassirè (WG), which remains, in Benin, the most consumed dairy products (Dossou et al., 2006; Mattiello et al., 2018).

WG is a soft cheese obtained by hot coagulation (65 to 70°C) of fresh whole milk using *Calotropis procera* extracts that contain an enzyme known as calotropin (Baba-Moussa et al., 2007; Dossou et al., 2006; Mattiello et al., 2018). For the extract preparation, only *C. procera* leaves are used in Burkina Faso (Dah et al., 2018), whereas leaves, stem, fruits and sap are used in Nigeria and Benin (Belew et al., 2005; Dossou et al., 2006). Generally, plant-derived clotting enzymes are extracted by aqueous maceration (Jacob et al., 2011; Kheir et al., 2011). In Benin, aqueous maceration is less used than

maceration in milk and six WG production variants have been identified based on the method used to prepare the *C. procera* extracts (Dossou et al., 2022). The WG physicochemical characteristics and nutritional composition may vary as cheese quality depends on the milk quality (pH, protein, fat, and calcium content) and on the conditions of milk coagulation, cooking, and draining (Rayanatou, 2017). Moreover, the obtained white WG (WWG) is sometimes stained to obtain red WG (RWG) using various dyes, such as cobs and panicles from sorghum and teak (*Tectona grandis*) leaves. Hot colouring may affect the WG quality as heating (steaming, stewing, and frying) at high temperatures causes mineral losses due to the water solubility of minerals which increases with the temperature (Barciela-Alonso and Bermejo-Barrera, 2015).

This study follows the previous one and aims to determine the effects of the methods used to prepare the *C. procera* extracts, and the colouring process on the quality of the WG obtained in the perspectives of determining the method that provides the best cheese yield with good nutritional properties. Altogether, these data will be useful for setting up the prescription documents to guarantee the typicality, quality, and reputation of WG useful for its standardisation.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

The study was carried out in Dassa (Center-South) and Nikki (North-East), two regions of the agricultural development pole identified in the Benin Republic for diversification and intensive cattle production. These municipalities are parts of the main cattle and WG production areas in Benin. Nikki is a WG production area with a dairy processing unit while Dassa is a WG production area and an important crossroad for WG commercial and transaction (MAEP, 2014).

In each region, three farms were selected as WG production stations. Each farm has a cattle herd and the cow milk mixture was used for the WG production. To minimise variations in milk composition, the milk mixtures were from identical dairy cows belonging to the same herd fed with identical pastures (Schwendel et al., 2015). For the production of WG, the milk collected after milking was immediately filtered, heated (60°C, 20 min), and coagulated (70°C, 28 min) with *C. procera* extracts. After coagulation, the WWG was cooked (90°C, 35 min), moulded, and drained (14 min, room temperature) (Figure 1). This process displayed variations based on the use of *C. procera* parts (sap, stem and leaves, alone or in combination) for milk coagulation and their pre-treatment (trituration or not in water or milk) before coagulation (Dossou et al., 2022). The three most used processing methods of WG have been retained: i) *C. procera* sap was added to the heated milk for coagulation (M1), ii) *C. procera* crushed leaves and stems were trituated in a separate small quantity of milk and the resulting solution was filtered and the filtrate was added to the heated milk for coagulation (M2), and iii) *C. procera* crushed stem was trituated in a separate small quantity of milk and the solution was filtered and the filtrate was added to the heated milk for coagulation (M3).

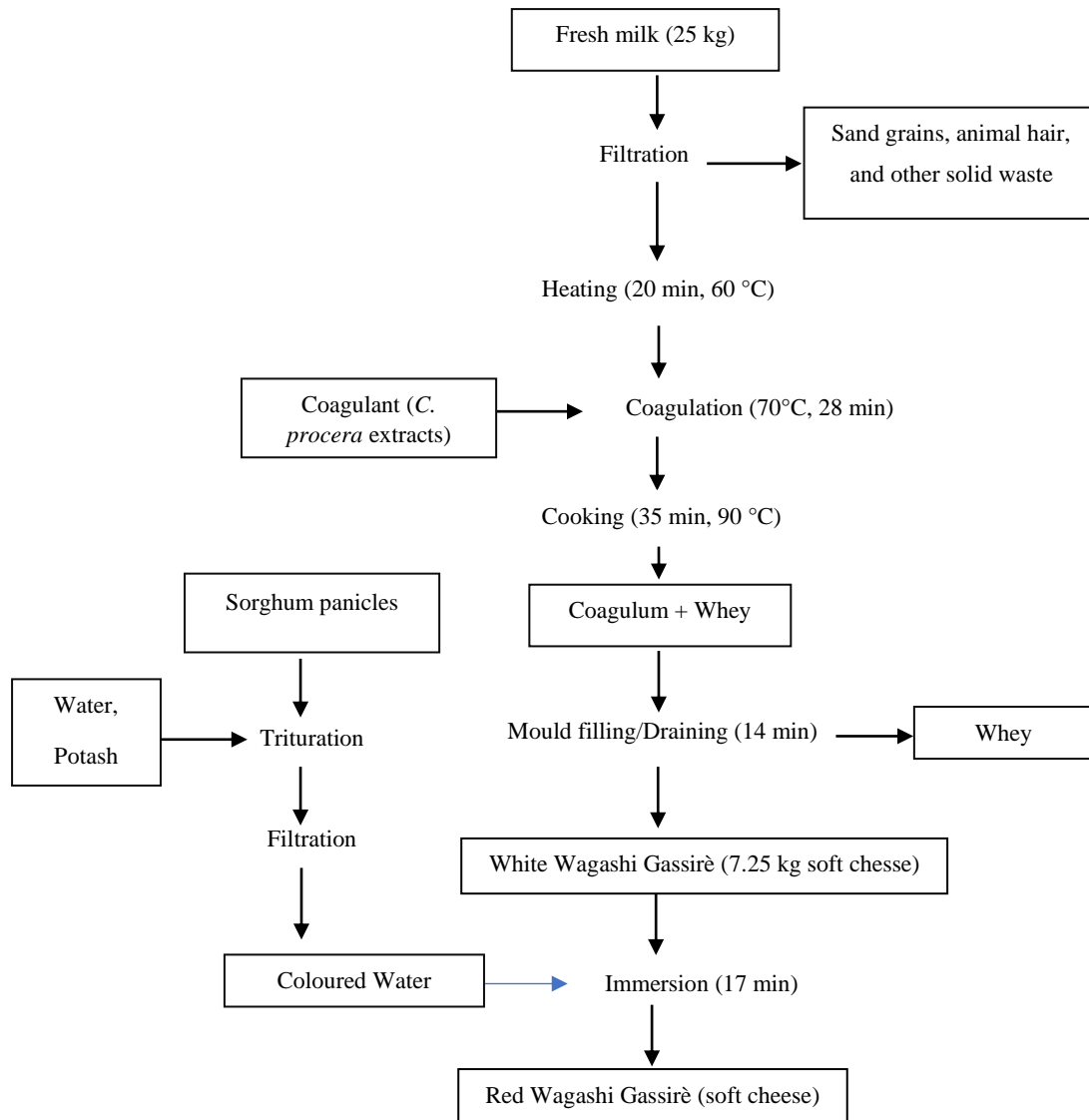


Figure 1: Fresh milk processing into white and red Wagashi Gassirè (Dossou et al., 2022)

The three processing methods corresponding to the three coagulants were replicated eight times leading to 24 productions. The obtained WG were white and coloured as described by Dossou et al (2022). For colouration, sorghum panicles were trituated in water with potash. WWG was then immersed (17 min) in the obtained coloured water (Figure 1). The processors of this study had already been identified in a previous work (Dossou et al., 2022). They are married women from the Peulh socio-cultural group, aged between 30 and 60 years, with at least 10 years of experience in WG production. For each production, a milk sample from the dairy cows was collected before each production. At the end of each production, the resulting WWG and RWG were also collected.

2.2. Physicochemical, nutritional, and chemical hazards analyses

The pH of the milk was determined at the production station using Hanna Instruments HI991001 (electrode HI12963) pH meter. The pH of the WG was determined after production using a Knick pH-meter 765 Calinatic (electrode 406-M6-DXX-S7/25). The colour of the samples was determined using a Konica Minolta chromameter CR400 in the trichromatic system (CIE LAB L* a* b* ΔE) calibrated with a white reference ceramic with the colour coordinates: X= 0.3194; Y= 86.1 and Z= 0.3369. The moisture was determined by the difference in mass of the samples after and before freeze-drying for 48 h (Lyoquest, Telstar). The milk's apparent density and temperature were measured using a lacto-densimeter MV LA.1015-1045 of Grosseron (France). The apparent density was corrected using the following formula: corrected density = apparent density + 0.2 (milk temperature - 20 °C) (Seme et al., 2015). Water activity was determined according to ISO 18787:2017 using AQUALAB 4TE 2A@250V Aw-meter (ISO, 2017).

The total ash content was determined by the AOAC (1995) method after incinerating 5 g of the sample at 550 °C for 24 h in a furnace. The crude protein content was determined by the Kjeldahl method according to ISO 8968-1:2014 (ISO, 2014). The fat was extracted by the Folch method (Folch et al., 1957). After saponification and methylation, twenty-nine fatty acid methyl esters were analysed by gas chromatography (GC) (Thermo Fisher Scientific, USA) using a CPSil88 fatty acid column (100 m × 0.25 mm; 0.2 µm) (Varian, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) coupled to a PolarisQ ion trap mass spectrometer (MS) (Thermo Fisher Scientific, USA) (Douny et al., 2015). Thirty-two minerals were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Gobert et al., 2017) and classified into essential minerals (eleven) and other minerals (twenty-one) (EFSA, 2019).

Dioxins and dioxin-like PCBs compounds (referred to by the general term "dioxins" in the rest of the text) were determined by DR-CALUX (Dioxin Responsive - Chemically Activated Luciferase Gene Expression) cell-based assay (Scippo et al., 2004). AFM1 was determined by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method using the RIDASCREEN kit R1121 of R-Biopharm (Germany). UPLC-FLD (Ultra-Performance Liquid Chromatography combined with Fluorescence Detection) was used to determine ten biogenic amines (Douny et al., 2019).

All the 24 milk samples as well as the 24 WWG samples were analysed for the parameters described above except for minerals and dioxins. For these chemical contaminants, 12 milk samples and 12 corresponding WWG samples were analysed (four samples per processing method). For RWG, the 24 samples were analysed for pH, colour, ash, and water activity. For moisture, proteins, fat, and fatty acids, 12 RWG samples (four samples per processing method) were analysed. RWG samples were not analysed for minerals and chemical contaminants (dioxins, AFM1, and biogenic amines).

2.3. Statistical analysis

Data from the physicochemical, nutritional, and chemical hazard analyses were entered into MS Excel 2013 to perform the descriptive analysis SAS 9.0 software. For physicochemical and nutritional parameters, an ANOVA test was performed to compare the means between processing methods and between WWG and RWG. Means were calculated considering the samples for which the analysed physicochemical and nutritional parameters were detected. For chemical hazards, the lower bound mean (mean calculated by replacing by 0 the “< LOQ” results) was used for the ANOVA test. The statistical significance was set at 5%.

Results

3.1. Physicochemical characteristics, nutritional composition and chemical hazards content of cow milk and Wagashi Gassirè from three processing methods

As shown in Table 1, the average pH and density of fresh milk were 6.5 ± 0.0 and 1028.3 ± 1.3 g/L respectively. The average moisture, crude protein, fat, and ash contents of fresh milk samples were 87.3 ± 1.2 , 22.9 ± 2.0 , 41.0 ± 7.0 , and 5.1 ± 0.8 g/100 g dw, respectively. Regarding the processing methods (Table 1), the physico-chemical characteristics and the proximal composition of the obtained WWG samples were similar except for water activity. Indeed, the water activity of WG samples from method M1 differs significantly ($P < 0.01$) from the water activity of WG samples obtained from methods M2 and M3 which were similar ($P > 0.05$).

Table 1: Physico-chemical characteristics and proximal composition (mean \pm sd) of milk and white Wagashi Gassirè according to the processing methods.

Physico-chemical parameters and proximal composition	Milk (n=24)	WWG (n=24)		
		M1 (n=8)	M2 (n=8)	M3 (n=8)
pH	6.5 ± 0.0	6.5 ± 0.1	6.4 ± 0.1	6.4 ± 0.1
Density (g/l)	1028.3 ± 1.3	nd	nd	nd
Aw	nd	1.00 ± 0.00^a	0.99 ± 0.00^b	1.00 ± 0.00^b
Moisture (%)	87.3 ± 1.2	64.5 ± 3.8	65.1 ± 5.7	65.9 ± 5.6
Ash (g/100g dw)	5.1 ± 0.8	4.0 ± 0.7	4.5 ± 0.7	4.6 ± 0.3
Protein (g/100g dw)	22.9 ± 2.0	33.6 ± 1.0	34.9 ± 3.4	33.3 ± 1.2
Total fat (g/100g dw)	41.0 ± 7.0	52.7 ± 1.3	52.2 ± 6.7	55.0 ± 6.4
Colour	L*	91.0 ± 3.0	93.5 ± 0.5	93.5 ± 0.8
	a*	-0.5 ± 1.8	-0.3 ± 0.2	-0.2 ± 0.2
	b*	10.0 ± 3.3	4.2 ± 0.7	5.0 ± 2.9
	ΔE	20.0 ± 3.5	19.4 ± 6.7	20.7 ± 6.2

M1: Coagulation with sap of *C. procera*, M2: Trituration in milk of leaves and stem of *C. procera*, M3: Trituration in milk of stem of *C. procera*, n: number of analysed samples, sd: standard deviation, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) between processing methods, L*: lightness, a*: green/red index, b*: bleu/yellow index, ΔE : overall colour difference, dw: dry weight, WWG: white Wagashi Gassirè

Eighteen fatty acids were detected in milk fat, among which eight were detected in all 24 milk samples analysed i.e. lauric, myristic, palmitic, stearic, lignoceric, palmitoleic, elaidic, and oleic acids (Table 2). The main fatty acids (expressed in g/100 g total fatty acids,) were palmitic acid (29.5 ± 3.7), stearic acid (17.6 ± 1.4) and oleic acid (26.9 ± 2.5). Regarding essential fatty acids, about 1.5% linoleic acid (LA) was present in the fat of 58 % of samples of milk, while alpha-linolenic acid (ALA) was found in small amount (ca. 1%) in the fat of 2 samples of milk. Saturated fatty acids (SFA) represented an average of 65.7 ± 2.6 % of total fatty acids of milk, while monounsaturated fatty acids contributed to 33.0 ± 2.2 % of total fatty acids of milk. Among polyunsaturated fatty acids (PUFA), besides LA and ALA, rumenic, stearidonic, and eicosapentaenoic acid (EPA) were found in small amounts in milk samples (Table 2). Regarding the processing methods (Table 2), the fatty acids composition of the obtained WWG samples were similar.

Table 2: Fatty acids composition of milk and White Wagashi Gassirè according to the processing methods.

Fatty acids (g/100g total fatty acids)	Milk (n=24)		WWG (n=24)						
			M1 (n=8)		M2 (n=8)		M3 (n=8)		
	mean±sd	N	mean±sd	N	mean±sd	N	mean±sd	N	
SFA	C10:0	2.4±0.4	17	2.4±0.5	6	2.2±0.2	7	2.2±0.6	7
	C12:0	2.3±0.6	24	2.6±0.4	8	2.5±0.4	8	2.4±0.2	8
	C13:0	2.4±0.5	8	2.4±0.7	4	2.6±0.5	3	2.8±0.2	3
	C14:0	9.4±0.8	24	9.6±1.3	8	9.1±0.8	8	9.4±1.4	8
	C16:0	29.5±3.7	24	28.6±4.5	8	28.9±4.1	8	29.2±4.1	8
	C17:0	0.8±0.1	18	0.8±0.2	5	0.8±0.1	6	0.8±0.1	6
	C18:0	17.6±1.4	24	16.8±1.1	8	18.5±1.5	8	17.8±2.4	8
	C20:0	0.5±0.0	12	0.5±0.0	3	0.5±0.0	3	0.6±0.0	2
	C22:0	0.7±0.0	10	0.7±0.2	3	0.6±0.0	5	0.7±0.0	4
	C24:0	3.0±1.2	24	2.6±0.7	8	2.6±0.7	8	2.9±0.6	8
MUFA	C16:1	2.0±0.5	24	2.4±0.6	7	1.9±0.6	7	2.1±0.7	7
	C17:1	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	C18:1,9t	3.9±1.0	24	3.7±0.8	8	3.9±0.6	8	3.3±0.7	8
	C18:1,9c	26.9±2.5	24	27.8±3.1	8	26.5±2.2	8	26.7±3.5	8
	C18:1,11c	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	C22:1	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
PUFA	C18:2,9c,12c (LA)	1.5±0.3	14	1.8±0.3	5	1.8±0.2	6	1.8±0.3	6
	C18:2,9t,12t	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	C18:2,9c,11t	1.3±0.4	3	1.3*	1	<LOQ	0	1.0*	1
	C18:2,9t,11t	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	C18:3	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	C20:2	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	C20:4	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	C18:3 (ALA)	1.0±0.0	2	1.2*	1	1.1*	1	1.2*	1
	C18:4	0.5±0.0	2	0.6*	1	<LOQ	0	<LOQ	0
	C20:3	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	C20:5 (EPA)	0.1±0.01	3	1.5*	1	0.9*	1	0.7*	1
	C22:5 (DPA)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	C22:6 (DHA)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
ΣSFA (g/100g total fat)	65.7±2.6	-	64.5±4.0	-	66.1±3.0	-	66.1±4.3	-	
ΣMUFA (g/100g total fat)	33.0±2.2	-	33.7±3.5	-	32.1±2.8	-	32.0±3.8	-	

Capric acid: C10:0, Lauric acid: C12:0, Tridecanoic acid: C13:0, Myristic acid: C14:0, Palmitic acid: C16:0, Heptadecanoic acid: C17:0, Stearic acid: C18:0, Arachidic acid: C20:0, Behenic acid: C22:0, Lignoceric acid: C24:0, Palmitoleic acid: C16:1, cis-10-heptadecenoic acid: C17:1, Elaidic acid: C18:1,9t, Oleic acid: C18:1,9c, Cis-vacenic acid: C18:1,11c, Erucinic acid: C22:1, Linoleic acid: C18:2,9c,12c (n-6), Linolelaidic acid: C18:2,9t,12t (n-6), Rumenic acid: C18:2,9c,11t (n-6), Isolinoleic acid: C18:2,9t,11t (n-6), γlinolenic acid: C18:3 (n-6), Eicosadienoic acid: C20:2 (n-6), Arachidonic acid: C20:4 (n-6), alinolenic acid: C18:3 (n-3), Stearidonic acid: C18:4 (n-3), Eicosatrienoic acid: C20:3 (n-3), Eicosapentaenoic acid: C20:5 (n-3), Docosapentaenoic acid: C22:5 (n-3), Docosahex-aenoic acid: C22:6 (n-3), SFA: Saturated Fatty Acids, MUFA: Monounsaturated Fatty Acids, PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids, N: number of samples in which the fatty acid was

detected and quantified, *n*: number of analysed samples, *sd*: standard deviation, <LOQ: 0.1% of total fatty acids, M1: Coagulation with sap of *C. procera*, M2: Trituration in milk of leaves and stem of *C. procera*, M3: Trituration in milk of stem of *C. procera*, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) between processing methods, *individual value, Means are calculated for samples in which the fatty acid was > LOQ, WWG: white Wagashi Gassirè

All the essential minerals tested were detected in milk samples, except for selenium (Table 3). The main minerals were calcium (9210 ± 1183 mg/kg dw in milk) and phosphorus (6943 ± 641 mg/kg dw in milk) (Table 3). Regarding the processing methods, the manganese content of WWG samples from methods M1 and M3 were similar and differed significantly ($P < 0.05$) from manganese content of WWG samples from method M2. Highest content of manganese (0.9 mg/kg dw) was observed for WWG samples from method M2.

Table 3: Essential minerals composition of milk and white Wagashi Gassirè according to the processing methods.

Essential minerals (mg/kg dw)	Milk (n=12)		WWG (n=12)					
			M1 (n=4)		M2 (n=4)		M3 (n=4)	
	mean±sd	N	mean±sd	N	mean±sd	N	mean±sd	N
Calcium (Ca)	9210±1183	12	12901±658	4	12803±1784	4	12200±684	4
Copper (Cu)	0.6±0.1	7	0.7±0.3	4	0.9±0.2	4	0.8±0.2	4
Iron (Fe)	2.4±0.8	12	4.4±1.2	4	8.9±7.0	4	4.6±1.1	4
Magnesium (Mg)	715±81	12	529±41	4	549±35	4	531±14	4
Manganese (Mn)	0.2±0.0	12	0.4±0.1 ^a	4	0.9±0.2 ^b	4	0.7±0.1 ^{ab}	4
Molybdenum (Mo)	0.10±0.02	12	0.05±0.01	4	0.06±0.02	4	0.06±0.00	4
Phosphorus (P)	6943±641	12	6784±1149	4	7441±781	4	7467±161	4
Potassium (K)	797±158	12	259±48	4	256±71	4	259±39	4
Selenium (Se)	<LOQ	0	0.2*	1	<LOQ	0	0.2*	1
Sodium (Na)	1602±269	12	597±93	4	588±135	4	63±77	4
Zinc (Zn)	28±7	12	53±6	4	48±8	4	47±3	4

M1: Coagulation with sap of *C. procera*, M2: Trituration in milk of leaves and stem of *C. procera*, M3: Trituration in milk of stem of *C. procera*, N: number of samples in which the chemical hazard was detected and quantified, *n*: number of analysed samples, *sd*: standard deviation, LOQ: see Table S11, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) between processing methods, dw: dry weight, *individual value, Means are calculated for samples in which the mineral was > LOQ, WWG: white Wagashi Gassirè

Metallic trace elements including aluminium, arsenic, barium, beryllium, boron, lead, chromium, lithium, mercury, nickel, rubidium, strontium, thallium, uranium, and vanadium were found in milk samples in concentrations generally very low, below 1 mg/kg dw, except for aluminium, barium, rubidium, and strontium in milk samples (Table S1). Antimony, bismuth, cadmium, cobalt, silver, and tin were not detected in milk samples. Aflatoxin M1 (AFM1) was detected in 15 out of 24 samples of milk. The average AFM1 concentration in milk was 0.3 ± 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg dw}$ (Table S1). Traces of dioxins, close to the LOQ level (0.9 pg BEQ/g fat), were found in the fat of 8 samples of milk analysed (Table S1). Regarding the processing methods (Table S1), the chemical hazards contents of the obtained WWG samples were similar.

3.2. Physicochemical characteristics and fatty acids composition of white and red Wagashi Gassirè

Table 4 presents the physico-chemical characteristics and proximal composition of white and red WG. The colour of RWG and WWG were significantly different ($P<0.0001$), while pH, water activity, and proximal composition (moisture, ash, protein and fat contents) were similar in RWG and WWG (Table 4). Indeed, RWG samples had higher lightness and lower green/red index and bleu/yellow index in comparison to the WWG samples.

Table 4: Physico-chemical characteristics and proximal composition (mean \pm sd) of white and red Wagashi Gassirè cheese

Physico-chemical parameters and proximal composition		RWG (n=24)	WWG (n=24)
pH		6.4 \pm 0.1	6.4 \pm 0.1
Aw		1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
Moisture (%)		64.3 \pm 4.5	65.2 \pm 4.9
Ash (g/100 g dw)		0.6 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2
Protein (g/100 g dw)		33.9 \pm 01.5	33.9 \pm 2.2
Total fat (g/100 g dw)		50.4 \pm 6.0	53.3 \pm 6.6
Colour	L*	85.5 \pm 10.8 ^a	93.0 \pm 0.6 ^b
	a*	10.2 \pm 10.9 ^a	-0.3 \pm 0.2 ^b
	b*	21.1 \pm 3.1 ^a	4.4 \pm 1.7 ^b
	ΔE	29.6 \pm 4.1 ^a	19.0 \pm 6.0 ^b

n: number of analysed samples, *sd*: standard deviation, *L**: lightness, *a**: green/red index, *b**: bleu/yellow index, ΔE : overall colour difference, *dw*: dry weight, *RWG*: red WG, *WWG*: white WG, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P<0.05$) between RWG and WWG

As observed for the physico-chemical characteristics and proximal composition, the fatty acids contents (expressed in g/100g total fatty acids) of WWG and RWG were similar except for linoleic acid (Table 5). Indeed, linoleic acid content of WWG samples was higher (1.8 \pm 0.3 g/100g total fatty acids) than that of RWG samples (1.5 \pm 0.3 g/100g total fatty acids).

Table 5: Fatty acids composition of white and red Wagashi Gassirè cheese

Fatty acids (g/100g total fatty acids)	WWG (n=24)		RWG (n=10)		
	mean±sd	N	mean±sd	N	
SFA	Capric acid (C10:0)	2.3±0.4	20	2.2±0.5	10
	Lauric acid (C12:0)	2.5±0.3	24	2.6±0.3	10
	Tridecanoic acid (C13:0)	2.6±0.5	10	2.7±0.6	7
	Myristic acid (C14:0)	9.4±1.2	24	10.1±0.9	10
	Palmitic acid (C16:0)	28.9±4.1	24	26.2±4.8	10
	Heptadecanoic acid (C17:0)	0.8±0.1	17	0.9±0.1	8
	Stearic acid (C18:0)	17.7±1.8	24	16.6±1.2	10
	Arachidic acid (C20:0)	0.5±0.0	8	0.5±0.0	4
	Behenic acid (C22:0)	0.7±0.1	12	0.6±0.0	4
	Lignoceric acid (C24:0)	2.7±0.7	24	3.0±1.5	10
MUFA	Palmitoleic acid (C16:1)	2.1±0.6	21	2.0±0.4	10
	cis-10-heptadecenoic acid (C17:1)	<LOQ	0	<LOQ	0
	Elaidic acid (C18:1,9t)	3.6±0.7	21	3.7±0.9	10
	Oleic acid (C18:1,9c)	27.0±2.9	24	27.8±3.9	10
	Cis-vaccenic acid (C18:1,11c)	<LOQ	0	0.1*	1
	Erucinic acid (C22:1)	<LOQ	0	<LOQ	0
PUFA	Linoleic acid (LA, C18:2,9c,12c, n-6)	1.8±0.3 ^a	17	1.5±0.3 ^b	8
	Linolelaidic acid (C18:2,9t,12t, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0
	Rumenic acid (C18:2,9c,11t, n-6)	1.2±0.1	2	2.9±2.2	2
	Isolinoleic acid (C18:2,9t,11t, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0
	γ-linolenic acid (C18:3, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0
	Eicosadienoic acid (C20:2, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0
	Arachidonic acid (C20:4, n-6)	<LOQ	0	<LOQ	0
	α-linolenic acid (ALA, C18:3, n-3)	1.2±0.0	3	0.9*	1
	Stearidonic acid (C18:4, n-3)	0.6*	1	0.4*	1
	Eicosatrienoic acid (C20:3, n-3)	<LOQ	0	<LOQ	0
	Eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5, n-3)	1.0±0.3	3	<LOQ	0
	Docosapentaenoic acid (DPA, C22:5, n-3)	<LOQ	0	0.8*	1
Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6, n-3)	<LOQ	0	<LOQ	0	
ΣSFA (g/100g total fat)	65.6±3.7	-	64.2±5.0	-	
ΣMUFA (g/100g total fat)	32.6±3.3	-	33.6±4.0	-	

N: number of samples in which the fatty acid was detected and quantified, *n*: number of analysed samples, *sd*: standard deviation, *SFA*: Saturated Fatty Acids, *MUFA*: Monounsaturated Fatty Acids, <LOQ: 0.1% of total fatty acids, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) between WWg and RWG, *individual value, Means are calculated for samples in which the fatty acid was > LOQ, WWG: white Wagashi Gassirè, RWG : Red Wagashi Gassirè

3. Discussion

3.1. Effect of coagulants on the nutritional quality of Wagashi Gassirè

For the three coagulants tested in this study, the nutritional composition of the WWG samples was similar. Thus, the different types of coagulants tested have little influence on the nutritional properties of the obtained WWG. According to the literature, cheese quality depends on the conditions of milk coagulation and cooking, particularly the dose of coagulant used, the temperature, and the milk quality (pH, protein, fat, and calcium content) (Rayantou, 2017). As the heating time/temperature (20 min, 60°C), cooking time/temperature (35 min, 90°C), and draining time (14 min) in the WG processing methods are similar (Dossou et al., 2022), the similarities of all WWG produced may be due to the dose of the coagulant and the milk quality. Regarding the milk quality, the protein and moisture contents, density, pH, and colour of the milk used in this study showed a little variation. These patterns in milk indicate that the dose of calotropin in each coagulant (M1, M2, and M3) was not constant between processing methods. Indeed, the women producers master the quantities of coagulants necessary for the production of WG according to the type of milk, obtaining a WWG of similar quality between the three processing methods. The processors involved in this study belong to the Peulh sociocultural group, a group known for its mastery of WG processing methods (Dossou et al., 2006, 2022).

Generally, plant-derived clotting enzymes are extracted by aqueous maceration (Jacob et al., 2011). The plant organs (fresh or air-dried) are crushed and soaked in water at room temperature (28-30°C). In this study, the stem and leaves of *C. procera* are crushed, mixed with milk, and then filtered. The filtrate constitutes the coagulant. However, Dossou et al (2022) also identified maceration as one of the methods for obtaining coagulant from *C. procera*. Comparative studies (extraction of calotropain with water or milk) should be carried out to identify the most efficient method of obtaining the coagulant from *C. procera*.

3.2. Colouring effect on Wagashi Gassirè quality

Colouration is reported by Dossou et al (2022) as a preservation method used by WG processors and traders. WWG was coloured to obtain red WG using various dyes, such as sorghum cobs, sorghum panicles, and teak (*Tectona grandis*) leaves. Sorghum cobs and panicles were soaked and then triturated or boiled with potash, bicarbonate, or salt. WWG was then immersed in the obtained coloured water. Teak leaves were only boiled to obtain coloured water for WWG colouring. As reported by Dossou et al (2024), significant differences were found between WWG and RWG for pH and essential minerals (sodium, magnesium, phosphorus, potassium, and calcium) contents. Indeed, WWG was richer in minerals than RWG and minerals losses were more than 50% for calcium, potassium, magnesium, and sodium, but less for phosphorus. These differences were linked to the minerals leaching phenomenon described by Barciela-Alonso and Bermejo-Barrera (2015). Barciela-Alonso and Bermejo-Barrera (2015) stated that boiling produced the highest losses of minerals, followed by heating with steam,

stewing, and frying due to the water solubility of minerals which increases with the temperature. In the present study, cold colouration was used. Then, the minerals content of WWG and RWG was not tested.

As expected, WWG and RWG were significantly different regarding the colour parameters. The colour was obtained using sorghum panicle extracts. According to Keke et al (2009) and Agbangnan et al (2012), sorghum extracts contained tannins, flavonoids, saponins, sterols, terpenes, alkaloids, mucilages, free quinones, and combined anthraquinones (O and C-heterosides) compounds. These compounds have several biological and pharmaceutical properties such as antioxidant activity, anticarcinogenic effects, cholesterol-lowering effects, antioxidant and antimicrobial activities, and reduction the cardiovascular risk disease (Agbangnan et al., 2012). The use of sorghum panicles as food dyes is related to the presence of free anthraquinones (red), catechic tanins (red), flavonols (violet), leucoanthocyanins (red), sterols, and triterpenes (violet). Except for colour, the WG nutritional quality (fat, proteins, and fatty acids composition) was not affected by the cold colouration process used in this study.

In the present study, colouration was done by immersing WWG in the coloured water obtained using water, sorghum panicles and potash. According to Dossou et al (2006), potash fixes the red colour of the dye and reduces the acidity of the cheese. These authors recommended using 3-4 g of potash per liter of water for preparing the coloured water during WG colouration. This recommendation was followed by Tchobo et al (2014) which observed a concentration of colouring molecules during RWG processing. In food processing, potash is also used as additive to reduce cooking time and make food softer (Ernest et al., 2024). As potash is an earth-derived, it may be contaminated by some environmental contaminants such as cadmium, mercury, lead, chromium, silver, and arsenic, increasing the human exposure to these hazards. This probable contribution to the human exposure to toxic metals may be low as potash is used as additive in small quantity in comparison to the food in which it was incorporated.

3.3. Nutritional values of milk and Wagashi Gassirè

Milk and milk products are nutritious food items containing numerous essential nutrients. Milk is a resource of fat, proteins, and minerals (Haug et al., 2007). Cow milk contains about 3.2-3.4% ww fat and 3.3-4% ww proteins (Djibril et al., 2019; Dossou et al., 2016; Pereira, 2014; Seme et al., 2015; Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2013). In the milk samples of this study, the protein content (22.9 g/100g dw) was found to be lower and the fat content (41.0 g/100g dw) was higher than expected compared to the literature. For WG, protein contents of 23-37 % dw and fat contents of 18% dw have been reported in Nigeria (Adeyeye, 2017; Uzeh et al., 2006). The protein content (33.9 g/100g dw) in the WWG samples of this study was as expected. Regarding fat in WG, lower contents (6-11% dw) were reported (Adeyeye, 2017; Alalade and Adeneye, 2010) in comparison to the fat content measured in this study in WG (53.3 g/100g dw for WWG). Milk protein has a high biological value and milk is therefore

a good source of essential amino acids (Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2013). More research is needed on the nutritional value and composition of milk and WG protein as WG is highly valued and consumed daily by local consumers from Benin and also by people from neighboring countries where it is used as a meat and fish substitute in various dishes (Baba-Moussa et al., 2007).

Milk is a good source of easily digestible fat. In this study, SFA, MUFA, and PUFA represented about 65.7; 33.0, and 1.6 g/100 g of the fatty acids detected in the analysed milk samples, respectively, with palmitic, stearic, and myristic acids accounting for 82% of the SFA. This is similar to what is reported by the literature (Haug et al., 2007; Kalač and Samková, 2010; Samková et al., 2012). Some SFA including lauric, myristic, and palmitic acids may be associated with an increase in cardiovascular risk, obesity, and some cancers (González-Martín et al., 2020; Haug et al., 2007; Kalač and Samková, 2010;). Thus, SFA daily intake must be as low as possible (EFSA, 2019). Unlike SFA, PUFA has attracted increasing attention regarding its health-promoting biological properties (González-Martín et al., 2020). Due to a lack of appropriate enzymes, mammals may not synthesize de novo two PUFA: ALA and LA, which are considered as essential fatty acids. These fatty acids play multiple roles (e.g. cell membrane structure, or cell signalling) (Markiewicz-Kęszycka et al., 2013). LA and ALA were detected in some milk and WWG samples of this study. The detection of rumenic acid in some milk and WG samples is of particular interest because its ingestion is reported to have anti-carcinogenic effects (Kalač and Samková, 2010).

According to available literature, the most abundant essential minerals of milk and dairy products are calcium and phosphorus (de la Fuente and Juarez, 2015; Pereira, 2014; Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2013). In this study, these minerals were detected in milk and WWG samples with calcium and phosphorus being the most abundant (Djibril et al., 2019; Dossou et al., 2016). In human nutrition, adequate calcium and phosphorus intake is essential. Getting enough calcium and phosphorus in the diet gives healthy bones and teeth and calcium may also help prevent hypertension, decrease the odds of getting colon or breast cancer, improve weight control, and reduce the risk of developing kidney stones (Haug et al., 2007). In addition to calcium and phosphorus, selenium was detected in WG but not in milk. Milk is also a good source of selenium (Haug et al., 2007; Pereira, 2014). The presence of selenium in cheese but not in milk would be related to the concentration effect of the main milk components induced by cheese production (Mazorra-Manzano et al., 2018).

Conclusion

In Benin, there are various coagulants and dyes used in the WG processing. Three coagulants were tested in this study with little influence on the physico-chemical and nutritional properties of the obtained WG. The same trend was observed for the cold colouration using sorghum panicle extracts except for the

colour parameters of the obtained WG. More research is needed to assess the effects of the other coagulants and the hot colouration on the quality of WG obtained.

References

- Adeyeye SAO. 2017. A preliminary study on the quality and safety of street-vended warankasi (a Nigerian soft white cheese) from Ibadan, Oyo state, Nigeria. *British Food Journal*. 119 (2):322-330. doi:10.1108/BFJ-05-2016-0218.
- Agbangnan PDC, Tachon C, Bonin H, Chrostowka A, Fouquet E, Sohounhloue DCK. Phytochemical study of a tinctorial plant of Benin traditional pharmacopoeia: the red sorghum (*sorghum caudatum*) of Benin. *Scientific Study and Research*. 13 (2): 121-135.
- Alalade OA, Adeneye JA. 2010. The effect of storage period on the chemical composition and coliform microflora of wara cheese. *International Journal of Dairy Science*. 1(2):126-130. doi:10.3923/ijds.2006.126.130.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 1995. *Official methods of analysis*. 16th edition. Washington DC, USA: AOAC.
- Baba-Moussa F, Baba-Moussa L, Ahissou H, Bokossa I, Capo-Chichi B, Toukourou F, Sanni A. 2007. Propriétés coagulantes de *Calotropis procera* et ses possibilités d'utilisation en industrie agro-alimentaire. *Revue Cames*. 5:7-12.
- Barciela-Alonso C, Bermejo-Barrera P. 2015. Variation of food mineral content during industrial and culinary processing. In: de la Guardia M, Garrigues S, editors. *Handbook of mineral elements in Food*. Chichester: John Wiley and Sons; p. 645-668.
- Belewu MA, Belewu KY, Nkwunonwo CC. 2005. Effect of biological and chemical preservatives on the shelf life of West African soft cheese. *African Journal of Biotechnology*. 4(10):1076-1079.
- Dah PA, Guira F, Tankoano A, Traore K, Sawadogo-Lingani H, Savadogo A. 2018. Cheese processing, marketing, utilisation, and consumption in Burkina Faso. *Current Journal of Applied Science and Technology*. 29(5):1–12. doi:10.9734/CJAST/2018/42863.
- de la Fuente MA, Juárez M. 2015. Milk and dairy products. In: de la Guardia M, Garrigues S, editors. *Handbook of mineral elements in Food*. Oxford: John Wiley and Sons; p. 645-668.
- Djibril ASD, Bothon FTD, Agbangnan DPC, Avlessi F. 2019. Girolando and Borgou cow's milk: physico-chemical and nutritional characterization. *American Journal of Food Science and Technology*. 7(6):242-245. doi: 10.12691/ajfst-7-6-12.
- Dossou J, Adote S, Soulé H. 2006. Production et transformation du lait frais en fromage peulh au Bénin, Rapport de guide de bonnes pratiques. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Dossou J, Atchouke GD, Dabadé DS, Azokpota P, Montcho JK. 2016. Evaluation comparative de la qualité nutritionnelle et sanitaire du lait de différentes races de vaches de quelques zones

- d'élevage du Bénin. *European Scientific Journal*. 12(3):140-159. doi:10.19044/esj.2016.v12n3p141.
- Dossou WA, Komagbe G, Seko Orou BMT, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, et al. 2024. Nutritional composition and chemical safety of Wagashi Gassirè cheese sold in the southern Benin markets. *Dairy*. 5(2):271-286. doi:10.3390/dairy5020022.
- Dossou WA, Seko Orou BMT, Komagbe G, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, et al. 2022. Processing and preservation methods of Wagashi Gassirè, a traditional cheese produced in Benin. *Heliyon*. 8, Article e10605. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e10605.
- Douny C, Benmedjadi S, Brose F, Iko Afé OH, Igout A, Hounhouigan DJ, Anihouvi VA, Scippo ML. 2019. Development of an analytical method for the simultaneous measurement of 10 biogenic amines in meat: application to Beninese grilled pork samples. *Food Analytical Methods*. 12:2392–2400. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.06.013.
- Douny C, El Khoury R, Delmelle J, Brose F, Degand G, Moula N, Farnir F, Clinquart A, Maghuin-Rogister G, Scippo ML. 2015. Effect of storage and cooking on the fatty acids profile of omega-3 enriched eggs and pork meat marketed in Belgium. *Food Science and Nutrition*. 3(2):140-52. doi:10.1002/fsn3.197.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2019. Dietary reference values for the EU. <https://multimedia.efsa.europa.eu/drvs/index.htm?lang=en>. Assessed 2023 June 30.
- Ernest OC, Somadina OI, Prince UC, Okoyeh Jude Nnaemeka OJ. 2024. Toxicological effects of two major types of potash used as food additives in Nigeria: Biochemical, hematological, and histopathological analysis of major organs in Wistar rats. *International Journal of Science and Research Archive*. 11(02):1904–1915.
- Gobert S, Pasqualini V, Dijoux J, Lejeune P, Durieux EDH, Marengo M. 2017. Trace element concentrations in the apex predator swordfish (*Xiphias gladius*) from a Mediterranean fishery and risk assessment for consumers. *Marine Pollution Bulletin*. 120:364-369. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.05.029.
- González-Martín MI, Vivar-Quintan AM, Revilla I, Salvador-Esteban J. 2020. The determination of fatty acids in cheeses of variable composition (cow, ewe's, and goat) by means of near infrared spectroscopy. *Microchemical Journal*. 156,104854. doi:10.1016/j.microc.2020.104854.
- Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. 2007. Bovine milk in human nutrition-a review. *Lipids Health Diseases*. 6,25. doi:10.1186/1476-511X-6-25.
- ISO (International Organization for Standardization). 2014. Milk and milk products-Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation ISO 8968-1:2014. Geneva, Switzerland: ISO.

- ISO (International Organization for Standardization). 2017. Foodstuffs-Determination of water activity. ISO 18787:2017. Geneva, Switzerland: ISO.
- Jacob M, Doris J, Rohm H. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. 64(1):14-33. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x.
- Kalač P, Samková E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*. 55(12):521-537. doi: 10.17221/2485-CJAS.
- Keke M, Yehouenou B, de Souza C, Sohounhloué D. 2009. Evaluation of hygienic and nutritional, quality of peulh cheese treated by sorghum vulgaris and pimenta racemosa (miller) extracts. *Scientific Study and Research*. 1:29-46.
- Kheir SEO, El Owni OAO, Abdalla MOM. 2011. Comparison of quality of sudanese white cheese (Gibna Bayda) manufactured with Solanum dubium fruit extract and rennet. *Pakistan Journal of Nutrition*. 10(2):106-111. doi: 10.3923/pjn.2011.106.111.
- MAEP (Ministère de l'Agriculture de l'Elevage et de la Pêche). 2014. Etude des filières lait et viande, Rapport définitif sur la filière lait (PAFILAV). Cotonou : MAEP.
- Markiewicz-Kęszycka M, Czyżak-Runowska G, Lipińska P, Wójtowski J. 2013. Fatty acid profile of milk - a review. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 57:135-139. doi: 10.2478/bvip-2013-0026.
- Mattiello S, Caroprese M, Matteo CG, Fortina R, Martini A, Martini M, Parisi G, Russo C, Zecchinia M. 2018. Typical dairy products in Africa from local animal resources. *Italian Journal of Animal Science*. 15(19):740-754. doi:10.1080/1828051X.2017.1401910.
- Mazorra-Manzano MA, Moreno-Hernández JM, Ramírez-Suarez JC. 2018. Milk-clotting plant proteases for cheesemaking. In: Guevara MG, Daleo GR, editors. *Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes*. Switzerland: Springer Nature; p. 21-41.
- McSweeney PLH, Ottogalli G, Fox PF. 2017. Diversity and classification of cheese varieties: an overview. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fourth Edition. San Diego: Academic Press; p. 781-804. doi: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00031-4.
- Pereira PC. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 30:619-627. doi:10.1016/j.nut.2013.10.011.
- Rayanatou IA. 2017. Étude de la coagulation du lait par l'extrait de feuilles de *Calotropis procera* en réponse au contexte laitier dans la région de Maradi, au Niger. [Thèse de doctorat]. Bretagne : Université Bretagne Loire Agro Campus Ouest.
- Samková E, Špička J, Pešek M, Pelikánová T, Hanuš O. 2012. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science*. 42(2):83-100. doi:10.4314/sajas.v42i2.1.

- Schwendel BH, Wester TJ, Morel PCH, Tavendale MH, Deadman C, Shadbolt NM, Otter DE. 2015. Invited review: Organic and conventionally produced milk-An evaluation of factors influencing milk composition. *Journal of Dairy Science*. 98 :721–746. doi : 10.3168/jds.2014-8389.
- Scippo ML, Eppe G, De Pauw E, Maghuin-Rogister G. 2004. DR-CALUX screening of food samples: evaluation of the quantitative approach to measure dioxin, furans and dioxin-like PCBs. *Talanta*. 63(5):1193-202. doi: 10.1016/j.talanta.2004.05.037.63.
- Seme K, Pitala W, Osseyi GE. 2015. Qualité nutritionnelle et hygiénique de laits crus de vaches allaitantes dans la région maritime au sud-Togo. *European Scientific Journal*. 11: 359-376.
- Tchobo PF, Ahouannou C, Amegnon NA, Mazou M, Alitonou AG, Sohounhlou DCK, Soumanou MM. 2014. Physico-chemical and microbiological characteristics of dried wagashi, *African Journal of Food Science*. 8(8):447-455. doi: 10.5897/AJFS2013.1103.
- Uzeh RE, Ohenhen RE, Rojugboka AK. 2006. Microbiological and nutritional qualities of dairy products: nono and wara. *Nature Science*. 4(3):37–40.
- Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. 2013. Milk and dairy product composition. In: Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D, editors. *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome: FAO; p. 41-102.

Supplementary data

Table S1: Chemical hazards contents of milk and white Wagashi Gassirè according to the processing methods.

Chemical hazards	Milk (n=12)		WWG (n=12)					
	LB mean±sd	N	M1 (n=4)		M2 (n=4)		M3 (n=4)	
			LB mean±sd	N	LB mean±sd	N	LB mean±sd	N
Aluminium (Al)	3.2 - 5.4**	2	11.9*	1	9.6± 9.0	4	3.5± 2.7	3
Antimony (Sb)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
Arsenic (As)	0.14±0.01	12	0.06± 0.04	3	0.06± 0.04	3	0.06± 0.01	4
Barium (Ba)	2.9±1.1	12	4.5± 1.9	4	5.7± 1.3	4	5.2± 1.5	4
Beryllium (Be)	0.002±0.002	8	0.002*	1	0.002± 0.001	3	0.002± 0.003	2
Bismuth (Bi)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
Boron (B)	0.30±0.10	12	0.06± 0.04	3	0.04± 0.05	2	0.05± 0.06	2
Cadmium (Cd)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	0.004*	1
Chromium (Cr)	0.1*	1	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
Cobalt (Co)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
Lead (Pb)	0.02*	1	0.02± 0.03	2	0.03± 0.05	2	0.03± 0.02	3
Lithium (Li)	0.15±0.11	12	0.08± 0.06	4	0.04± 0.03	4	0.04± 0.03	4
Mercury (Hg)	0.005±0.001	12	0.006± 0.002	4	0.007± 0.003	4	0.009± 0.001	4
Nickel (Ni)	0.11±0.04	12	0.20± 0.05	4	0.20± 0.10	4	0.10± 0.05	4
Rubidium (Rb)	17.3±8.6	12	4.6± 1.6	4	5.4± 2.1	4	5.4± 1.7	4
Silver (Ag)	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
Strontium (Sr)	6.8±2.5	12	10.1± 4.5	4	11.4± 4.3	4	10.4± 3.4	4
Thallium (Tl)	0.0005±0.0004	8	0.0002± 0.0002	2	0.0005± 0.0001	4	0.0003± 0.0003	2
Tin (Sn)	<LOQ	0	0.02*	1	<LOQ	0	<LOQ	0
Uranium (U)	0.0004 – 0.0006**	2	<LOQ	0	0.0009± 0.0003	4	0.0004± 0.0005	2
Vanadium (V)	0.009*	1	<LOQ	0	0.010± 0.010	3	0.007*	1
Dioxins (pg BEQ/g fat)	0.9±0.6	8	1.4*	1	1.6 – 1.8**	2	1.1 – 2.3**	2
Aflatoxin M1 (µg/kg dw)	0.3±0.4	12	0.3±0.5	2	0.6*	1	0.2±0.2	4

Tryptamine (mg/kg dw)	nd	24.1±2.7	8	24.0±5.4	8	25.0±4.0	8
-----------------------	----	----------	---	----------	---	----------	---

*M1: Coagulation with sap of C. procera, M2: Trituration in milk of leaves and stem of C. procera, M3: Trituration in milk of stem of C. procera, BEQ: bioanalytical equivalent, LB: Lower bound, N: number of samples in which the chemical hazard was detected and quantified, n: number of analysed samples per processing methods, sd: standard deviation, LOQ (minerals): see Table S11, LOQ (dioxins): 0.9 pg BEQ/g fat, LOQ (aflatoxin M1): 0.2 µg/kg dw for WWG and 0.03 µg/kg dw for milk, LOQ (tryptamine): 1.1 mg/kg dw, different superscripts in the same row indicate significant differences (P<0.05) between processing methods, dw: dry weight, *individual value, ** minimum – maximum, WWG: white Wagashi Gassirè; nd: not determined.*

**ETUDE 4 : Conditions
optimales de coagulation
du lait lors de la
production du fromage
Peulh Wagashi Gassirè au
Bénin**

Projet de publication en préparation

Optimisation des conditions de coagulation du lait lors de la production du fromage Peulh Wagashi Gassirè au Bénin

Alphonse Wanignon Dossou^{a,b,c,*}, Baké Marie Thérèse Seko Orou^{d,e}, Gwladys Komagbe^{f,g}, Philippe Sessou^g, Abdou Karim Issaka Youssao^h, Souaïbou Farougou^g, Joseph Djidjoho Hounhouigan^c, Jacques Mahillon^f, Roch Mongbo^e, Marc Poncelet^d, Samiha, Boutaleb^a, Sylvie Gobert^{i,j}, Yann Eméric Madode^c, Paulin Azokpota^c, Antoine Clinquart^b, Marie-Louise Scippo^a, Caroline Douny^a

^a*FARAH/Laboratory of Food Analysis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium*

^b*FARAH/Laboratory of Food Technology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium*

^c*Laboratory of Food Sciences and Technology, Faculty of Agronomic Sciences, University of AbomeyCalavi, Abomey-Calavi, Benin*

^d*Observing Recomposing Worlds, Faculty of Social Sciences, University of Liège, Liège, Belgium*

^e*Laboratory of Analysis of Social Dynamics and Development Studies, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^f*Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Faculty of Bioscience Engineering, Catholic University of Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium*

^g*Research Unit on Communicable Diseases, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^h*Laboratory of Animal Biotechnology and Meat Technology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

ⁱ*Laboratoire d'Océanologie, Centre MARE, Université de Liège, Sart Tilman, B6c, 4000 Liège, Belgium*

^j*Station de Recherches Sous-marines et Océanographiques, Punta Revellata, BP33, 20260 Calvi, France*

**corresponding author: Alphonse Wanignon Dossou, dossoual6@gmail.com, 01 BP 2009 Cotonou, University of Abomey-Calavi, Benin Republic*

Résumé : La coagulation enzymatique du lait à l'aide d'extraits de *Calotropis procera* est l'étape fondamentale de la production du fromage Peulh Wagashi Gassirè (WG). Cette étude vise à déterminer les conditions optimales de coagulation du lait au cours de la production du WG à l'aide d'extraits de *C. procera*. À cette fin, la méthodologie de réponse surface associée à un plan composite centré a été utilisée pour déterminer les optimums du temps d'extraction de l'enzyme coagulante (5-45 min), de la quantité de *C. procera* (50-150 g/kg de lait), et de la proportion de feuilles par rapport à celles des tiges de *C. procera* (0 - 100 %). Des modèles polynomiaux du second degré ont été développés et ont expliqué plus de 70 % des variations du temps de coagulation, du rendement brut, du coefficient de rétention de matière sèche, des teneurs en graisse et en protéines ainsi que de la luminance du WG obtenu, avec un écart moyen absolu < 10 %. La diminution du temps de coagulation, l'augmentation du rendement brut, du coefficient de rétention de matière sèche et de la teneur en protéines du WG sont associés à une augmentation de la quantité de *C. procera*, du temps d'extraction de l'enzyme, mais une diminution de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera*. Les optimums du temps d'extraction de l'enzyme coagulante, de la quantité de *C. procera*, et de la proportion de feuilles par rapport à celle de tiges de *C. procera* sont respectivement 5 min ; 50 g/kg de lait et 100 % de tige de *C. procera*. Ces conditions de coagulation permettent d'obtenir en 16 min un rendement brut de 29 %, un coefficient de rétention de matière sèche de 64 % et du WG contenant 42 % de graisse et 39 % de protéines (poids sec) et une luminance de 93,3 à partir d'un lait contenant 25,5 % de protéines ; 33,4 % de matières grasses et présentant une luminance de 86,9. Cette étude contribue à la standardisation du WG et constitue une première étape vers des méthodes de production rentables et faciles à utiliser.

Mots clés : *Calotropis procera*, coagulation, plan composite centré, méthode de réponse surface, Wagashi Gassirè, lait

1. Introduction

Le fromage est le nom générique d'un groupe de produits à base de lait, produit dans une large gamme de saveurs et de formes à travers le monde (Fox et McSweeney, 2017). L'étape fondamentale du processus de fabrication du fromage est la coagulation qui consiste à transformer le lait liquide en un gel semi-solide. La synérèse qui s'ensuit, c'est-à-dire la rétraction et la perte du lactosérum de ce gel, aboutit à la formation du coagulum. La coagulation est réalisée par l'ajout d'enzymes, l'acidification par des microorganismes ou l'ajout d'acides organiques ou par une combinaison de ces trois méthodes. (Henning et al., 2006 ; Legg et al., 2017, Rayanatou, 2017). Les coagulants enzymatiques utilisés sont divers : présure animale, chymosine obtenue par génie génétique, coagulants d'origine microbienne et coagulants d'origine végétale (Jacob et al., 2011). Dans le contexte de l'augmentation mondiale du prix de la présure de veau et de la prise en compte de certains facteurs religieux (islam et judaïsme) et alimentaires (végétarisme), l'utilisation d'enzymes de coagulation d'origine végétale dans la fabrication

des fromages continue d'être appliquée avec succès dans beaucoup de régions du monde (Ben Amira et al., 2017).

En Afrique de l'Ouest, le fromage Peulh, appelé Wagashi Gassirè (WG) au Bénin, est le dérivé du lait frais de vache le plus connu et le plus consommé (Mattiello et al., 2018). Le WG est une source importante de protéines (23%), de matières grasses (18%) et de minéraux (1,3-1,8%) (Appiah et al., 1998 ; Uzeh et al., 2006). Sa consommation contribue partiellement aux apports journaliers recommandés pour les adultes de 0,83 g de protéines/kg de poids corporel, 1000 mg de calcium et 11 mg de fer (EFSA, 2019), par exemple. Issu de la culture Peulh, le WG est un fromage à pâte molle non affiné dont la production est basée sur la coagulation à chaud (65 à 70 °C) du lait frais entier de vache par des extraits de *Calotropis procera*, appelé communément pommier de Sodome, qui contiennent une enzyme, la calotropaine. Pour obtenir ces extraits, les feuilles et les tiges de *C. procera* sont broyées, et triturées dans du lait frais ou de l'eau. Le mélange obtenu est filtré et le filtrat est ajouté au lait chauffé pour la coagulation. Le lait devient solide et le coagulum qui en résulte est cuit, moulé et égoutté pour obtenir le WG (Dossou et al., 2006, 2022). Au Bénin, le WG est produit sur l'ensemble du territoire, les départements du Borgou-Alibori, du Zou-Collines, du Mono-Couffo et de l'Atacora-Donga étant les principales zones de production (Kora, 2005 ; MAEP, 2014).

Malgré son importance socio-économique et nutritionnelle, la technologie de production du WG est encore à l'échelle traditionnelle au Bénin et dans la sous-région avec de faibles rendements de production variant entre 16 à 20 % (Kora, 2005). Ces rendements varient en fonction de la partie de *C. procera* et des laits des races bovines utilisés (Kora, 2005 ; Baba-Moussa et al., 2007). Plusieurs travaux ont été réalisés afin d'améliorer le rendement production et la qualité du WG. Ils portent sur la méthode de préparation du coagulant pour la production du WG. En Côte d'Ivoire, par exemple, Kra et al (2006, 2009) ont proposé des préparations du coagulant à base de feuilles fraîches de *C. procera* par l'extraction par pression couplée à de la centrifugation, la décantation ou le chauffage. Au Ghana, Chikpah et al (2014) ont proposé des coagulants de broyat, en proportion égales, de feuilles et tiges sèches et fraîches de *C. procera* avec du lait pasteurisé laissé sous agitation rotative à 150 tours/min pendant 5 min. Au Niger, Rayanatu (2017) a réalisé des essais sur la base des feuilles sèches de *C. procera* et de plusieurs types de lait dans différentes conditions de coagulation en comparaison avec la chymosine. Au Bénin, l'obtention du coagulant par macération du broyat de la tige de *C. procera* dans de l'eau distillée suivie d'une centrifugation a été proposée par Aboudoulaye et Kaya (2020). Toujours au Bénin, Aïssou et al (2016) ont développé des coagulants à base de différentes proportions de feuilles et tige de *C. procera*.

Malgré ces différents travaux, l'utilisation d'extraits de *C. procera* pour la production du WG reste essentiellement traditionnelle et basée sur les habitudes et l'expérience des productrices. Par ailleurs, les coagulants étudiés dans les travaux cités ci-dessus ont été utilisés dans des conditions différentes de celles qui sont habituellement appliquées pour la production du WG (Kra et al., 2006, 2009 ; Chikpah

et al., 2014 ; Rayanatou, 2017 ; Aboudoulaye et Kaya, 2020 ; Aïssou et al., 2016). La technologie de production du WG n'utilise que les formes fraîches des feuilles et tiges, ou la sève du *C. procera* et un mélange de lait de différentes races (Dossou et al., 2022). Enfin, les méthodes d'amélioration utilisées n'envisagent qu'un seul facteur à la fois tout en maintenant les autres facteurs constants. Elles ne tiennent donc pas compte des effets interactifs entre les variables (Bas et Boyaci, 2007). La méthodologie de réponse surface (MRS) a souvent été utilisée afin d'analyser tous les effets possibles des paramètres en étude. Cette méthode génère un modèle mathématique qui décrit les processus chimiques ou biochimiques (Granato et al., 2010 ; Bup et al., 2012 ; Kek et al., 2014).

Au regard de ces constats, cette étude se propose de déterminer les conditions optimales de coagulation du lait lors de la production du WG par l'utilisation de la MRS associée à un plan composite centré. Cette méthodologie permet une analyse des principaux facteurs déterminant la coagulation et maîtrisables par les productrices de WG, à savoir : la quantité de *C. procera* (ou dose du coagulant), le temps d'extraction de l'enzyme coagulante, et la proportion de feuilles de *C. procera* par rapport aux tiges (Dossou et al., 2022).

2. Matériel et méthodes

2.1. Production du Wagashi Gassirè

2.1.1. Collecte du lait et du *Calotropis procera*

Cette étude a été réalisée à la mini-laiterie du projet WALAC rattachée au Laboratoire de Sciences et Technologies des Aliments de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi. Le matériel biologique de production était constitué de lait de vache et des feuilles et tiges de *C. procera*.

Le lait de vache provenait de la ferme Peulh de Kodome (Commune de Kpomasse au Bénin) à environ 45 km de la mini-laiterie du projet WALAC. Le troupeau de cette ferme était constitué de 35 vaches laitières âgées de 5 à 17 ans appartenant aux races Goudali, Yakana, Bobodji et des croisements de ces trois races. Le troupeau était alimenté grâce aux pâturages des régions de Kpomasse. Afin de minimiser les variations de composition du lait pour les différentes productions du WG, le lait utilisé était issu des 35 vaches laitières du troupeau alimentées par le même pâturage. Pour chaque production de WG, le lait est recueilli dans une cuve en inox et directement transporté à la mini-laiterie du projet WALAC pour la production du WG. Les feuilles et tiges de *C. procera* ont été collectées au sein de l'Université d'Abomey-Calavi.

2.1.2. Production du Wagashi Gassirè

Cette étude vise à déterminer les conditions optimales de coagulation enzymatique du lait par les extraits de *C. procera* au cours de la production du WG. Pour cela, la MRS associée à un Plan Composite Centré (PCC) a été utilisée pour varier trois principaux facteurs dont dépendent la coagulation du lait c.-à-d. la quantité de *C. procera* (50-150 g/kg de lait), le temps d'extraction de l'enzyme (5-45 min) et la

proportion de feuilles de *C. procera* par rapport à celles des tiges (0-100 %). Ces variables ainsi que l'intervalle de leur variation avaient été préalablement identifiés comme principaux paramètres de la coagulation du lait au cours de la production du WG (Dossou et al., 2022).

Préparation du coagulant. Les feuilles et tiges fraîches de *C. procera* ont été récoltées, lavées, découpées, pesées et broyées. Le mélange de *C. procera* broyé et de lait a été agité mécaniquement (agitation rotative par un barreau aimanté à 550 tr/min) puis filtré par un tamis de 0,3 mm de mailles. Le filtrat obtenu a été utilisé comme coagulant (Dossou et al., 2022). La quantité de *C. procera* (50, 100 et 150 g/kg de lait), le temps d'extraction de l'enzyme (5, 25 et 45 min) et la proportion de feuilles de *C. procera* par rapport à celles des tiges (0, 50 et 100 %) utilisés pour la préparation du coagulant ont été définis par le PCC (plan à trois facteurs indépendants utilisés à trois niveaux différents) (Tableau 1). Les productions correspondantes à la quantité de *C. procera* de 100 g/kg de lait, le temps d'extraction de l'enzyme de 25 min et la proportion de feuilles de *C. procera* par rapport à celles des tiges de 50% sont le point central du PCC. Un kilogramme (1 kg) de filtrat obtenu dans les conditions décrites ci-dessus a été utilisé comme coagulant pour la production du WG.

Tableau 1 : Matrice du plan composite centré

Essais	Paramètres codés			Paramètres réels		
	X1 (min)	X2 (g/kg)	X3 (%)	TpsTr (min)	QttCp(g/kg)	Feuil/Tg (%)
1	0	0	0	25	100	50
2	-1	1	1	5	150	100
3	-1	1	-1	5	150	0
4	1	-1	-1	45	50	0
5	0	0	0	25	100	50
6	0	0	0	25	100	50
7	1	-1	1	45	50	100
8	0	0	0	25	100	50
9	1	1	1	45	150	100
10	-1	-1	1	5	50	100
11	-1	-1	-1	5	50	0
12	1	1	-1	45	150	0
13	1	0	0	45	100	50
14	0	0	-1	25	100	0
15	0	0	0	25	100	50
16	0	1	0	25	150	50
17	0	-1	0	25	50	50
18	0	0	1	25	100	100
19	-1	0	0	5	100	50
20	0	0	0	25	100	50

TpsTr: temps d'extraction de l'enzyme, *QttCp* : quantité de *C. procera*, *Feuil/Tg* : proportion de feuilles par rapport à celles des tiges de *Calotropis procera*, *X1* : valeur codée du temps d'extraction de l'enzyme, *X2* : valeur codée de quantité de *Calotropis procera*, *X3*: valeur codée de proportion de feuilles par rapport à celles des tiges de *Calotropis procera*

Transformation du lait en Wagashi Gassirè. Le WG a été produit suivant la méthode décrite par Dossou et al (2022). Neuf kilogrammes (9 kg) de lait ont été filtrés avec un tamis de 0,3 mm de mailles dans une marmite en inox de capacité de 20 litres puis chauffés grâce à un dispositif fonctionnant au gaz butane jusqu'à 70°C. Un kilogramme (1 kg) de coagulant préalablement préparé a été ajouté et le mélange ainsi obtenu a été maintenu entre 70 et 72 °C jusqu'à la coagulation du lait. La coagulation a été caractérisée par l'apparition, en surface, de la crème sous forme de mousse huileuse et du lactosérum plus ou moins verdâtre (Dossou et al., 2022). Après la coagulation, l'ensemble constitué du coagulum et du lactosérum a été cuit à 90°C pendant 30 min. Le caillé obtenu a été séparé du lactosérum pendant 10 min sur une table d'égouttage inclinée munie d'un dispositif de récolte du lactosérum. Le coagulum ainsi obtenu a été découpé en morceaux de 150 à 300 g environ, emballés dans des sacs gaufrés, et conservés à -80°C pour les différentes analyses. Le PCC avait défini 20 essais de production correspondant à 20 échantillons de lait et 20 échantillons de WG.

2.2. Détermination du temps de coagulation, du rendement de production et du coefficient de rétention de matière sèche

Temps de coagulation du lait. Le temps de coagulation est le temps entre l'ajout du coagulant au lait chauffé et la formation du caillé. La formation du caillé a été déterminée par observation visuelle et le temps de coagulation a été mesuré avec un chronomètre.

Rendement brut de production. Le rendement brut de production (RbBrut) correspond au rapport de la masse de WG obtenu (m WG) après égouttage sur la masse de lait (m lait) utilisé. La masse de WG a été mesurée après égouttage à l'aide d'une balance (Steinberg Systems SBS-PW-352W 40 kg / 2 g)

$$\text{RbBrut} = \frac{m \text{ WG (kg)}}{m \text{ lait (kg)}} \times 100$$

Coefficient de rétention de matière sèche (RetMS). Le coefficient de récupération/rétention de matière sèche est un facteur lié au rendement brut de production. Il représente le niveau de concentration de la matière sèche (MS) du lait lors de la production du WG. Il a été calculé par la formule suivante :

$$\text{RetMS} = \frac{\% \text{ MS (WG)} \times m \text{ WG (kg)}}{\% \text{ MS (lait)} \times m \text{ lait (kg)}} \times 100$$

RetMS: Coefficient de rétention de matière sèche, MS: Matière sèche, m: masse de lait/WG

2.3. Analyses physico-chimiques, nutritionnelles et de contaminants chimiques

Le pH du lait a été déterminé avant la production à l'aide d'un pH-mètre Hanna Instruments HI991001 associé à une électrode combinée HI12963. Le pH du WG a été déterminé après la production à l'aide d'un pH-mètre Knick 765 Calimatic associé à une électrode combinée Mettler Toledo 406-M6-DXX-

S7/25. La couleur des échantillons a été déterminée à l'aide d'un chromamètre Konica Minolta CR400 dans le système trichromatique (CIE L* a* b* ΔE) calibré avec une céramique blanche de référence avec les coordonnées de couleur : X= 0,3194 ; Y= 86,1 et Z= 0,3369. L'humidité a été déterminée par la différence de masse des échantillons après et avant lyophilisation pendant 48 heures (Lyoquest, Telstar). La densité apparente et la température du lait ont été mesurées à l'aide d'un lactodensimètre MV LA.1015-1045 de Grosseron (France). La densité apparente a été corrigée à l'aide de la formule suivante : densité corrigée = densité apparente + 0,2 (température du lait - 20 °C) (Seme et al., 2015). L'activité de l'eau a été déterminée conformément à la norme ISO 18787 :2017 à l'aide d'un Aw-mètre AQUALAB 4TE 2A@250V (ISO, 2017), à la température de 25 °C. L'acidité titrable a été déterminée selon la méthode décrite par Nout et al (1989).

La teneur en protéines brutes a été déterminée par la méthode Kjeldahl conformément à la norme ISO 8968-1 :2014 (ISO, 2014). La matière grasse a été extraite par la méthode Folch (Folch et al., 1957). Après saponification et méthylation, vingt-neuf esters méthyliques d'acides gras ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC) (Thermo Fisher Scientific, USA) à l'aide d'une colonne d'acides gras CPSil88 (100 m × 0,25 mm ; 0,2 μm) (Varian, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) couplée à un spectromètre de masse (MS) à piège à ions PolarisQ (Thermo Fisher Scientific, USA) (Douny et al., 2015). Les teneurs de trente minéraux ont été déterminées par spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS) (Gobert et al., 2017). Onze de ceux-ci ont été classés en minéraux essentiels et les autres en minéraux (dix-neuf) (EFSA, 2019).

Les dioxines et PCBs de type dioxine (désignés par le terme général "dioxines" dans le reste du texte) ont été quantifiées par DR-CALUX (Dioxin Responsive - Chemically Activated Luciferase Gene Expression) (Scippo et al., 2004). La teneur en AFM1 a été déterminée par la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en utilisant le kit RIDASCREEN R1121 de R-Biopharm (Allemagne). La méthode UPLC-FLD (Ultra-Performance Liquid Chromatography combined with Fluorescence Detection) a été utilisée pour quantifier dix amines biogènes et l'ammoniac (Douny et al., 2019).

Les 20 échantillons de lait ainsi que les 20 échantillons de WG ont été analysés pour les paramètres décrits ci-dessus, à l'exception de la densité corrigée, de l'activité de l'eau, de l'acidité titrable et des dioxines. La densité corrigée et les dioxines ont été évaluées sur les échantillons de lait (tous les échantillons pour la densité corrigée et 8 échantillons de lait sélectionnés au hasard pour les dioxines). L'activité de l'eau et l'acidité titrable ont été déterminées sur les échantillons de WG uniquement.

2.4. Analyses statistiques

2.4.1. Analyses descriptives et test d'homogénéité des échantillons de lait

Les données issues des analyses physico-chimiques, nutritionnelles et de contaminants chimiques des échantillons de lait ont été saisies dans MS Excel 2013 pour réaliser l'analyse descriptive (moyenne,

écart-type, maximum, minimum et coefficient de variation) à l'aide du logiciel MINITAB 18. Le coefficient de variation (CV) a été utilisé pour tester l'homogénéité de tous les échantillons de lait pour chaque paramètre analytique. Un CV < 15 % signifie que les données sont homogènes, conditions de base pour l'application ultérieure de la MRS. Pour les paramètres physico-chimiques et nutritionnels, les moyennes ont été calculées en tenant compte des échantillons de lait pour lesquels lesdits paramètres analysés ont été détectés. Pour les contaminants chimiques, la moyenne lower bound (moyenne calculée en remplaçant par 0 les résultats "< LOQ") a été calculée.

2.4.2. Analyse statistique du plan composite centré

Pour l'analyse du PCC, deux catégories de variables ont été distinguées : les réponses et les facteurs. Les variables facteurs sont : la quantité de *C. procera*, le temps d'extraction de l'enzyme et la proportion de feuilles de *C. procera* par rapport à celles des tiges. Les variables réponses sont : le temps de coagulation, le rendement brut, le coefficient de rétention de matière sèche, et les paramètres physico-chimiques, nutritionnels et de contaminants chimiques analysés sur les 20 échantillons de WG produits.

Pour l'analyse du PCC, une équation de second degré a été définie à partir des essais de production pour prédire l'évolution des différentes réponses en fonction des facteurs étudiés (Bas et Boyaci, 2007) suivant la formule ci-après :

$$Y_i = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

Y_i indique la réponse estimée, b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_{11} , b_{22} , b_{33} , b_{12} , b_{13} et b_{23} sont des coefficients codés et constants où b_0 est une constante, b_1 , b_2 et b_3 sont des coefficients pour les termes linéaires, b_{11} , b_{22} et b_{33} sont coefficients pour les termes quadratiques, et b_{12} , b_{13} et b_{23} sont les coefficients d'interaction. x_1 , x_2 et x_3 sont respectivement les valeurs codées des facteurs étudiés que sont la quantité de *C. procera*, le temps d'extraction de l'enzyme et la proportion de feuilles de *C. procera* par rapport à celles des tiges. Les valeurs codées des facteurs sont obtenues en transformant les valeurs réelles à l'aide de la relation suivante :

$$X = \frac{x - (x_{max} + x_{min})/2}{(x_{max} - x_{min})/2}$$

avec x : variable naturelle (ou valeur réelle), x_{max} : valeur maximale de la variable naturelle et x_{min} : valeur minimale de la variable naturelle (Bas et Boyaci, 2007).

Pour la validation du modèle utilisé, le coefficient de détermination (r^2) et le pourcentage d'écart absolu moyen « Absolute Average Deviation » (AAD) entre les résultats expérimentaux et les valeurs prédites ont été les deux critères utilisés. Un modèle est considéré comme valide si $r^2 > 70\%$ (Granato et al., 2010) et/ou AAD < 10% (Bup et al., 2012). Les coefficients de détermination ont été obtenus après une

analyse de régression linéaire multiple effectuée sur les résultats avec le logiciel Minitab 18, tandis que les AAD ont été calculés suivant l'équation décrite par Bas et Boyaci (2007).

$$\text{ADD} (\%) = \frac{100}{n} \sum_{n=1}^n \left| \frac{Y_{i,\text{exp}} - Y_{i,\text{cal}}}{Y_{i,\text{exp}}} \right|$$

Avec $Y_{i,\text{exp}}$ et $Y_{i,\text{cal}}$: réponses expérimentales et calculées, respectivement, et n : nombre d'essais. Afin de visualiser l'évolution des réponses en fonction des facteurs étudiés, des diagrammes de réponse surface ont été générés. Pour chaque diagramme de réponse surface, les variations de deux facteurs indépendants sont affichées tandis que le troisième facteur est fixé au point central (temps d'extraction de l'enzyme = 25 min, quantité de *C. procera* = 100 g/kg et proportion de feuilles/tiges de *C. procera* = 50 %).

2.4.3. Statistiques d'optimisation des paramètres de production

Parmi les variables analysées, seules celles présentant un $r^2 > 70\%$ et/ou un ADD $< 10\%$ ont été considérés pour l'optimisation des variables facteurs en utilisant l'option "optimiseur de réponse" de MINITAB 18 avec la fonction de désirabilité. Les facteurs optimisés ont ensuite été appliqués pour valider le modèle, en utilisant la même procédure expérimentale qu'au début de cette étude, afin de vérifier le pouvoir de prédiction des modèles développés en comparant les données prédites théoriques aux données expérimentales. Trois essais de production de WG ont été réalisés en utilisant les facteurs optimisés. Les réponses obtenues expérimentalement (V_{exp}) ont été comparées aux valeurs prédites (V_{pre}) à partir du modèle optimisé en calculant le pourcentage d'erreur (PE) pour déterminer la validité du modèle suivant l'équation décrite par Kek et al (2014). Un pourcentage d'erreur (PE) inférieur à 10 % indique un bon ajustement.

$$\text{PE}(\%) = 100 \times \left| \frac{V_{\text{exp}} - V_{\text{pre}}}{V_{\text{exp}}} \right|$$

2.5. Analyse sensorielle

Les tests sensoriels ont été réalisés sur du WG produit dans les conditions optimales en utilisant la méthode adaptée de Aïssou et al (2016). Vingt-six panélistes non formés ont été recrutés à Dassa et Nikki. Les participants sont issus des transformateurs et des consommateurs de WG impliqués dans l'étude menée par Dossou et al (2022). Ils ont été sélectionnés sur la base de leur fréquence de consommation du WG (au moins une fois par semaine). Le comité d'éthique de l'Université d'Abomey-Calavi a approuvé le protocole de l'analyse sensorielle, et tous les évaluateurs ont fourni un consentement écrit éclairé. L'évaluation sensorielle était basée sur une échelle hédonique en cinq points allant de 1 à 5 (1 "Très désagréable"; 2 "Désagréable"; 3 "Ni désagréable ni agréable"; 4 "Agréable"; 5 "Très agréable") selon Aïssou et al (2016). Les attributs de qualité sensorielle pris en compte étaient le goût, l'odeur, la couleur, la texture et l'acceptabilité globale des produits.

3. Résultats

3.1. Caractéristiques physico-chimiques, composition nutritionnelle et contaminants chimiques du lait de vache utilisé pour la production du Wagashi Gassirè

Comme le montre le Tableau 2, le pH moyen, la densité et la luminance (C.I.E. L*) du lait frais étaient respectivement de $6,5 \pm 0,0$, $1029,7 \pm 0,6$ g/L et $86,9 \pm 1,7$. En outre, les teneurs en matière sèche, en protéines brutes et en matières grasses du lait frais étaient respectivement de $13,6 \pm 0,5$, $25,5 \pm 1,0$ et $33,4 \pm 2,7$ g/100 g de poids sec (ps). Pour tous les paramètres physico-chimiques et de composition proximale analysés, le coefficient de variation (CV) était inférieur à 15% à l'exception de la couleur.

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques et composition proximale du lait de vache (n=20)

Paramètres physico-chimiques et composition proximale	Moyenne	EC	Min.	Max.	CV (%)	
pH	6,5	0,0	6,5	6,6	0,46	
Densité (g/l)	1029,7	0,6	1028,7	1031,4	0,07	
Acidité titrable (% d'acide lactique)	0,02	0,00	0,02	0,03	9,90	
Matière sèche (%)	13,6	0,5	11,9	14,4	3,77	
Graisse totale (g/100 g ps)	33,4	2,7	29,3	42,7	8,13	
Protéines (g/100 g ps)	25,5	1,0	23,5	27,6	4,10	
Couleur	L*	86,9	1,7	84,3	1,99	90,1
	a*	4,1	0,1	3,9	3,25	4,4
	b*	18,1	0,2	17,7	1,56	19,0
	ΔE	16,6	0,2	16,0	1,62	17,1

n : nombre d'échantillons analysés, *EC* : écart-type, *L** : luminance, *a** : indice vert/rouge, *b** : indice bleu/jaune, ΔE : différence totale de couleur, *ps* : poids sec, *CV* : Coefficient de variation, *Min* : Minimum, *Max* : Maximum

Quinze acides gras ont été détectés dans les échantillons de lait, parmi lesquels neuf ont été détectés dans la totalité des 20 échantillons de lait analysés, à savoir les acides caprique, laurique, myristique, palmitique, heptadécanoïque, stéarique, palmitoléique, oléique et linoléique (Tableau 3). Les principaux acides gras (dont les teneurs sont exprimées en g/100 g d'acides gras totaux) étaient l'acide palmitique ($30,0 \pm 1,5$), l'acide stéarique ($22,0 \pm 1,2$) et l'acide oléique ($26,9 \pm 1,1$). En ce qui concerne les acides gras essentiels, environ 1,5 % d'acide linoléique (LA) et 1,1 % d'acide alpha-linolénique (ALA) étaient présents dans la matière grasse de 100 % et 95 % des échantillons de lait, respectivement. Les acides gras saturés (AGS) représentaient en moyenne $66,7 \pm 2,2$ % des acides gras totaux du lait, tandis que les acides gras mono-insaturés (AGMI) et les acides gras polyinsaturés (AGPI) contribuaient respectivement à $28,9 \pm 1,7$ % et $4,2 \pm 0,9$ % des acides gras totaux du lait. Parmi les AGPI, outre LA et ALA, les acides ruménique, isolinoléique et stéaridonique ont été observés en petites quantités (<1 %) dans les échantillons de lait (Tableau 3). Pour les acides gras détectés, les CV étaient inférieurs à 15 %, sauf pour les acides palmitique, stéarique et oléique.

Tableau 3 : Composition en acides gras du lait de vache (n=20)

Acides gras (g/100g acides gras totaux)	N	Moyenne	EC	Min.	Max.	CV	
AGS	C10:0	20	1,5	0,4	0,9	28,1	2.63
	C12:0	20	2,2	0,3	1,0	16,5	2.86
	C13:0	0	<LOQ	-	-	-	-
	C14:0	20	9,7	0,6	8,4	6,9	10.98
	C16:0	20	30,0	1,5	27,6	5,0	32.66
	C17:0	20	1,0	0,0	0,9	6,7	1.21
	C18:0	20	22,0	1,2	19,7	5,5	24.35
	C20:0	1	0,4*	-	0,4	0,4	0.44
	C22:0	0	<LOQ	-	-	-	-
	C24:0	0	<LOQ	-	-	-	-
AGMI	C16:1	20	1,6	0,0	1,5	4,4	1.81
	C17:1	0	<LOQ	-	-	-	-
	C18:1,9t	1	5,8*	-	5,8	-	5.85
	C18:1,9c	20	26,9	1,1	24,6	4,2	29.57
	C18:1,11c	0	<LOQ	-	-	-	-
	C22:1	0	<LOQ	-	-	-	-
AGPI	C18:2,9c,12c (LA)	20	1,5	0,0	1,3	5,6	1.62
	C18:2,9t,12t	0	<LOQ	-	-	-	-
	C18:2,9c,11t	17	0,9	0,1	0,7	14,2	1.24
	C18:2,9t,11t	12	0,9	0,1	0,7	12,1	1.10
	C18:3	0	<LOQ	-	-	-	-
	C20:2	0	<LOQ	-	-	-	-
	C20:4	0	<LOQ	-	-	-	-
	C18:3 (ALA)	19	1,1	0,0	0,9	5,5	1.23
	C18:4	14	0,5	0,0	0,4	10,3	0.59
	C20:3	0	<LOQ	-	-	-	-
	C20:5 (EPA)	0	<LOQ	-	-	-	-
	C22:5 (DPA)	0	<LOQ	-	-	-	-
	C22:6 (DHA)	0	<LOQ	-	-	-	-
ΣAGS (g/100g graisse totale)			66.7	2,2	60,4	70,3	3,30
ΣADMI (g/100g graisse totale)			28.9	1,7	26,1	34,1	5,87
ΣAGPI (g/100g graisse totale)			4.2	0,9	1,3	5,5	23,17

Acide caprique : C10 :0, Acide laurique : C12 :0, Acide tridécanoïque : C13 :0, Acide myristique : C14 :0, Acide palmitique : C16 :0, Acide heptadécanoïque : C17 :0, Acide stéarique : C18 :0, Acide arachidique : C20 :0, Acide béhénique : C22 :0, Acide lignocérique : C24 :0, Acide palmitoléique : C16 :1, Acide cis-10-heptadécénoïque : C17 :1, Acide élaïdique : C18 :1,9t, Acide oléique : C18 :1,9c, Acide cis-vacénique : C18 :1,11c, Acide érucinique : C22 :1, Acide linoléique : C18 :2,9c,12c (n-6), Acide linoléaïque : C18 :2,9t,12t (n-6), Acide ruménique : C18 :2,9c, 11t (n-6), Acide isolinoléique : C18 :2,9t, 11t (n-6), Acide γlinoléique : C18 :3 (n-6), Acide eicosadiénoïque : C20 :2 (n-6), Acide arachidonique : C20 :4 (n-6), Acide alinolénique : C18 :3 (n-3), Acide stéaridonique : C18 :4 (n-3), Acide eicosatriénoïque : C20 :3 (n-3), Acide eicosapentaénoïque : C20 :5 (n-3), Acide docosapentaénoïque : C22 :5 (n-3), Acide docosahexaénoïque : C22 :6 (n-3), CV: Coefficient de variation, Min: Minimum, Max: Maximum, n: nombre d'échantillons analysés, N: nombre d'échantillons dans lequel l'acide gras a été détecté et quantifié, EC: Ecart-type, AGS: acides gras saturés, AGMI: acides gras mono-insaturés, AGPI: acides gras polyinsaturés, LOQ: 0.1% des acides gras totaux, Moyenne calculée pour les acides gras > LOQ, -: Non déterminée, * valeur individuelle

Tous les minéraux essentiels testés ont été détectés dans tous les échantillons de lait analysés, à l'exception du cuivre (12 échantillons sur 20) et du sélénium (10 échantillons sur 20) (Tableau 4). Les principaux minéraux étaient le potassium (11508±469 mg/kg ps), le calcium (9824±493 mg/kg ps) et le phosphore (7588±283 mg/kg ps). Les CV calculés étaient supérieurs à 15 % pour trois minéraux essentiels parmi les onze testés, à savoir le fer, le cuivre et le sélénium.

Tableau 4 : Composition en minéraux essentiels du lait de vache (n=20)

Minéraux essentiels (mg/kg ps)	N	Moyenne	EC	Min.	Max.	CV
Sodium (Na)	20	2328	123	2048	2562	5,32
Magnesium (Mg)	20	926	28	891	989	3,04
Phosphore (P)	20	7588	283	7098	8151	3,74
Potassium (K)	20	11508	469	10684	12325	4,08
Calcium (Ca)	20	9824	493	8969	10637	5,02
Manganese (Mn)	20	0,25	0,03	0,19	0,32	13,55
Fer (Fe)	20	2,03	0,31	1,52	2,75	15,46
Cuivre (Cu)	12	0,60	0,51	0,31	1,79	85,18
Zinc (Zn)	20	35	2	30	40	7,85
Selenium (Se)	10	0,17	0,03	0,15	0,25	17,86
Molybdene (Mo)	20	0,07	0,01	0,06	0,09	13,10

CV: Coefficient de variation, Min: Minimum, Max: Maximum, n: nombre d'échantillons analysés, N: nombre d'échantillons dans lequel le minéral a été détecté et quantifié, EC: Ecart-type, Moyenne calculée pour les minéraux > LOQ, ps : poids sec, LOQ : voir Tableau S2

Les éléments traces métalliques (ETM), notamment le vanadium, le chrome, le cobalt, le nickel, le rubidium et le strontium, ont été détectés dans les échantillons de lait à des concentrations inférieures à 1 mg/kg poids sec, à l'exception du rubidium (66 mg/kg ps) (Tableau 5). Les ETM détectés ont été retrouvés dans tous les échantillons de lait, à l'exception du vanadium qui a été détecté dans 85 % des échantillons de lait.

L'aflatoxine M1 (AFM1) a été détectée en grande quantité (0,18±0,23 µg/kg ps) dans 16 des 24 échantillons de lait, tandis que l'ammoniac a été trouvé dans 50 % des échantillons de lait avec une concentration allant de 17,58 à 117,62 mg/kg ps (Tableau 5).

Parmi les dix amines biogènes soumises à l'analyse (méthylamine, tryptamine, 2-phényléthylamine, putrescine, cadavérine, histamine, sérotonine, tyramine, spermidine et spermine), seule la sérotonine a été détectée dans 4 des 20 échantillons de lait. Des traces de dioxines, proches du niveau LOQ (0,9 pg BEQ/g de matière grasse), ont été observées dans la matière grasse de 2 des 8 échantillons de

lait analysés. Pour la plupart des contaminants chimiques détectés, les CV calculés étaient supérieurs à 15 %, sauf pour certains ETM, à savoir le rubidium, le strontium et le vanadium.

Tableau 5 : Contaminants chimiques du lait de vache

Cotaminants chimiques	N	Moyenne LB	EC	CV	Min.	Max.
Aluminium (Al)	0	<LOQ	-	-	-	-
Antimoine (Sb)	0	<LOQ	-	-	-	-
Arsenic (As)	0	<LOQ	-	-	-	-
Barium (Ba)	0	<LOQ	-	-	-	-
Beryllium (Be)	0	<LOQ	-	-	-	-
Bismuth (Bi)	0	<LOQ	-	-	-	-
Bore (B)	0	<LOQ	-	-	-	-
Cadmium (Cd)	0	<LOQ	-	-	-	-
Chrome (Cr)	20	0,05	0,02	29,27	0,03	0,08
Cobalt (Co)	20	0,02	0,00	19,84	0,01	0,02
Plomb (Pb)	0	<LOQ	-	-	-	-
Lithium (Li)	0	<LOQ	-	-	-	-
Mercure (Hg)	0	<LOQ	-	-	-	-
Nickel (Ni)	20	0,06	0,01	22,92	0,04	0,09
Rubidium (Rb)	20	66	2	4,44	61,71	72,54
Argent (Ag)	0	<LOQ	-	-	-	-
Strontium (Sr)	20	3,10	0,23	7,45	2,68	3,58
Thallium (Tl)	0	<LOQ	-	-	-	-
Etain (Sn)	0	<LOQ	-	-	-	-
Uranium (U)	0	<LOQ	-	-	-	-
Vanadium (V)	17	0,06	0,02	44,24	0,0	0,09
Serotonine (mg/kg ps, n=20)	4	4,82	11,52	239,0	0,0	39,59
Ammoniaque (mg/kg ps, n=20)	10	18,94	27,81	146,80	0,0	117,62
Aflatoxine M1 (µg/kg ps, n=20)	16	0,14	0,21	153,03	0,0	0,97

CV : Coefficient de variation, Min : Minimum, Max : Maximum, n: nombre d'échantillons analysés, N: nombre d'échantillons dans lequel le contaminant chimique a été détecté et quantifié, EC: Ecart-type, Moyenne LB : moyenne calculée en remplaçant <LOQ par ZERO, LOQ (Eléments traces métalliques): voir Tableau S2, LOQ (aflatoxine M1): 0.03 µg/kg ps, LOQ (ammoniaque et serotonine): 2.9 mg/kg ps, ps: poids sec, -: non déterminé

3.2. Validité des différents modèles de prédiction des réponses en fonction des paramètres de production du Wagashi Gassirè.

Les variables réponses mesurées pour les échantillons de WG et considérées pour les analyses statistiques du PCC sont présentées dans le Tableau S1 (Supplementary Data). Le Tableau S1 montre aussi les coefficients codés de l'équation de second degré établie à partir des essais de production pour prédire l'évolution des différentes réponses en fonction des facteurs étudiés. L'utilisation de la méthode de surface réponse pour évaluer les effets du temps d'extraction de l'enzyme, de la quantité de C.

procera et la proportion de feuilles de *C. procera* par rapport à celles des tiges lors de la production du fromage WG a généré des réponses dont les valeurs de ADD et de r^2 sont également présentées dans le Tableau S1. Les valeurs des ADD sont supérieures à 10 % pour l'acidité titrable, l'acide caprique, laurique, myristique et heptadécanoïque, le manganèse, le fer, le cuivre, le cobalt et le rubidium. Les valeurs des ADD du rendement brut et du coefficient de rétention de matière sèche sont respectivement de 4,59 et 6,72 %, inférieures à 10 %. Les valeurs de r^2 sont supérieures à 70 % pour les réponses que sont le temps de coagulation, les teneurs en matières grasses et en protéines, et les paramètres de couleur (L^* , a^* et ΔE). En conclusion, les variables qui satisfont les critères ($r^2 > 70\%$ et/ou un $ADD < 10\%$) pour être interprétées par le modèle établi sont donc : le temps de coagulation, le rendement brut, le coefficient de rétention de matière sèche, les teneurs en graisse et en protéines, la couleur (L^* , a^* et ΔE). Les valeurs expérimentales obtenues pour ces variables sont présentées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Valeurs des réponses en relation avec le Plan Composite Centré

Essais	Temps de coagulation (min)	Rendement brut (%)	Rétention de MS (%)	Graisse (% MS)	Protéines (% MS)	Luminance (L*)	Indice vert/rouge (a*)	Difference de couleur (ΔE)
1	12	0,26	0,56	50,92	35,27	92,41	-9,06	21,18
2	26	0,27	0,49	51,11	39,02	92,19	-8,05	21,02
3	12	0,27	0,38	52,20	37,63	93,16	-8,94	20,16
4	25	0,34	0,69	47,96	40,36	92,18	-8,04	21,15
5	14	0,24	0,49	55,40	37,10	92,41	-8,42	21,18
6	13	0,25	0,50	54,32	35,97	91,69	-8,37	21,44
7	19	0,28	0,53	48,23	36,91	93,16	-9,15	20,31
8	12	0,28	0,60	50,93	36,21	92,99	-9,15	21,17
9	14	0,31	0,69	60,15	33,31	92,98	-9,09	21,66
10	14	0,30	0,61	52,92	36,79	92,81	-9,56	21,18
11	18	0,29	0,61	39,92	40,00	92,96	-9,50	21,22
12	15	0,29	0,54	54,08	35,48	91,40	-9,41	20,22
13	12	0,24	0,46	55,01	36,04	91,82	-8,24	21,09
14	17	0,31	0,48	20,17	38,60	91,53	-7,16	20,91
15	14	0,26	0,50	56,01	34,18	91,23	-8,40	21,41
16	14	0,26	0,56	63,69	36,26	93,04	-9,19	21,48
17	13	0,23	0,55	78,00	37,36	93,56	-8,81	21,82
18	17	0,29	0,48	46,62	38,40	91,54	-8,17	21,57
19	11	0,24	0,55	57,36	36,44	93,19	-9,11	21,13
20	14	0,29	0,46	58,51	35,88	92,43	-8,44	21,30

MS : matière sèche

3.3. Effets du temps d'extraction de l'enzyme, de la quantité et de la proportion de feuilles/tiges de *Calotropis procera* sur le temps de coagulation du lait

Le temps de coagulation du lait des différentes productions a varié de 11 à 26 min (Tableau 6). Les termes linéaires des trois facteurs étudiés n'affectent pas significativement le temps de coagulation. Par contre, le temps de coagulation est significativement et positivement influencé par l'effet quadratique de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera* ($P < 0,01$), l'effet d'interaction de la quantité de *C. procera* et de la proportion de feuilles/tiges du *C. procera* ($P < 0,001$) et négativement influencé par les effets d'interaction entre le temps d'extraction de l'enzyme et la quantité du *C. procera* ($P < 0,01$) et le temps d'extraction de l'enzyme et la proportion de feuilles/tiges de *C. procera* ($P < 0,01$) (Tableau S1). Le modèle présente un coefficient de détermination r^2 de 89,77 % et un ADD de 7,61 % (Tableau S1). La Figure 1 montre les diagrammes de surface du temps de coagulation. L'augmentation du temps de coagulation est associée à une augmentation de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera* (Figure 1b) et du temps d'extraction de l'enzyme (Figure 1b), mais une baisse de la quantité de *C. procera* (Figure 1a).

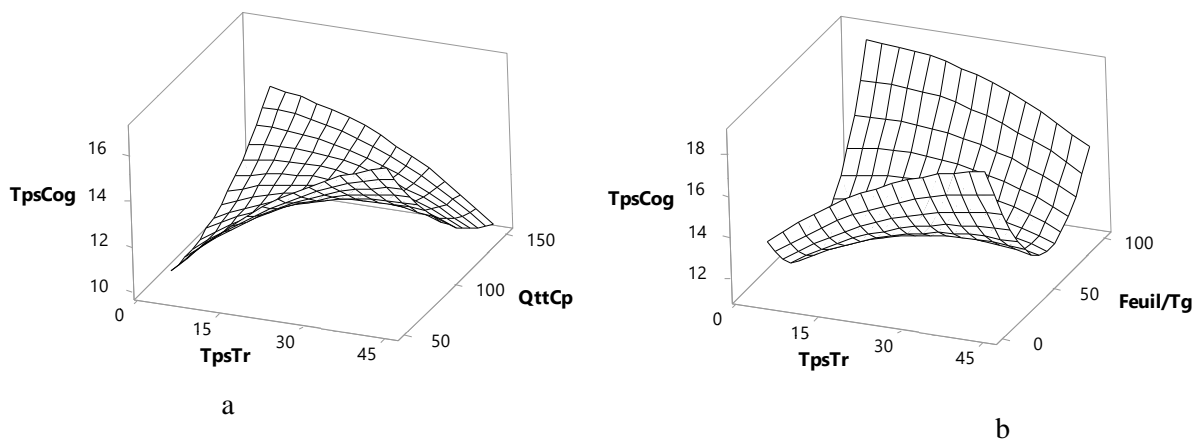


Figure 1 : Surface réponse du temps de coagulation

(a) temps d'extraction de l'enzyme et quantité de *C. procera* (proportion de feuilles/tiges = 50 %),
 (b) temps d'extraction de l'enzyme et proportion de feuilles/tiges (quantité de *C. procera* = 50 g/kg),
 (c) quantité de *C. procera* et proportion de feuilles/tiges (temps d'extraction de l'enzyme = 25 min).
 TpsCoag : temps de coagulation, TpsTr : temps d'extraction de l'enzyme, QttCp : quantité de *C. procera*, Feuil/Tg : proportion de feuilles/tiges de *C. procera*

3.4. Effets du temps d'extraction de l'enzyme, de la quantité et de la proportion de feuilles/tiges de *Calotropis procera* sur les rendements de production du Wagashi Gassirè

Le rendement brut de production et le coefficient de rétention de matière sèche ont varié de 0,23 à 0,34 % et de 0,38 à 0,69 % respectivement (Tableau 6). Le Tableau S1 montre un effet significativement positif du terme quadratique de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera* ($P < 0,01$) sur le rendement brut et du terme de l'interaction de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera* et de la quantité de *C. procera*

($P < 0,05$) sur le coefficient de rétention de matière sèche. Les r^2 de 69,17 et 62,21 % et les ADD de 4,59 et 6,72 % ont été obtenus pour le rendement brut et le coefficient de rétention de matière sèche respectivement (Tableau S1). La Figure 2 montre les diagrammes de surface du rendement brut et du coefficient de rétention de matière sèche. Le rendement brut de production augmente avec l'augmentation du temps d'extraction de l'enzyme et de la quantité de *C. procera* jusqu'à un maximum puis décroît ensuite (Figure 2a). Le rendement de production est maximal avec une quantité de *C. procera* proche de 150 g/kg (Figure 2a). Les variations du coefficient de rétention de matière sèche en fonction des facteurs étudiés sont similaires aux variations du rendement brut, c'est-à-dire une augmentation du coefficient de rétention de matière sèche associée à une augmentation de la quantité de *C. procera* et à une diminution de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera* (Figure 2b).

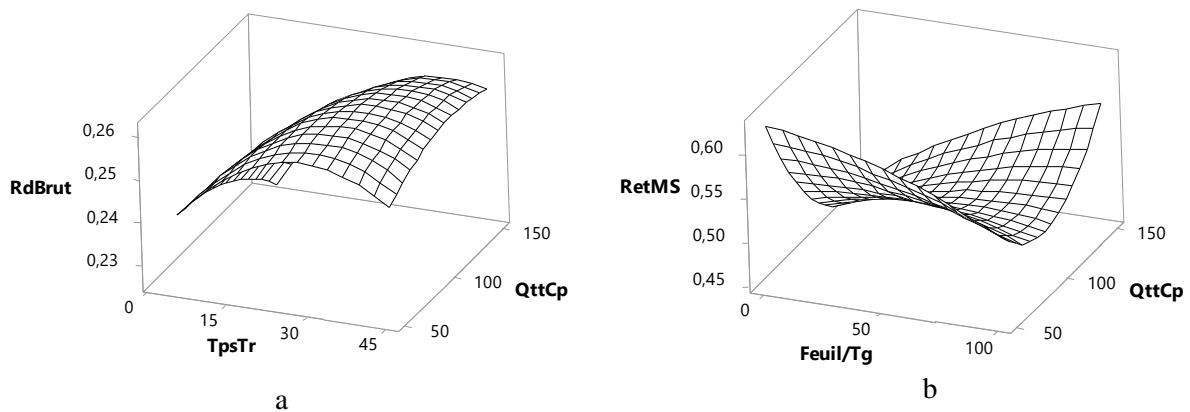


Figure 2 : Surface réponse du rendement brut et du coefficient de rétention de matière sèche

(a) temps d'extraction de l'enzyme et quantité de *C. procera* (proportion de feuilles/tiges = 50 %), (b) quantité de *C. procera* et proportion de feuilles/tiges (temps d'extraction de l'enzyme = 25 min), RdBrut : rendement brut de production, RetMS : coefficient de rétention de matière sèche, TpsTr : temps d'extraction de l'enzyme, QttCp : quantité de *C. procera*, Feuil/Tg : proportion de feuilles/tiges de *C. procera*

3.5. Effets du temps d'extraction de l'enzyme, de la quantité et de la proportion de feuilles/tiges de *Calotropis procera* sur les teneurs en matières grasses et en protéines du Wagashi Gassirè

Les termes linéaires (b_0 , b_1 , b_2 , et b_3) des différents facteurs étudiés, le terme quadratique (b_{22}) de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera* et le terme d'interaction (b_{13}) du temps d'extraction de l'enzyme et de la quantité de *C. procera* influencent significativement la teneur en protéines du WG. Les effets sont positifs ($P < 0,05$) pour les termes linéaires à l'exception de la constante (b_0 , $p < 0,001$) et négatifs pour les autres effets ($p < 0,05$) (Tableau S1). Pour la teneur en graisse, des effets significativement négatifs ($p < 0,001$) ont été observés pour les termes quadratiques de la proportion de feuilles/tiges et de la quantité de *C. procera* (Tableau S1). Les r^2 de 78,10 et 81,12 % et les ADD de 8,96 et 1,59 % ont été obtenus pour la matière grasse et les protéines respectivement (Tableau S1). La Figure 3 montre les diagrammes de surface des teneurs en protéines et graisse totale. Les Figures 3a et

3b montrent une augmentation de la teneur en graisse associée à une augmentation de la quantité de *C. procera* et de la proportion de feuilles/tiges, respectivement. D'après les Figures 3c et 3d, une augmentation de la teneur en protéines est associée à une augmentation du temps d'extraction de l'enzyme (Figure 3c) et à la diminution de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera* (Figure 3d). Les effets de la proportion de feuilles/tigse de *C. procera* sur les teneurs en graisse et en protéines sont donc contraires : une augmentation de la teneur en protéines et une diminution de la teneur en matières grasses sont associées à une diminution de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera*.

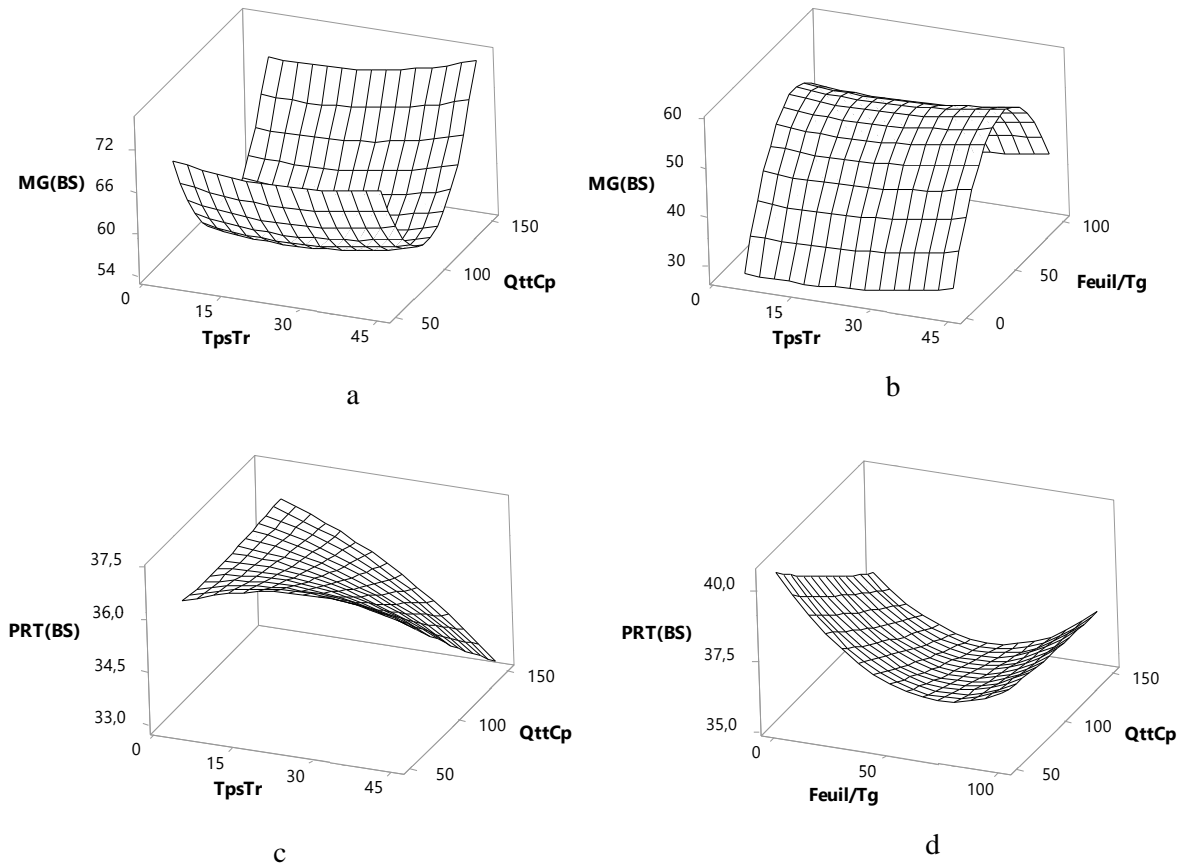


Figure 3 : Surface réponse des teneurs (% poids sec) en graisse et en protéines

(a) temps d'extraction de l'enzyme et quantité de *C. procera* (proportion de feuilles/tiges = 50 %),
 (b) temps d'extraction de l'enzyme et proportion de feuilles/tiges (quantité de *C. procera* = 50 g/kg),
 (c) temps d'extraction de l'enzyme et quantité de *C. procera* (proportion de feuilles/tiges = 50 %),
 (d) quantité de *C. procera* et proportion de feuilles/tiges (temps d'extraction de l'enzyme = 25 min),
 PRT(BS) : pourcentage de protéines en poids sec, MG(BS) : pourcentage de graisse en poids sec,
 TpsTr : temps d'extraction de l'enzyme, QttCp : quantité de *C. procera*, Feuil/Tg : proportion de
 feuilles/tiges de *C. procera*

3.6. Effets du temps d'extraction de l'enzyme, de la quantité et de la proportion de feuilles/tiges de *Calotropis procera* sur la couleur du Wagsashi Gassirè

Les paramètres de couleur qui ont satisfait les critères d'inclusion dans l'analyse des modèles du PCC sont la luminance (L^*), l'indice de vert/rouge (a^*) et la différence totale de couleur (ΔE). Pour ces

paramètres, les r^2 obtenus sont 70,97 ; 74,11 et 86,83 % et des ADD de 0,29 ; 2,74 et 0,68 % respectivement pour L^* , a^* et ΔE (Tableau S1). La quantité de *C. procera* a un effet quadratique positif sur la luminance, mais négatif sur l'indice de vert/rouge. L'indice de vert/rouge est aussi positivement influencé par l'effet quadratique de la proportion de feuilles/tiges. Cet effet est négatif pour la luminance. Celle-ci est positivement influencée par l'effet d'interaction du temps d'extraction de l'enzyme et de la proportion de feuilles/tiges et l'indice de vert/rouge est négativement influencé par l'effet d'interaction du temps d'extraction de l'enzyme et de la quantité de *C. procera*. La différence totale de couleur est positivement influencée par l'effet linéaire de la proportion de feuilles/tiges et les effets d'interaction entre le temps d'extraction de l'enzyme et la quantité de *C. procera* et la quantité de *C. procera* et la proportion de feuilles/tiges. Elle est par contre négativement influencée par l'effet quadratique du temps d'extraction de l'enzyme (Tableau S1). La Figure 4a montre une augmentation de luminance associée à une diminution du temps d'extraction de l'enzyme. Par ailleurs, une augmentation de la quantité de *C. procera* et du temps d'extraction de l'enzyme s'accompagnent d'une diminution de la valeur de l'indice de vert/rouge (Figure 4b). La différence totale de couleur représentée en fonction du temps d'extraction de l'enzyme et de la proportion de feuilles/tiges montre une augmentation vers un maximum (Figure 4c).

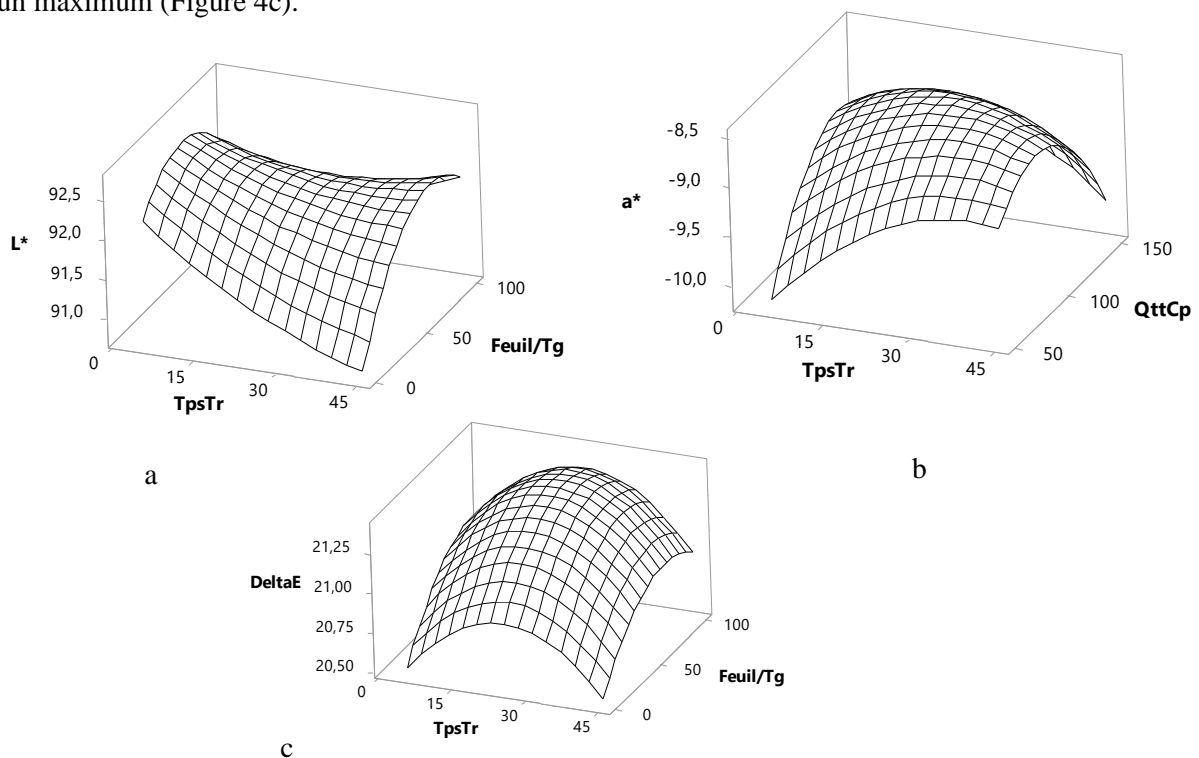


Figure 4 : Surface réponse de la luminance, de l'indice de vert/rouge et de la différence totale de couleur

(a) temps d'extraction de l'enzyme et proportion de feuilles/tiges (quantité de *C. procera* = 50 g/kg), (b) temps d'extraction de l'enzyme et quantité de *C. procera* (proportion de feuilles/tiges = %), (c) temps d'extraction de l'enzyme et proportion de feuilles/tiges (quantité de *C. procera* = 50 g/kg), L^* : luminance, a^* : indice de vert-rouge, ΔE : différence totale de couleur, TpsTr : temps d'extraction de l'enzyme, QttCp : quantité de *C. procera*, Feuil/Tg : proportion de feuilles de *C. procera* par rapport à la tige

3.7. Conditions optimales de coagulation du lait pour la production du Wagashi Gassirè

Les conditions optimales de coagulation du lait pour la production du WG ont été déterminées en indiquant l'objectif pour chaque réponse. Les objectifs sont la production d'un WG de couleur blanche (L^* maximum), riche en protéines (teneur en protéine maximale) et pauvre en graisse (teneur en graisse minimale) durant une coagulation de durée courte (temps de coagulation minimal) avec des rendements de production élevés (rendement brut et coefficient de rétention de matière sèche maximum) (Tableau 7). La valeur de la désirabilité composite des réponses était de 0,73 correspondant à des optimums de temps de trituration de 5 min, une quantité de *C. procera* de 50 g/kg et 0 % de feuilles/tiges (Tableau 7). Ces optimums des facteurs étudiés correspondent à des prédictions de temps de coagulation de 16 min, de rendement brut de 29 %, de coefficient de rétention de matière sèche de 64 %, de teneur en graisse de 42 % (en poids sec), de teneur en protéines de 39 % (en poids sec) et de luminance de 93,3 pour le WG. L'aptitude des modèles statistiques à prédire les réponses optimales a été testée pour un temps de trituration de 5min, une quantité de *C. procera* de 50 g/kg de lait et une proportion de feuilles/tiges de *C. procera* de 0 %. Le Tableau 7 montre les résultats de la vérification des modèles. Les pourcentages d'erreur pour le temps de coagulation, le rendement brut, le coefficient de rétention de matière sèche et la luminance sont respectivement de 3 ; 4 ; 1 et 0,3 %. Les valeurs expérimentales trouvées étant dans la gamme des valeurs prédites, alors les modèles sont valables et peuvent donc être validés.

Tableau 7 : Paramètres de coagulation, optimisation des réponses, désirabilité

Variables	Objectifs	Valeur inférieure	Cible	Valeur supérieure	Valeur prédite	Désirabilité	Valeur expérimentale	Pourcentage d'erreur (%)
Variables								
Temps d'extraction de l'enzyme (min)	Dans la gamme	5	Dans la gamme	25	5	0,73	5	-
Quantité de <i>C. procera</i> (g/kg)	Dans la gamme	50	Dans la gamme	150	0	0,73	50	-
Proportion de feuilles/tiges (%)	Dans la gamme	0	Dans la gamme	100	50	0,73	0	-
Réponses								
Temps de coagulation (min)	Minimiser	11	11	26	16	0,66	16,5	3
Rendement brut (%)	Maximiser	23	33	33	29	0,60	29	1
Rétention de MS (%)	Maximiser	38	69	69	64	0,82	61	4
Graisse (% MS)	Minimiser	20,16	20,16	78,00	42,99	0,60	-	-
Protéines (% MS)	Maximiser	33,30	40,35	40,35	39,30	0,85	-	-
Luminance (L*)	Maximiser	91,23	93,56	93,56	93,31	0,89	92,96	0,3

MS : matière sèche

3.8. Diagramme optimisé de production du Wagashi Gassirè et résultat du test sensoriel

À la fin de ces travaux d'optimisation de la coagulation du lait pour la production du fromage Peulh WG, un diagramme de fabrication optimisé a été produit (Figure 5). Celui-ci montre le mode opératoire pour la préparation du coagulant et la production du WG.

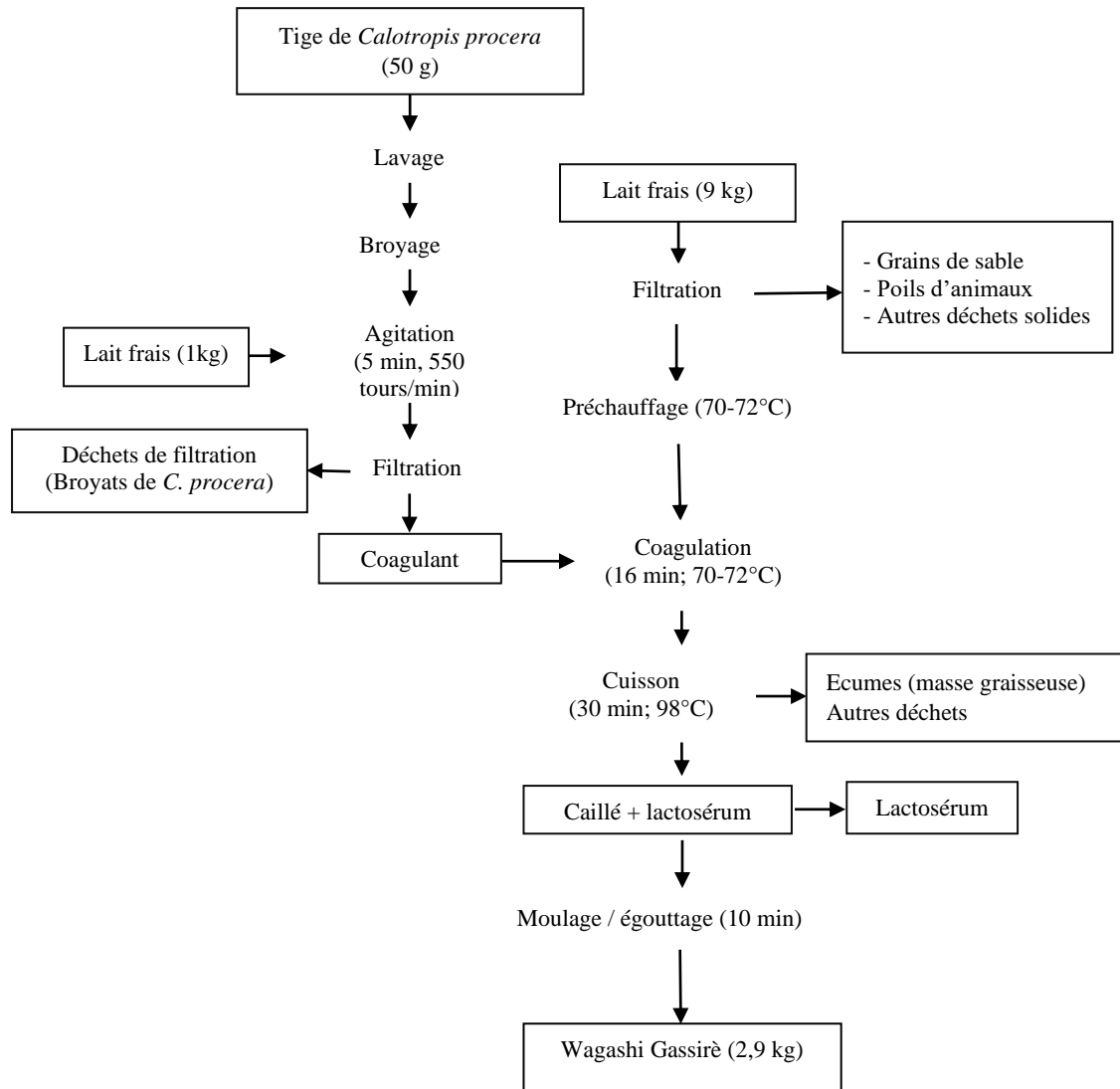


Figure 5 : Diagramme de fabrication optimisé de la coagulation de lait pour la production du fromage Peulh Wagashi.

Préparation du coagulant. Les tiges fraîches de *C. procera* sont récoltées, lavées, découpées, pesées et broyées. Cinquante grammes de broyat sont mélangés à 1 kg de lait et l'ensemble est agité mécaniquement (agitation rotative par un barreau aimanté à 550 tr/min) pendant 5 min puis filtrés par un tamis à mailles serrées. Le filtrat obtenu est utilisé comme coagulant. Les quantités de broyat et lait peuvent être ajustées afin de respecter le rapport de 50 g de *C. procera* dans 1 kg de lait.

Transformation du lait en Wagashi Gassirè. Neuf kilogrammes (9 kg) de lait sont filtrés avec un tamis à mailles serrées dans une marmite en inox puis chauffés jusqu'à 70 °C. Le coagulant (1 kg) de coagulant préalablement préparé est ajouté et le mélange ainsi obtenu a été maintenu entre 70 et 72 °C jusqu'à la coagulation du lait. Après la coagulation, l'ensemble constitué du coagulum et du lactosérum est cuit à 90 °C pendant 30 min. Le caillé obtenu est égoutté pendant 10 min sur une table d'égouttage inclinée disposant d'un dispositif de récolte du lactosérum. Le WG ainsi obtenu peut être emballé suivant les préférences et les destinations du circuit de commercialisation et de distribution.

Caractéristiques organoleptiques du Wagashi Gassirè produit dans les conditions optimales. Tous les dégustateurs ont apprécié très agréablement la couleur et la texture du WG (Figure 6). L'odeur et l'acceptabilité globale du WG ont été appréciées très agréablement par 96 % des panélistes et le goût a reçu la même appréciation par 86 % des panélistes. Aucun dégustateur n'a donné des appréciations de "Ni agréable ni désagréable, désagréable, très désagréable" au WG produit dans les conditions optimales.

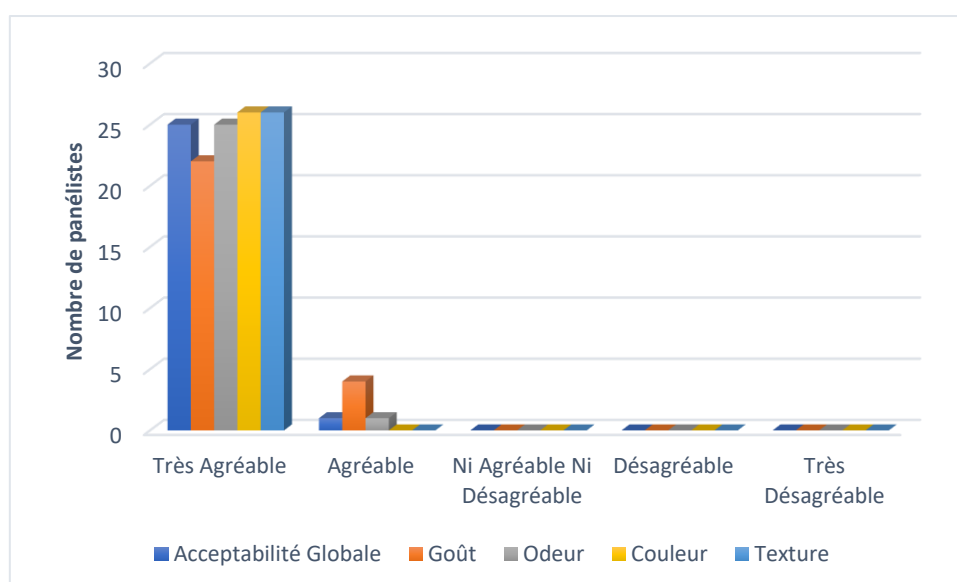


Figure 6 : Evaluation sensorielle du Wagashi Gassirè produit dans les conditions optimales

4. Discussion

Les travaux de Dossou et al (2022) avaient identifié la quantité de *C. procera*, le temps d'extraction de l'enzyme et la proportion de feuilles de *C. procera* par rapport à celles des tiges comme les facteurs les plus pertinents pour la réussite de la coagulation. Aussi, ces travaux avaient-ils déterminé les perceptions des consommateurs sur les critères de qualité du WG. Ces critères ont permis de fixer les objectifs de l'optimisation à savoir : produire un WG de couleur blanche (luminance de 93,56), riche en protéines (40,35 % poids sec) et pauvre en matières grasses (21,16 % poids sec) obtenu durant une coagulation de

durée courte (11 min) avec des rendements de production élevés (33 et 69 % pour respectivement le rendement brut et le coefficient de rétention de matières sèche).

Dans la technologie fromagère, la coagulation du lait est obtenue majoritairement par l'action d'une enzyme coagulante. L'activité coagulante d'une enzyme est optimale dans des conditions liées aux caractéristiques physico-chimiques du milieu (type de lait et ses caractéristiques, dont le pH, teneur en protéines, en matières grasses et en calcium), mais aussi aux conditions de coagulation du lait (type de coagulation, dose du coagulant, température de coagulation) (Rayanatou, 2017). Ces paramètres doivent donc être pris en compte dans l'analyse des résultats de la présente étude en comparaison avec les études similaires.

4.1. Impact de la composition du lait sur l'activité des extraits de *Calotropis procera*

Influence du pH. Le pH des échantillons de lait de la présente étude est de $6,5 \pm 0,0$. Ce pH est similaire aux pH rapportés dans la littérature pour le lait frais de vache produit au Bénin (Aïssi et al., 2016 ; Dossou et al., 2016 ; Djibril et al., 2019). Pour une coagulation optimale avec des extraits de *C. procera*, Aboudoulaye et Kaya (2020) avaient rapporté un pH de 5,5 après avoir fait varier le pH du lait de 5 à 6 par ajout de citrate et de 7 à 8 par ajout de phosphate de potassium. Une plage de pH optimal de 7 à 8 avait été déterminée par Baba-Moussa et al (2007) après une variation du pH du lait de 4 à 6,6 par ajout d'acide chlorhydrique et de 6,6 à 10 par ajout d'hydroxide de sodium. Rayanatou (2017) rapporta un pH optimal de 6,7 après une acidification du lait jusqu'à un pH 5,6 par ajout de glucono-delta lactone. Ces différents pH indiquent que la calotropaine, enzyme du *C. procera*, serait active dans une large gamme de pH. En effet, la calotropaine comme les protéases à cystéine ont un grand potentiel dans les industries alimentaires, biotechnologiques et pharmaceutiques en raison de leur propriété d'être actives dans une large gamme de pH (Shah et al., 2014). Dans la présente étude, aucune correction du pH du lait n'a été faite afin de respecter les conditions réelles de production du WG dans le contexte du Bénin. Selon Dossou et al (2022), la production du WG est réalisée avec la technologie traditionnelle à partir d'un mélange de lait de différentes races bovines sans aucune modification du pH du lait.

Influence de la teneur en calcium. La teneur en calcium du lait de la présente étude est de 9824 ± 493 mg/kg poids sec. Au fur et à mesure que la coagulation du lait progresse, les ions calcium sont essentiels au développement d'une matrice gélifiée (phase non enzymatique du processus de coagulation). C'est pourquoi l'ajout de chlorure de calcium (100-400 mg CaCl_2 /kg de lait) au lait est une pratique courante dans la production du fromage. L'effet du calcium sur le comportement du gel est associé à la réduction des forces répulsives entre les micelles altérées par l'enzyme, favorisant les interactions hydrophobes (augmentant la vitesse de formation du caillé) (Shah et al., 2014 ; Mazorra-Manzano et al., 2018). Cette pratique est en désaccord avec les résultats de Rayanatou (2017) et de Freitas et al (2016) qui rapportèrent que le calcium n'avait pas un effet facilitateur sur la protéolyse effectuée par les enzymes contenues dans les extraits de *C. procera*. Rayanatou (2017) avait utilisé des quantités

variant de 0 à 1 000 mg de CaCl₂ par kg de lait tandis que Freitas et al (2016) avaient expérimenté des concentrations de 10 à 1000 millimoles de CaCl₂. Comme indiqué pour le pH, aucune modification n'a été réalisée sur la composition du lait utilisé dans la présente étude afin de respecter les conditions typiques de production du WG au Bénin.

Influence de la teneur en protéines et en matières grasses. Les teneurs en protéines brutes et en matières grasses du lait frais de la présente étude sont respectivement de 25,5 % et 33,4 % de poids sec (correspondant à 3,4 % et 4,5 % de poids frais respectivement). Ces teneurs sont similaires aux données de littérature (Barłowska et al., 2011 ; Wijesinha-Bettoni et Burlingame, 2013 ; Periera, 2014 ; Dossou et al., 2016 ; Djibril et al., 2019). Des teneurs élevées en protéines et matières grasses du lait influencent directement les propriétés de coagulation du lait, par exemple en réduisant le temps de coagulation, en augmentant la fermeté du caillé et en augmentant le rendement du fromage (Panthi et al., 2017). Le lait de la présente étude est apte à la coagulation, car la teneur en protéines est >2 %. En effet, la coagulation par la présure ne se produit pas dans l'heure qui suit l'ajout de présure au lait contenant < 2 % de protéines (Guinee et al., 1997). Une amélioration significative des propriétés de coagulation du lait se produit avec l'augmentation de la teneur en protéines dans la plage de 2 % à 4 %, mais reste presque constante par la suite (4 % à 7,5 %) (Guinee et al., 1997). Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en matière grasse dans l'intervalle 0,1-10 % poids frais avec un niveau constant de protéines de 3,3 % poids frais entraîne une réduction du temps de gel et une augmentation de la fermeté du caillé (Guinee et al., 1997). Le rapport protéines/grasses du lait est donc un facteur déterminant la qualité du fromage. Le rapport protéines/grasses de la présente étude est de 0,75. Mais il a été rapporté qu'un rapport protéines/grasses compris 0,70 et 1,15 n'a pas un effet significatif sur les propriétés de coagulation (Panthi et al., 2017). Cependant, de telles variations pourraient affecter de manière significative la composition du fromage.

Influence des autres facteurs du milieu. Au regard de ce qui précède, on conclut que le pH, les teneurs en protéines, grasses et calcium n'ont pas un effet significatif sur l'activité des extraits de *C. procera*. Cette activité serait plutôt influencée par la température et la dose du coagulant (Rayantou, 2017). Pour les échantillons de lait de la présente étude, le profil en acides gras (Haug et al., 2007 ; Kalač et Samková, 2010 ; Samková et al., 2012) et les compositions en minéraux essentiels (Wijesinha-Bettoni et Burlingame, 2013 ; Pereira, 2014 ; de la Fuente et Juarez, 2015) suivent des tendances confirmées par la littérature disponible. Les niveaux de contamination des échantillons de lait par les ETM, les amines biogènes et l'AFM1 montrent aussi que lesdits échantillons sont faiblement contaminés (EC, 2023 ; MAEP, 2007 ; FAO/WHO, 2019).

4.2. Impact des conditions de coagulation sur l'activité des extraits de *Calotropis procera*

Influence de la température. Dans la présente étude, les coagulants testés ont tous été préparés à base des feuilles et tiges fraîches de *C. procera*. La température de 70 °C a été retenue comme température optimale de coagulation du lait dans le processus de production du WG pour cette étude. En effet,

Rayanitou (2017) avait déterminé la température correspondant à l'activité optimale de la calotropaine en utilisant des feuilles sèches de *C. procera* et du lait reconstitué à 10 % d'extrait sec à partir de poudre de lait écrémé low heat et d'eau distillée. Dans ces conditions, aucune coagulation n'avait été observée pour des températures inférieures à 65 °C. Ces résultats étaient en contradiction avec ceux rapportés par Chikpah et al (2014) qui, en utilisant une température de 50 °C et un coagulant à base de feuilles sèches de *C. procera* et du lait pasteurisé, avaient obtenu une coagulation. Ces différences étaient probablement liées à la qualité des feuilles et aux différences de temps de séchage des feuilles de *C. procera* et au temps écoulé entre le séchage et l'utilisation des feuilles de *C. procera* séchées. Le temps de séchage était de 7 jours et un stockage de 2 à 3 mois à 20 °C pour Rayanitou (2017), mais 4 jours pour Chikpah et al (2014). La force du coagulant serait diminuée par le séchage des feuilles et le stockage avant utilisation. Par ailleurs, les temps de coagulation obtenus par Rayanitou (2017) à la température de 95 °C étaient plus courts que ceux obtenus à 75 °C pour toutes les doses de coagulant indiquant que la température de 95 °C serait la température correspondant à une activité optimale de la calotropaine. Toutefois, Baba-Moussa et al (2007) avaient obtenu une activité optimale dans une plage de température comprise entre 65 et 70 °C avec des coagulants préparés à base des formes fraîches des feuilles ou tige et la sève de *C. procera*.

Dose du coagulant et temps de coagulation. Dans la présente étude, le temps de coagulation augmente avec l'augmentation de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera*, l'augmentation du temps d'extraction de l'enzyme et la diminution de la quantité de *C. procera*. Sur 5 types de laits de vache (lait cru de vache, lait pasteurisé, lait UHT, lait reconstitué à partir de poudre de lait écrémé low heat, suspension micellaire de phospho-caséinate natif) coagulés avec des extraits de 3, 5, 7 et 9 g de feuilles sèches de *C. procera* par litre de lait, Rayanitou (2017) avait constaté que le temps de coagulation diminuait avec l'augmentation de la dose du coagulant. L'auteur recommande une dose de 5 g de feuilles sèches de *C. procera* par litre de lait, car cette dose permet d'avoir un bon temps de prise, un bon égouttage du caillé et d'éviter le goût d'amertume observé avec des doses plus élevées. Ce type de coagulant était associé à un temps de coagulation d'environ 27 min sur le lait cru. Chikpah et al (2014) avaient testé des coagulants obtenus avec 2, 5, 7 g (feuilles et tiges sèches en proportions égales) et 18,7 ; 46,7 et 65,4 g (feuilles et tiges fraîches en proportions égales) de *C. procera* par litre de lait. Le temps moyen de coagulation différait significativement ($p < 0,05$) entre les coagulants obtenus avec des formes fraîches et sèches de *C. procera*. Les coagulants obtenus à partir des formes fraîches de *C. procera* étaient associés à un temps de coagulation plus court que les autres. Toutefois, ces auteurs recommandent un coagulant préparé avec 2 g de feuilles sèches de *C. procera*, car un tel coagulant présenterait les meilleures performances bien que le temps de coagulation de ce coagulant soit de 29 min. La nature (% de feuilles de *C. procera* par rapport à celui de tiges) et la quantité des organes aériens frais de *C. procera* dans le coagulant influencent la durée de coagulation du lait de vache lors de la production du WG. En effet, Baba-Moussa et al (2007) avait montré que l'activité coagulante de la sève

était plus élevée que celle des tiges et celle des tiges était supérieure à celles des feuilles fraîches de *C. procera*. Des temps de coagulation de 27, 21 et 18 min avaient été obtenus respectivement avec 10 g par litre de feuilles, de tiges et d'un mélange en proportions égales de tiges et feuilles fraîches (Aïssou et al., 2016). Ces résultats étaient similaires à ceux rapportés par Dossou et al (2006) qui avaient noté l'apparition de la coagulation au bout de 20 à 25 minutes avec l'utilisation de 7 à 12 g de *C. procera* par litre de lait cru. Par ailleurs, Aïssou et al (2016) recommandent l'utilisation d'un coagulant obtenu avec 35 g d'un broyat constitué de 90 % de tiges et 10 % de feuilles fraîches de *C. procera* pour la coagulation d'un litre de lait cru. Ce coagulant permettrait un temps de coagulation d'environ 13 min. Un temps de coagulation encore plus court (6,40 min) avait été obtenu par Kra et al (2006) avec un coagulant de 7 ml de volume obtenu à partir d'un pressage de 100 g de broyat de feuilles fraîches de *C. procera*. Dans la présente étude, des quantités de *C. procera* de 50, 100 et 150 g/kg de lait ont été utilisées pour la préparation du coagulant. En rapportant ces quantités de *C. procera* à la quantité totale de lait coagulé, les doses de coagulant utilisées dans cette étude sont donc 5, 10 et 15 g de *C. procera* par kg de lait et la dose de 5 g de 100 % de tige fraîche de *C. procera* est la dose optimale qui permettrait une coagulation en 16 min.

Influence des paramètres de production sur le rendement. Deux types de paramètres liés au rendement ont été calculés dans la présente étude. Il s'agit du rendement brut de production qui est largement utilisé dans la littérature (Rayantou, 2017 ; Chikpah et al., 2014 ; Aïssou et al., 2016 ; Dossou et al., 2006 ; Kra et al. 2006) et du coefficient de rétention de matière sèche. Le coefficient de rétention de matière sèche exprime la quantité de matière solide du lait qui a été utilisée pour la constitution de la matière solide du WG. Un tel coefficient n'est pas influencé par la quantité d'eau résiduelle du WG. Par contre, le rendement brut de production dépend de la quantité d'eau résiduelle du WG qui dépend à son tour des conditions d'égouttage. Par exemple, des rendements bruts optimaux de 58 % ; 45 % ; 30 % ; 20 % ; 11 % ont été rapportés par Kra et al (2006, 2009), Aïssou et al (2016), Chikpah et al (2014) et Rayanatu (2017) respectivement. Ces rendements rapportés par la littérature sont très différents les uns des autres et sont liés aux conditions de production. Le rendement de 11 % obtenu par Rayanatu (2017) est lié à un pressage du fromage pendant 3 heures. Kra et al (2006) ne mentionnent pas la durée d'égouttage et ceci pourrait expliquer le rendement de 58 % obtenu par ces auteurs. La durée de l'égouttage n'est pas précisée non plus par Aïssou et al (2016) qui ont obtenu un rendement optimal de 30 %. Dans la présente étude, un rendement optimal de 29 % a été obtenu. Le rendement de la présente étude constitue une nette amélioration du rendement fromager habituel obtenu au Bénin c.-à- .d. 16 à 20 % (Dossou et al., 2006). Toutefois, le coefficient de rétention de matière sèche serait la meilleure forme d'expression de l'efficacité de la coagulation. Dans cette étude, 64 % des matières solides du lait seraient récupérés dans les conditions optimales de coagulation. Le rendement brut et le coefficient de rétention augmenteraient avec la quantité de tiges *C. procera* et le temps d'extraction de l'enzyme. Cette

évolution est conforme aux constats de Chikpah et al (2014) qui avaient noté une augmentation du rendement avec l'augmentation de la quantité de *C. procera*.

4.3. Impact des conditions de coagulation sur la qualité du Wagashi Gassirè obtenu

Les paramètres physico-chimiques de qualité qui ont satisfait les critères pour être expliqués par le PCC utilisé dans cette étude sont les teneurs en protéines et graisse ainsi que la luminance du WG. Selon la littérature, des rapports protéines/grasses de 0,70 - 1,15 (0,75 pour la présente étude) n'affecteraient pas les performances de coagulation du lait, mais pourraient affecter de manière significative la composition du fromage (Guinee et al., 1997 ; Panthi et al., 2017). Dans le cas de cette étude, une augmentation de la teneur en protéines et une diminution de la teneur en graisse sont associées à une diminution de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera*. Par ailleurs, l'augmentation de luminance du WG est associée à une diminution du temps d'extraction de l'enzyme. Ces constats expliquent le temps optimal d'extraction de l'enzyme de 5 min et la proportion de feuilles/tiges optimale de 0 % observés dans cette étude. Dans ces conditions, les teneurs (poids sec) en protéines, en graisse et la luminance obtenues sont 39 %, 42 % et 93,3. Aïssou et al (2016) avaient obtenu des luminances optimales de 86,1 pour le WG provenant du lait de la vache Girolando et de 87,4 pour le WG issu du lait de vache Borgou.

4.4. Analyse de la perception des consommateurs du Wagashi Gassirè produit dans les conditions optimales

L'appréciation des panélistes impliqués dans cette étude montre que le WG produit dans les conditions optimales répond aux critères de préférences des consommateurs décrits par Dossou et al (2022). Selon ces auteurs, la couleur blanche est le premier critère d'appréciation du WG. S'en suivent les caractères mous, tendres et fermes utilisés pour décrire les sensations au toucher produit par le WG. Le WG produit dans les conditions optimales décrites par Aïssou et al (2016) a été diversement apprécié. Le WG issu du lait de vache de race Borgou a été plus apprécié que celui issu du lait de race Girolando. En général, la production du WG est réalisée avec un mélange de lait des différentes races comme dans le cas de cette étude. Par ailleurs, les scores d'appréciation obtenus pour les paramètres sensoriels lors de la présente étude sont plus élevés que ceux obtenus par Aïssou et al (2016). Ainsi donc, les appréciations obtenues dans cette étude sont pertinentes et traduisent bien les perceptions des consommateurs de WG.

Conclusion

Cette étude a montré l'applicabilité de la MRS dans la conduite de l'opération de coagulation du lait conduisant à la production du WG. Cette approche a permis de déterminer les conditions de coagulation pour un rendement fromager élevé par rapport au rendement habituel obtenu, mais aussi d'obtenir un WG répondant aux critères de préférence des consommateurs. Cette étude contribue à la standardisation du WG et constitue une première étape vers le développement d'une méthode rentable et facile à utiliser

par les productrices. Toutefois, des recherches sont nécessaires afin de mettre le coagulant à base du *C. procera* sous une forme prédosée, facile à utiliser.

Références bibliographiques

- Aboudoulaye MCD, Kaya S. 2020. Characterisation and standardisation of wangashi cheese production steps. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 19(4): 375–386. doi: 10.17306/J.AFS.2020.0827.
- Aïssi MV, Aïssou RCB, Soumanou MM. 2016. Influence de la complémentation des vaches laitières Girolando importées au Bénin sur les caractéristiques physico-chimiques du lait et du Waragashi (fromage Peuhl). *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin*. ISSN :1840-7099.
- Aïssou RCB, Aïssi MV, Youssao AKI, Soumanou MM. 2016. Caractéristiques physico-chimiques du fromage Peuhl produit dans les conditions optimales de coagulation à partir du lait de deux races de vaches du Bénin. *Nature et Technologie, B- Sciences Agronomiques et Biologiques*. 14 :37-43.
- Ben Amira A, Besbes S, Attia H, Blecker C. 2017 Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*. 20 (1): 76-93. doi:10.1080/10942912.2017.1289959.
- Appiah F, Ellis WO, Mathias J, Oduro I. 1998. Studies on traditional cheese (Woagashie) production in the Ashanti region. *Journal of Ghana Science Association*. 1(1): 96–104. doi: 10.4314/jgsa.v1i1.17790.
- Baba-Moussa F, Baba-Moussa L, Ahissou H, Bokossa I, Capo-Chichi B, Toukourou F, Sanni A. 2007. Propriétés coagulantes de *Calotropis procera* et ses possibilités d'utilisation en industrie agro-alimentaire. *Revue Cames*. 5:7-12.
- Barłowska J, Sz wajkowska M, Litwinczuk Z, Krol J. 2011. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00163.x.
- Bas D, Boyacı IH. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 78(3) :836-845.
- Bup ND, Abi CF, Tenin D, Kapseu C, Tchiegang C. 2012. Optimisation of the cooking process of sheanut kernels (*Vitellaria paradoxa* Gaertn.) using the Doehlert experimental design. *Food and Bioprocess Technology*. 5:108-117. doi: 10.1007/s11947-009-0274-z.
- Chikpah SK, Teye GA, Teye M, Mawuli FF. 2014. Effects of different concentrations of fresh and dried *Calotropis procera* (sodom apple) extract on cow milk coagulating time, cheese yield and organoleptic properties of west african soft cheese (wagashie). *European Scientific Journal*. 10(27): 317-326.
- de la Fuente MA, Juárez M. 2015. Milk and dairy products. In: de la Guardia M, Garrigues S, editors. *Handbook of mineral elements in Food*. Oxford: John Wiley and Sons; p. 645-668.

- Djibril ASD, Bothon FTD, Agbangnan DPC, Avlessi F. 2019. Girolando and Borgou cow's milk: physico-chemical and nutritional characterization. *American Journal of Food Science and Technology*. 7(6):242-245. doi: 10.12691/ajfst-7-6-12.
- Dossou J, Adote S, Soulé H. 2006. Production et transformation du lait frais en fromage peulh au Bénin, Rapport de guide de bonnes pratiques. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Dossou J, Atchouke GD, Dabadé DS, Azokpota P, Montcho JK. 2016. Evaluation comparative de la qualité nutritionnelle et sanitaire du lait de différentes races de vaches de quelques zones d'élevage du Bénin. *European Scientific Journal*. 12(3):140-159. doi:10.19044/esj.2016.v12n3p141.
- Dossou WA, Seko Orou BMT, Komagbe G, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, et al. 2022. Processing and preservation methods of Wagashi Gassirè, a traditional cheese produced in Benin. *Heliyon*. 8, Article e10605. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e10605.
- Douny C, Benmedjadi S, Brose F, Iko Afé OH, Igout A, Hounhouigan DJ, Anihouvi VA, Scippo ML. 2019. Development of an analytical method for the simultaneous measurement of 10 biogenic amines in meat: application to Beninese grilled pork samples. *Food Analytical Methods*. 12:2392–2400. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.06.013.
- Douny C, El Khoury R, Delmelle J, Brose F, Degand G, Moula N, Farnir F, Clinquart A, Maghuin-Rogister G, Scippo ML. 2015. Effect of storage and cooking on the fatty acids profile of omega-3 enriched eggs and pork meat marketed in Belgium. *Food Science and Nutrition*. 3(2):140-52. doi:10.1002/fsn3.197.
- EC (European Commission). 2023. Commission regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. Brussels: EC.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2019. Dietary reference values for the EU. <https://multimedia.efsa.europa.eu/drvs/index.htm?lang=en>. Assessed 2023 June 30.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2019. General standard for contaminants and toxins in food and feed CODEX STAN 193-1995. Rome: FAO/WHO
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226(1):497-509.
- Fox PF, McSweeney PLH. 2017. Cheese, an overview. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Netherland: Elsevier; p. 5-21. doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00001-6.
- Freitas CDT, Leite HB, Oliveira JBP, Amaral JL, Egito AS, Vairo-Cavalli S, Lobo MDP, Monteiro-Moreira ACO, Ramos MV. 2016. Insights into milk-clotting activity of latex peptidases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. *Food Research International* 87: 50–59. doi: 10.1016/j.foodres.2016.06.020.

- Gobert S, Pasqualini V, Dijoux J, Lejeune P, Durieux EDH, Marengo M. 2017. Trace element concentrations in the apex predator swordfish (*Xiphias gladius*) from a Mediterranean fishery and risk assessment for consumers. *Marine Pollution Bulletin*. 120:364-369. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.05.029.
- Granato D, Ribeiro JCB, Castro IA, Masson ML. 2010. Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chemistry*. 121: 899–906. doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.014.
- Guinee TP, Gorry CB, O’Callaghan DJ, O’Kennedy BT, O’Brien N, Fenelon MA. 1997. The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation properties of milk. *International Journal of Dairy Technology*. 50:99–106.
- Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. 2007. Bovine milk in human nutrition-a review. *Lipids Health Diseases*. 6,25. doi:10.1186/1476-511X-6-25.
- Henning DR, Baer RJ, Hassan AN, Dave R. 2006. Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads. *Journal of Dairy Science*. 89(4):1179-1188. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72187-7.
- ISO (International Organization for Standardization). 2014. Milk and milk products-Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation ISO 8968-1:2014. Geneva, Switzerland: ISO.
- ISO (International Organization for Standardization). 2017. Foodstuffs-Determination of water activity. ISO 18787:2017. Geneva, Switzerland: ISO.
- Jacob M, Doris J, Rohm H. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. 64(1):14-33. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x.
- Kalač P, Samková E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*. 55(12):521-537. doi: 10.17221/2485-CJAS.
- Kek SP, Chin NL, Yusof YA. 2014. Simultaneous time-temperature-thickness superposition theoretical and statistical modelling of convective drying of guava. *Journal of Food Science and Technology*. 51(12):3609-3622. doi: 10.1007/s13197-013-0923-0.
- Kora S. 2005. Contribution à l’amélioration de la technologie de production du fromage peulh au Bénin. [Thèse d’ingénieur agronome]. Abomey-Calavi : Université d’Abomey-Calavi.
- Kra KAS, Megnanou RM, Saki SJ, Ackpa EE, Assidjo NE. 2009. Amélioration du rendement de la technique traditionnelle de production fromagère Peulh par l’utilisation appropriée d’extraits foliaires de *Calotropis procera*. *Revue Ivoirienne de Science et Technologie*. 13 :213-223.
- Kra S, Assidjo NE, Dioppoh KJ, Cardot P. 2006. Use of experimental design for Peuhl cheese process optimization. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 10 (2): 83 – 89.

- Legg AK, Carr AJ, Bennett RJ, Johnston KA. 2017. General Aspects of Cheese Technology. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Netherland: Elsevier; p. 643-675. doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00026-0.
- MAEP (Ministère de l'Agriculture de l'Elevage et de la Pêche). 2014. Etude des filières lait et viande, Rapport définitif sur la filière lait (PAFILAV). Cotonou : MAEP.
- MAEP (Ministère de l'Agriculture de l'Elevage et de la Pêche). 2007. Arrêté N° 0362/ MAEP/D-CAB/SGM/DRH/DP/SA du 30 octobre 2007 de fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en République du Bénin. Cotonou: MAEP.
- Mattiello S, Caroprese M, Matteo CG, Fortina R, Martini A, Martini M, Parisi G, Russo C, Zecchinia M. 2018. Typical dairy products in Africa from local animal resources. Italian Journal of Animal Science. 15(19):740-754. doi:10.1080/1828051X.2017.1401910.
- Mazorra-Manzano MA, Moreno-Hernández JM, Ramírez-Suarez JC. 2018. Milk-clotting plant proteases for cheesemaking. In: Guevara MG, Daleo GR, editors. Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes. Switzerland: Springer Nature; p. 21-41.
- Nout MJR, Rombouts FM, Havelaar A. 1989. Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. International Journal of Food Microbiology. 8:351-361. doi:10.1016/0168-1605(89)90006-8.
- Panthi RR, Jordan KN, Kelly AL, Sheehan J.J. 2017. Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Netherland: Elsevier; p. 23-50. doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00002-8.
- Pereira PC. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. Nutrition. 30:619-627. doi:10.1016/j.nut.2013.10.011.
- Rayanatou IA. 2017. Étude de la coagulation du lait par l'extrait de feuilles de *Calotropis procera* en réponse au contexte laitier dans la région de Maradi, au Niger. [Thèse de doctorat]. Bretagne : Université Bretagne Loire Agro Campus Ouest.
- Samková E, Špička J, Pešek M, Pelikánová T, Hanuš O. 2012. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. South African Journal of Animal Science. 42(2):83-100. doi:10.4314/sajas.v42i2.1.
- Scippo ML, Eppe G, De Pauw E, Maghuin-Rogister G. 2004. DR-CALUX screening of food samples: evaluation of the quantitative approach to measure dioxin, furans and dioxin-like PCBs. Talanta. 63(5):1193-202. doi: 10.1016/j.talanta.2004.05.037.63.
- Seme K, Pitala W, Osseyi GE. 2015. Qualité nutritionnelle et hygiénique de laits crus de vaches allaitantes dans la région maritime au sud-Togo. European Scientific Journal. 11: 359-376.
- Shah MA, Mir SA, Paray MA. 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking : a review. Dairy Science and Technology. 94:5–16. doi: 10.1007/s13594-013-0144-3.

- Uzeh RE, Ohenhen RE, Rojugbokan AK. 2006. Microbiological and nutritional qualities of dairy products: nono and wara. *Nature Science*. 4(3):37–40.
- Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. 2013. Milk and dairy product composition. In: Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D, editors. *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome: FAO; p. 41-102.

Supplementary data

Tableau S1 : Coefficients codés des modèles, seuil de signification, coefficient de détermination (r^2) et Absolute average deviation (ADD) des réponses étudiées

Coefficients	b0	b1	b2	b3	b11	b22
TpsCoag	12,845***	0,4	0,3	-0,8	-0,86	4,64**
RdBrut	0,25918***	0,00985	-0,00375	-0,0026	-0,0113	0,0462**
RetMS	0,5089***	0,0265	0,0096	-0,0327	0,0112	-0,0139
MS	46,07***	-1,031	0,424	0,997	1,55	-4,91*
Graisse	54,48***	1,19	4,47	1,42	1,51	-21,28***
Protéines	36,142***	-0,778*	-0,764*	-0,972*	-0,467	1,794*
pH	6,626***	0,00333	-0,008	-0,004	-0,0033	0,0067
Aw	0,997983***	0,00008	-0,00082	-0,00058	0,000368	0,000068
Ac. Tritrable	0,020063***	0,000032	0,000361	-0,000059	0	0,000151
L*	92,243***	-0,277	0,145	-0,191	0,183	-0,783*
a*	-8,509***	0,123	-0,096	0,038	-0,363	0,644*
b*	23,569***	0,143	0,226	-0,31	0,089	0,044
ΔE	21,3619***	-0,0283	0,209*	-0,1133	-0,377*	-0,251
Acide caprique	2,398***	0,408	0,445	-0,259	-0,112	-0,205
Acide laurique	2,059***	0,429	0,246	-0,032	0,185	0,167
Acide myristique	9,558***	0,465	0,466	-0,094	0,07	0,25
Acide heptadécanoïque	1,3585***	0,0779	0,0846	-0,0886	-0,046	-0,108
Acide stéarique	21,027***	0,38	-0,41	-0,691	-0,48	-0,1
Sodium (Na)	577,2***	-0,1	2,3	-30,7	-5,8	81,8
Magnésium (Mg)	682,56***	-7,7	-3,13	-0,2	22,9	30,8
Phosphore (P)	8083,4***	-110,9	-113,6	-174	81	278
Potassium (K)	2975,4***	60,6	39,5	-56,3	139	260
Calcium (Ca)	12460***	-158	-140	-121	430	378
Manganese (Mn)	1,123***	0,128	0,119	0,166	0,005	0,242
Fer (Fe)	3,959***	0,725	0,109	0,268	0,313	0,345
Cuivre (Cu)	0,701***	-0,18	0,207	0,089	-0,085	0,25
Zinc (Zn)	52,85***	-1,79	-2,49	-1,28	1,52	2,81
Selenium (Se)	0,2688***	0,0084	0,0054	0,0021	-0,0122	-0,0173
Vanadium (V)	0,10723***	0,00291	0,00657	0,00182	-0,00977	-0,00153
Cobalt (Co)	0,020061***	-0,001578	0,000893	0,000702	0,0012	0,00363
Rubidium (Rb)	17,142***	0,288	0,439	-0,334	0,182	1,953
Strontium (Sr)	4,263***	-0,097	0,002	-0,064	0,098	0,122

TpsCoag : Temps de coagulation, *Rdbrut* : rendement brut, *RetMS* : coefficient de rétention de matière sèche, *MS* : matière sèche, *Ac.* : Acidité, *L** : luminance, *a** : indice de vert/rouge, *b** : indice de bleu/jaune, ΔE : différence totale de couleur, *b0* : constante, *b1* : coefficient linéaire du temps d'extraction de l'enzyme, *b2* : coefficient linéaire de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera*, *b3* : coefficient linéaire de la quantité de *C. procera*, *b11* : coefficient quadratique du temps d'extraction de l'enzyme, *b22* : coefficient quadratique de la proportion de feuilles/tiges, *b33* : coefficient quadratique de la quantité de *C. procera*, *b12* : coefficient d'interaction du temps d'extraction de l'enzyme et de la proportion de feuilles/tiges, *b13* : coefficient d'interaction du temps d'extraction de l'enzyme et de la quantité de *C. procera*, *b23* : coefficient d'interaction de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera* et la quantité de *C. procera*, les coefficients portant d'astérisque sont significativement différent de zero, * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tableau S1 (continue) : Coefficients codés des modèles, seuil de signification, coefficient de détermination (r^2) et Absolute average deviation (ADD) des réponses étudiées

Coefficients	b33	b12	b13	b23	r^2 (%)	ADD (%)
TpsCoag	1,14	-2,125**	-2,625**	2,875***	89,77	7,61
RdBrut	-0,0041	-0,00625	0,005	0,00975	69,17	4,59
RetMS	0,0593	-0,0158	0,0423	0,0521*	62,21	6,72
MS	0,99	2,072	1,644	-0,502	66,73	3,21
Graisse	16,17**	-0,7	0,94	-1,04	78,1	8,96
Protéines	0,108	-0,475	-1,042*	0,734	81,12	1,59
pH	0,0167	-0,00375	-0,01292	0,00875	48,42	0,22
Aw	-0,000432	0,000088	-0,000062	-0,000687	48,03	0,83
Ac. Tritrable	-0,000152	0,000301	-0,000451	-0,000599	31,91	12,34
L*	0,98*	0,459*	-0,067	-0,027	70,97	0,29
a*	-0,691*	-0,202	-0,422*	0,296	74,11	2,74
b*	-0,519	-0,408*	0,111	0,257	68,76	1,21
ΔE	0,161	-0,0279	0,2037*	0,3988***	86,84	0,68
Acide caprique	0,171	0,418	0,308	-0,474	48,98	104,66
Acide laurique	0,27	0,315	-0,058	-0,352	43,86	24,56
Acide myristique	0,07	0,434	-1,343	-0,699	45,96	8,71
Acide heptadécanoïque	-0,012	0,1169	-0,0259	-0,0776	39,27	10,22
Acide stéarique	-0,39	0,141	-1,585	-0,1	33,25	5,92
Sodium (Na)	-23,5	-52,2*	-11,5	16,8	57,57	6,31
Magnésium (Mg)	-21	-9,65	-5,72	-16,79	60,43	4,9
Phosphore (P)	-7	-22	-150	-6	60,9	2,31
Potassium (K)	-207	-162,3	-76,4	14,9	54,95	4,6
Calcium (Ca)	-190	36	-144	286	54,15	2,41
Manganese (Mn)	-0,414	0,072	-0,004	0,132	53,62	18,62
Fer (Fe)	-0,098	0,26	0,034	1,039*	50,87	19,28
Cuivre (Cu)	-0,127	-0,165	-0,133	0,107	47,91	26,29
Zinc (Zn)	-0,5	2,06	-0,62	0,85	53,55	3,93
Selenium (Se)	0,03	0,0269	-0,0245	-0,0119	40,72	9,41
Vanadium (V)	0,01033	0,00216	-0,00621	-0,00085	43,36	6,24
Cobalt (Co)	-0,00183	-0,000748	-0,002055	0,000663	64,86	27,98
Rubidium (Rb)	-1,376	-1,112	-0,656	-0,448	57,15	20,55
Strontium (Sr)	-0,156	-0,015	-0,18	0,207	37,98	4,78

TpsCoag : Temps de coagulation, *Rdbrut* : rendement brut, *RetMS* : coefficient de rétention de matière sèche, *MS* : matière sèche, *Ac.* : Acidité, *L** : luminance, *a** : indice de vert/rouge, *b** : indice de bleu/jaune, ΔE : différence totale de couleur, *b0* : constante, *b1* : coefficient linéaire du temps d'extraction de l'enzyme, *b2* : coefficient linéaire de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera*, *b3* : coefficient linéaire de la quantité de *C. procera*, *b11* : coefficient quadratique du temps d'extraction de l'enzyme, *b22* : coefficient quadratique de la proportion de feuilles/tiges, *b33* : coefficient quadratique de la quantité de *C. procera*, *b12* : coefficient d'interaction du temps d'extraction de l'enzyme et de la proportion de feuilles/tiges, *b13* : coefficient d'interaction du temps d'extraction de l'enzyme et de la quantité de *C. procera*, *b23* : coefficient d'interaction de la proportion de feuilles/tiges de *C. procera* et la quantité de *C. procera*, les coefficients portant d'astéris sont significativement différent de zero, * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Table S2 : Limites de quantification (LOQ) des minéraux

Minéral	LOQ (mg/kg poids sec)	
	Lait	Wagashi Gassirè
Lithium (Li)	0,00012	0,00012
Beryllium (Be)	0,00000	0,00000
Bore (B)	0,05846	0,05846
Sodium (Na)	0,85893	0,85895
Magnésium (Mg)	1,15738	1,15741
Aluminium (Al)	2,88630	2,88638
Phosphore (P)	7,55685	7,55705
Potassium (K)	0,08515	0,08515
Calcium (Ca)	4,88334	4,88348
Vanadium (V)	0,00600	0,00600
Chrome (Cr)	0,05305	0,05306
Fer (Fe)	1,13790	1,13794
Manganèse (Mn)	0,01881	0,01881
Cobalt (Co)	0,00227	0,00227
Nickel (Ni)	0,00549	0,00549
Cuivre (Cu)	0,42409	0,42410
Zinc (Zn)	0,05914	0,05914
Arsenic (As)	0,03586	0,03587
Sélénium (Se)	0,25724	0,25725
Rubidium (Rb)	0,00105	0,00105
Strontium (Sr)	0,04392	0,04392
Molybdène (Mo)	0,01252	0,01252
Argent (Ag)	0,00378	0,00378
Cadmium (Cd)	0,00329	0,00329
Etain (Sn)	0,01280	0,01280
Antimoine (Sb)	0,00777	0,00777
Barium (Ba)	0,01905	0,01905
Thallium (Tl)	0,00033	0,00033
Plomb (Pb)	0,02447	0,02447
Bismuth (Bi)	0,01058	0,01058
Uranium (U)	0,00046	0,00046

**ETUDE 5 : Conditions
améliorées de conservation
et impact sur la qualité du
Wagashi Gassirè**

Projet de publication en préparation

Combined effect of steam cooking and vacuum packaging on the shelf life of Wagashi Gassirè cheese produced in Benin

Alphonse Wanignon Dossou^{a,b,c*}, Baké Marie Thérèse Seko Orou^{d,e}, Gwladys Komagbe^{f,g}, Philippe Sessou^g, Abdou Karim Issaka Youssao^h, Souaïbou Farougou^g, Joseph Djidjoho Hounhouigan^c, Jacques Mahillon^f, Roch Mongbo^e, Marc Poncelet^d, Samiha, Boutaleb^a, Sylvie Gobert^{i,j}, Yann Eméric Madode^c, Paulin Azokpota^c, Antoine Clinquart^b, Marie-Louise Scippo^a, Caroline Douny^a

^a*FARAH/Laboratory of Food Analysis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium*

^b*FARAH/Laboratory of Food Technology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium*

^c*Laboratory of Food Sciences and Technology, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^d*Observing Recomposing Worlds, Faculty of Social Sciences, University of Liège, Liège, Belgium*

^e*Laboratory of Analysis of Social Dynamics and Development Studies, Faculty of Agronomic Sciences, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^f*Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Faculty of Bioscience Engineering, Catholic University of Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium*

^g*Research Unit on Communicable Diseases, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

^h*Laboratory of Animal Biotechnology and Meat Technology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin*

ⁱ*Laboratoire d'Océanologie, Centre MARE, Université de Liège, Sart Tilman, B6c, 4000 Liège, Belgium*

^j*Station de Recherches Sous-marines et Océanographiques, Punta Revellata, BP33, 20260 Calvi, France*

**corresponding author: Alphonse Wanignon Dossou, dossoul6@gmail.com, 01 BP 2009 Cotonou, University of Abomey-Calavi, Benin Republic*

Abstract

In this study, the combined effect of steaming and vacuum packaging on the physicochemical characteristics, nutritional composition, chemical hazards content, and sensorial attributes of Wagashi Gassirè (WG) during storage was assessed. To that end, the WG samples were simply packaged or vacuum packaged, subjected to steaming for 20 min, cooled, and stored at 28-30°C or 5°C for nine days. Regardless of the storage temperature and preservation treatments, no significant differences were found in the dry matter, proteins, fat contents, fatty acids, and essential minerals composition of the WG samples during storage. The pH and Aw of the WG samples stored at 28°C significantly ($p < 0.05$) decreased during shelf life and these decreases were more important for simple packaged WG (6.5 – 6 for pH and 0.997 – 0.988 for Aw) than vacuum packaged WG (6.5 - 6.2 for pH and 0.998 – 0.992 for Aw) while pH and Aw remained constant for WG samples stored at 5°C. Ammonia and tryptamine contents followed the same trend as pH and Aw. For the panelists used in this study, sensorial attributes of WG samples were better preserved by vacuum packaging than simple packaging and by a lower temperature than room temperature. The results of this study will be useful for processors and traders dealing with daily cooking as a preservation method of WG.

1. Introduction

Around the world, a diversity of cheeses (1400 according to some estimates) is available (McSweeney et al., 2017). Cheese processing is one of the most significant methods of preserving the major milk components such as proteins, minerals, and fat (Mazorra-Manzano et al., 2018). In Benin and some West African countries, fresh cow milk is processed into a traditional local cheese called Wagashi Gassirè (WG), which remains, in Benin, the most consumed dairy products (Dossou et al., 2006; Mattiello et al., 2018). The technology of WG has been developed in Benin before its spread in Nigeria, Togo, Burkina Faso, and Niger (Dossou et al., 2006).

WG is a soft non-ripened cheese obtained by hot (65 to 70 °C) coagulation of fresh whole milk using *Calotropis procera* extract that contains a plant enzyme known as calotropain (Mattiello et al. 2018; Baba-Moussa et al. 2007; Dossou et al. 2006). In Benin, WG is mainly produced in the northern part of the country where dairy farming is more developed and widespread (MAEP 2014; Kora 2005). WG is an important source of protein (23 %), fat (18 %), and minerals (1.3-1.8 %) (Appiah et al. 1998; Uzeh et al. 2006). Its consumption could help the population to meet the adult recommended daily intakes of 0.83 g protein /kg body weight (bw), 1000 mg calcium, and 11 mg iron (EFSA, 2019), for example.

Despite its nutritional importance, the preservation of WG encounters a number of constraints including the ineffectiveness of traditional preservation methods leading to a rapid deterioration of the product (Sessou et al., 2016). In Benin, the traditional preservation methods include boiling (in simple water, in salty water, in water with shea leaves), sun-drying, colouring (using various dyes, such as sorghum cobs,

sorghum panicles, and teak leaves), immersion (in whey, well or tap water), smoking, and frying. Sometimes, WG is packed in a plastic bag for boiling (Sessou et al., 2013; Dossou et al., 2022). These preservation methods combined with the absence of suitable packaging increase the risks of microbial and chemical contaminations, limiting thereby the abilities for preservation, transportation, and commercialisation of WG in the national, regional, and international markets (Sessou et al., 2016). The challenges related to the preservation and the valorisation of WG call for the development of alternative preservation techniques that suit the socioeconomic and environmental context of Benin.

In order to prolong the shelf life of WG, several researchers have worked on its stabilisation by chemical or heat treatments and packaging. The treatment of WG with 10 % propionic acid and 0.1 % sorbic acid prolonged its shelf life but adulterated the organoleptic quality of the product and affected its acceptability to consumers (Dossou et al., 2006). Volatile extracts from the leaves of indian lemongrass (*Cymbopogon citratus*), crown pepper (*Pimenta racemosa*), wild basil (*Ocimum gratissimum*) and especially clove (*Syzygium aromaticum*) were shown to possess antifungal properties on fungal isolates of WG and could be used to effectively control pre- and post-production mould contamination of WG (Kèkè et al., 2009; Sessou et al., 2016). Dossou et al (2016) found that the combination of drying with hot air (60 °C for 4 hours) and vacuum packaging stabilised the WG for 60 days, both at refrigeration temperature (4-5 °C) and at ambient temperature (28-32 °C). Other experiments of preserving salted WG at low temperatures showed a negative effect on texture although the microbiological qualities of the product were acceptable (Mazou et al., 2012). Tchobo et al (2014) dried different types of WG in an oven at 45 and 60 °C for 48 h and concluded that drying at 45 °C better preserves the physico-chemical characteristics of WG.

Despite these research works, the preservation of WG by processors and traders remained a challenge in the Benin context. In the absence of suitable packaging, Dossou et al (2022) reported that daily boiling remained the main preservation practice used by WG processors and traders. Daily boiling at which WG is subjected, if it reduces the remaining microbial load, could destroy the most heat-labile nutrients in the WG. Indeed, boiling produced the highest losses of minerals, followed by heating with steam, stewing, and frying due to the water solubility of minerals which increases with the temperature. This repeated heat treatment may destroy nutrients in the product such as protein, vitamins, and minerals (Sessou et al., 2013; Barciela-Alonso et Bermejo-Barrera, 2015). Sometimes, WG was packed in plastic bags before daily cooking (Dossou et al., 2022). Plastic bags are manufactured by using different types of polymers whereas heavy metals and organometallic compounds (additives) are encapsulated with polymer matrix to optimise its properties and to reduce production cost. These additives can gradually be leached out into environment throughout its life cycle in response to light or heat (Alamn et al., 2018). Therefore, new research perspectives are needed to establish effective preservation methods capable of

ensuring the safety and the commercial quality of WG that could be transferred to other stakeholders in the field.

The main objective of this work is to determine the effect of steam cooking combined with vacuum packaging on the shelf life of WG and to assess its physicochemical characteristics, nutritional composition, chemical hazards content, and sensorial attributes during storage. As WG is the most widespread and consumed local cheese in Benin (Mattiello et al., 2018), the data from this study will be useful for processors and traders helping them leave the daily cooking of WG.

2. Material and methods

2.1. Milk and *Calotropis procera* collection

This study was carried out at the experimental dairy unit of the University of Abomey-Calavi. The biological materials were a mixture of cow's milk and the leaves and stems of *Calotropis procera*. The milk used for the experiments was from Kodome farm located at Kpomasse, far of 45 km from the experimental dairy unit. The farm's herd included 35 dairy cows between 5 and 17 years old, belonging to the Goudali, Yakana, and Bobodji breeds and crosses of these three breeds. The dairy cows of the herd were fed with pasture from KPOMASSE region. To minimise variations in milk composition, the milk mixtures were from identical dairy cows belonging to this farm (Schwendel et al., 2015). For the production of WG, the milk collected after milking was immediately filtered in the stainless-steel container and directly transported to the experimental dairy unit at the University of Abomey-Calavi. *C. procera* leaves and stems were collected at the University of Abomey-Calavi.

2.2. Production of Wagashi Gassirè cheese

For WG production, fresh *C. procera* leaves and stems were washed, crushed, and weighed. One hundred grams of crushed *C. procera* (50 g of leaves and 50 g of stems) and 1 kg of filtered milk were mixed for 25 min (rotation at 550 rpm), then filtered using a 0.3 mm mesh sieve. The filtrate obtained was used as a coagulant (Dossou et al., 2022). Nine kilograms of milk were filtered using a 0.3 mm mesh sieve in a stainless-steel pot and then heated to 70 °C with a butane gas device. One kilogram of the obtained coagulant was added and the resulting mixture was maintained between 72 and 73 °C until coagulation that was characterised by the appearance on the surface of cream in the form of an oily foam and whey that was more or less greenish (Dossou et al., 2022). After coagulation, the coagulum and whey were cooked at 90 °C for 30 min. The obtained coagulum was drained for 10 min using an inclined draining table equipped with a whey collection device, then pressed with a manual screw press for 3 hours.

2.3. Storage of Wagashi Gassirè cheese for preservation

The pressed coagulum was cut into pieces of 200 g and placed in embossed food-grade vacuum bags (15 cm × 20 cm). The obtained WG samples thus obtained were divided into two batches for two preservation treatments. The first treatment consisted of sealing the packaging (using a heat sealer) and

subjecting the WG samples to steam cooking for 20 min (WGC samples). The second treatment consisted of vacuuming the WG samples, sealing (using a heat sealer), and steam cooking for 20 min (WGV samples). All the WG samples treated were cooled and stored at 5 °C and ambient temperature (28-30 °C) for nine days. Four types of WG were obtained i.e WGVA (vacuum steam cooked WG stored at ambient temperature), WGVF (vacuum steam cooked WG stored at 5 °C), WGCA (steam cooked WG stored at ambient temperature), and WGCF (steam cooked WG stored at 5 °C). Two types of control were used, the ambient temperature control (WGTA) and the 5 °C control (WGTF). Sampling for physicochemical, nutritional, and chemical contaminant analyses was performed at 3-day intervals (day zero, day 3, day 6, and day 9). These experiments were replicated three times during September and November 2022, resulting in 3 milk samples and 63 WG samples for all types.

2.4. Physicochemical, nutritional, sensorial, and chemical hazards analyses

pH and proximal composition analyses. The pH of the milk was determined using Hanna Instruments HI991001 (electrode HI12963) pH meter. The pH of the WG was determined after production using a Knick pH-meter 765 Calimatic (electrode Mettler Toledo 406-M6-DXX-S7/25). The moisture was determined by the difference in mass of the samples after and before freeze-drying for 48 hours (Lyoquest, Telstar). The milk's apparent density and temperature were measured using a lactodensimeter MV LA.1015-1045 of Grosseron (France). The apparent density was corrected using the following formula: corrected density = apparent density + 0.2 (milk temperature - 20 °C) (Seme et al., 2015). Water activity was determined according to ISO 18787:2017 using AQUALAB 4TE 2A@250V Aw-meter (ISO, 2017). The crude protein content was determined by the Kjeldahl method according to ISO 8968-1:2014 (ISO, 2014). The fat was extracted by the Folch method (Folch et al., 1957).

Nutritional composition analyses. After saponification and methylation, twenty-nine fatty acid methyl esters were analysed by gas chromatography (GC) (Thermo Fisher Scientific, USA) using a CPSil88 fatty acid column (100 m × 0.25 mm; 0.2 µm) (Varian, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) coupled to a PolarisQ ion trap mass spectrometer (MS) (Thermo Fisher Scientific, USA) (Douny et al., 2015). Thirty minerals were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Gobert et al., 2017) and classified into essential minerals (eleven) and other minerals (nineteen) (EFSA, 2019).

Chemical hazards analyses. Dioxins and dioxin-like PCBs compounds (referred to by the general term "dioxins" in the rest of the text) were determined by DR-CALUX (Dioxin Responsive - Chemically Activated Luciferase Gene Expression) cell-based assay (Scippo et al., 2004). Aflatoxin M1 (AFM1) was determined by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method using the RIDASCREEN kit R1121 of R-Biopharm (Germany). UPLC-FLD (Ultra-Performance Liquid Chromatography combined with Fluorescence Detection) was used to determine ten biogenic amines and ammonia (Douny et al., 2019). All milk samples as well as WG samples were analysed for the parameters (pH

and proximal, nutritional, and chemical hazards) described above except for corrected density, water activity, AFM1, and dioxins. Corrected density and dioxins were determined for all milk samples, water activity for all WG samples, and AFM1 for milk and WG samples for days 0, 3, and 6.

Sensory attribute analyses. Sensory attributes analyses were performed using the adapted method from Aïssou et al (2016). Forty-four untrained panelists were recruited from Dassa and Nikki. The participants were from WG processors and WG consumers involved in the study carried out by Dossou et al (2022). They were selected based on their consumption frequency of WG (at least once every week). The ethics committee of the University of Abomey-Calavi approved all assessors included in the experiments, and all the assessors provided informed written consent. The sensory tests were carried out over 4 consecutive days. Sensory evaluation was based on a five-point hedonic scale from 1 to 5 (1- "disliked extremely"; 2- "disliked"; 3- "neither like nor dislike"; 4- "like"; to 5 –"like extremely") according to Aïssou et al (2016). The sensory quality attributes considered were flavour, colour, texture, and overall acceptability of products.

2.5. Statistical analysis

MS Excel 2013 was used for recording the data and the descriptive analysis was performed using the SAS System 9.4 software. For nutritional parameters, Student's T-test was performed to compare the means of each preservation treatment (WGVA, WGVF, WGCA, WGCF, WGTA, and WGTF) day after day. Means were calculated considering the samples for which the analysed nutritional parameter was detected. For chemical hazards, the lower bound means were calculated and used for Student's T-test. The Statistical significance was set at 5%.

3. Results

3.1. Physicochemical characteristics, nutritional composition, and chemical hazards content of cow milk and Wagashi Gassirè

As shown in Table 1, the average pH of fresh milk and WG were 6.9 ± 0.0 and 6.5 ± 0.0 , respectively, the milk density was 1029.1 ± 0.1 g/L and the water activity of WG was 0.99 ± 0.0 . The dry matter of the fresh milk samples was 13.3 ± 0.5 g/100 g. The crude protein and fat contents were 26.2 ± 0.8 , and 32.2 ± 0.7 g/100 g dry weight (dw), respectively. For WG samples, they were 46.9 ± 1.2 g/100 g for dry matter, 37.5 ± 1.2 , and 49.1 ± 3.4 g/100 g dw for crude protein and fat contents, respectively (Table 1).

Table 1: Physicochemical parameters and proximal composition (mean±sd) of cow milk and Wagashi Gassirè cheese

Physicochemical parameters and proximal composition	Milk (n=3)	WG (n=3)	WGC (n=3)	WGV (n=3)
Corrected density	1029.1±0.1	Nd	nd	nd
pH	6.9±0.0	6.5±0.0	6.5±0.0	6.5±0.0
Aw	nd	0.996±0.000	0.997±0.002	0.998±0.001
Dry matter (g/100 g)	13.3±0.5	46.9±1.2 ^b	45.4±0.6 ^b	41.7±1.2 ^a
Fat (g/100 g dw)	32.2±0.7	49.1±3.4	48.8±5.2	50.3±2.7
Protein (g/100 g dw)	26.2±0.8	37.5±1.2	37.5±0.9	37.2±0.8

WG: Wagashi Gassirè, WGC: cooked Wagashi Gassirè, WGV: vacuum cooked Wagashi Gassirè, nd: not determined, dw: dry weight, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P<0.05$) between WG, WGV and WGC, n: number of analysed samples, sd: standard deviation

Fifteen fatty acids were detected in milk and WG fat, among which eleven were detected in all milk samples analysed, as well as in all WG samples, i.e. capric, lauric, myristic, palmitic, heptadecanoic, stearic, palmitoleic, oleic, linoleic, rumenic, and alpha-linoleic acids (Table 2). The main fatty acids (expressed in g/100 g total fatty acids,) were palmitic acid (29.0±0.9 and 28.9±1.2, in milk and WG, respectively), stearic acid (22.8±2.0 and 20.4±1.3) and oleic acid (28.4±0.7 and 27.8±0.7). Regarding essential fatty acids, about 1.5% and 1.6% linoleic acid (LA) was present in the fat of milk and WG samples, respectively, while alpha-linolenic acid (ALA) was found in a small amount (ca. 1.1%) in the fat of milk and WG samples. Saturated fatty acids (SFA) represented an average of 65.0±1.2% and 61.0±0.3% of total fatty acids of milk and WG, respectively, while monounsaturated fatty acids (MUFA) contributed to 30.2±0.9% and 34.4±0.5% of total fatty acids of milk and WG, respectively. Among polyunsaturated fatty acids (PUFA), besides LA and ALA, rumenic, stearidonic, and isolinoleic acids were found in small amounts for both milk and WG (Table 2).

Table 2: Fatty acids composition (mean±sd) of cow milk and Wagashi Gassirè cheese

Fatty acids (g/100g total fatty acids)		Milk (n=3)	WG (n=3)	WGC (n=3)	WGV (n=3)
SFA	C10:0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.6±0.6	1.8±0.5
	C12:0	1.8±0.0	1.0±0.0	1.7±0.6	1.6±0.7
	C13:0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C14:0	9.1±0.3	8.2±0.2	8.6±1.0	8.6±0.4
	C16:0	29.0±0.9	28.9±1.2	30.0±1.4	30.4±1.1
	C17:0	1.1±0.0	1.2±0.0	1.1±0.1	1.1±0.1
	C18:0	22.8±2.0	20.4±1.3	21.4±2.3	21.5±2.2
	C20:0	<0.1	0.3*	<0.1	<0.1
	C22:0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C24:0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
MUFA	C16:1	1.7±0.2	1.8±0.1	1.7±0.2	1.7±0.2
	C17:1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C18:1,9t	<0.1	4.8±0.4	4.7*	4.5*
	C18:1,9c	28.4±0.7	27.8±0.7	27.6±1.6	27.8±1.1
	C18:1,11c	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C22:1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
PUFA	C18:2,9c,12c (LA)	1.5±0.04	1.6±0.1	1.6±0.1	1.5±0.1
	C18:2,9t,12t	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C18:2,9c,11t	1.05±0.1	0.8±0.06	1.1±0.3	1.2±0.5
	C18:2,9t,11t	0.8±0.1	0.7*	0.8*	<0.1
	C18:3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C20:2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C20:4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C18:3 (ALA)	1.1±0.02	1.1±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
	C18:4	0.4±0.0	0.5±0.01	0.5*	0.5*
	C20:3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C20:5 (EPA)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C22:5 (DPA)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C22:6 (DHA)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
ΣSFA (g/100g total fatty acids)		65.0±1.2	61.0±0.3	64.7±5.1	65.2±4.2
ΣMUFA (g/100g total fatty acids)		30.2±0.9	34.4±0.5	30.9±4.5	31.1±3.8
ΣPUFA (g/100g total fatty acids)		4.6±0.4	4.4±0.6	4.2±0.6	3.6±0.6

Capric acid: C10:0, Lauric acid: C12:0, Tridecanoic acid: C13:0, Myristic acid: C14:0, Palmitic acid: C16:0, Heptadecanoic acid: C17:0, Stearic acid: C18:0, Arachidic acid: C20:0, Behenic acid: C22:0, Lignoceric acid: C24:0, Palmitoleic acid: C16:1, cis-10-heptadecenoic acid: C17:1, Elaidic acid: C18:1,9t, Oleic acid: C18:1,9c, Cis-vacenic acid: C18:1,11c, Erucinic acid: C22:1, Linoleic acid: C18:2,9c,12c (n-6), Linolelaidic acid: C18:2,9t,12t (n-6), Rumenic acid: C18:2,9c,11t (n-6), Isolinoleic acid: C18:2,9t,11t (n-6), γlinolenic acid: C18:3 (n-6), Eicosadienoic acid: C20:2 (n-6), Arachidonic acid: C20:4 (n-6), alinolenic acid: C18:3 (n-3), Stearidonic acid: C18:4 (n-3), Eicosatrienoic acid: C20:3 (n-3), Eicosapentaenoic acid: C20:5 (n-3), Docosapentaenoic acid: C22:5 (n-3), Docosahex-aeoic acid: C22:6 (n-3), SFA: Saturated Fatty Acids, MUFA: Monounsaturated Fatty Acids, PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids, LOQ: 0.1% of total fatty acids, *individual value, WG: Wagashi Gassirè, WGC: cooked Wagashi Gassirè, WGV: vacuum cooked Wagashi Gassirè, nd: not determined, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P<0.05$) between WG, WGV and WGC, n: number of analysed samples, sd: standard deviation

All the essential minerals tested were detected in all milk and WG samples, except for molybdenum in WG samples (Table 3). The main minerals were calcium (9527 ± 398 and 13018 ± 384 mg/kg dw in milk and WG, respectively), potassium (1098 ± 216 and 2906 ± 52 mg/kg dw in milk and WG, respectively), and phosphorus (7575 ± 220 and 8478 ± 502 mg/kg dw in milk and WG, respectively) (Table 3).

Table 3: Essential minerals content (mean \pm sd) of cow milk and Wagashi Gassirè cheese

Essential minerals (mg/kg dw)	Milk (n=3)	WG (n=3)	WGC (n=3)	WGV (n=3)
Sodium (Na)	2428 \pm 153	604 \pm 40	641 \pm 56	640 \pm 69
Magnesium (Mg)	902 \pm 3	714 \pm 33	702 \pm 63	703 \pm 92
Phosphorus (P)	7575 \pm 220	8478 \pm 502	8553 \pm 324	8515 \pm 558
Potassium (K)	10980 \pm 216	2906 \pm 52	2976 \pm 205	3081 \pm 238
Calcium (Ca)	9527 \pm 398	13018 \pm 384	12986 \pm 354	12922 \pm 834
Manganese (Mn)	0.2 \pm 0.0	0.7 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
Iron (Fe)	2.1 \pm 0.1	4.0 \pm 0.5	3.8 \pm 0.4	6.2 \pm 2.9
Copper (Cu)	0.3*	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0
Zinc (Zn)	36.6 \pm 2.7	58.7 \pm 2.6	58.6 \pm 0.6	58.3 \pm 4.7
Selenium (Se)	0.1 \pm 0.02	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0
Molybdenum (Mo)	0.08 \pm 0.01*	< LOQ	< LOQ	< LOQ

*dw: dry weight, *individual value, LOQ: see Table S1, WG: Wagashi Gassirè, WGC: cooked Wagashi Gassirè, WGV: vacuum cooked Wagashi Gassirè, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P<0.05$) between WG, WGV and WGC, n: number of analysed samples, sd: standard deviation*

Metallic trace elements (MTE) including aluminium, vanadium, chromium, cobalt, nickel, rubidium, strontium, barium, and uranium were found in milk and WG in concentrations generally very low, below 1 mg/kg dw, except for rubidium (68 ± 7 mg/kg dw) and strontium (3 ± 0 mg/kg dw) in milk samples and aluminium, rubidium, and strontium in WG samples (81 ± 131 , 17 ± 1 , and 4 ± 0 mg/kg dw, respectively) (Table 4). Aluminium, barium, and uranium were not detected in milk samples. Among the ten biogenic amines subjected to the analysis, only tryptamine (7 ± 0 mg/kg dw) and serotonin (5 ± 0 mg/kg dw) were detected in WG samples (Table 4). Ammonia was found in all milk samples (71 ± 49 mg/kg dw) as well as in all WG samples (25 ± 10 mg/kg dw). Aflatoxin M1 was only detected in milk samples in low amounts close to the LOQ (0.03 μ g/kg dw) (Table 4). Traces of dioxins, close to the LOQ level (0.9 pg BEQ/g fat), were found in the fat of all analysed milk samples (Table 4).

Table 4: Chemical hazards content (LB mean±sd) of cow milk and Wagashi Gassirè cheese

	Chemical hazards	Milk (n=3)	WG (n=3)	WGC (n=3)	WGV (n=3)
Metallic trace elements (mg/kg dw)	Lithium (Li)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Beryllium (Be)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Aluminium (Al)	< LOQ	81±131	< LOQ	< LOQ
	Vanadium (V)	0.08±0.00	0.09±0.01	0.09±0.01	0.10±0.02
	Chromium (Cr)	0.071±0.001	0.006±0.005	0.026±0.023	0.005±0.004
	Cobalt (Co)	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
	Nickel (Ni)	0.04±0.01	0.01±0.00 ^b	0.03±0.00 ^a	0.01±0.00 ^{ab}
	Arsenic (As)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Rubidium (Rb)	68.6±7.1	17.3±1.05	18.2±0.4	18.1±0.6
	Strontium (Sr)	3.1±0.1	4.4±0.2	4.5±0.3	4.4±0.2
	Silver (Ag)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Cadmium (Cd)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Tin (Sn)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Antimony (Sb)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Barium (Ba)	< LOQ	1.6±0.1	1.07±0.9	1.01±0.8
	Thallium (Tl)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Lead (Pb)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Bismuth (Bi)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Uranium (U)	< LOQ	0.0007±0.0012	0.0003±0.0005	< LOQ
Biogenic amines (mg/kg dw)	Methylamine	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4
	Tryptamine	< 0.4	7.5±0.4	5.9±5.3	5.7±5.0
	2-phenylethylamine	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4
	Putrescine	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4
	Cadaverine	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4
	Histamine	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4
	Serotonin	< 0.4	5.3±0.2	1.6±2.8	3.3±3.1
	Tyramine	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4
	Spermidine	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4
	Spermine	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4
	Ammonia	71.5±49.3	25.5±10.2 ^b	61.2±19.6 ^{ab}	71.3±23.8 ^a
Aflatoxin M1 (µg/kg d.w)	0.045±0.007	nd	nd	nd	
Dioxins (pg BEQ/g fat)	1.3±0.4	nd	nd	nd	

BEQ: bioanalytical equivalent, LB: Lower bound, sd: standard deviation, LOQ (metallic trace elements): see Table S1, LOQ (dioxins): 0.9 pg BEQ/g fat, LOQ (aflatoxin M1): 0.03 µg/kg dw, LOQ (biogenic amines): 0.4 mg/kg dw, *individual value, dw: dry weight, nd: not determined, n: number of analysed samples, dw: dry weight, *individual value, WG: Wagashi Gassirè, WGC: cooked Wagashi Gassirè, WGV: vacuum cooked Wagashi Gassirè, different superscripts in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$) between WG, WGV and WGC

3.2. Physicochemical characteristics, nutritional composition, and chemical hazards content of cooked and vacuum-cooked Wagashi Gassirè preserved at different temperatures

Before storage, the produced WG samples of the present study were divided into two batches for two treatments: steam cooking (WGC) and vacuum steam cooking (WGV). When comparing WG according to these treatments (Table 1 to 4), it was observed that the physicochemical and nutritional properties of WG, WGC, and WGV samples, as well as their chemical hazard content, were similar ($p \geq 0.05$) except for dry matter, nickel, and ammonia contents. The dry matter content of WGV samples (41.7 ± 1.2 %) was lower ($p < 0.05$) than that of WGC samples (45.4 ± 0.6 %) and WG (46.9 ± 1.2 %) (Table 1). Nickel and ammonia contents of WGC and WGV samples were not significantly ($p \geq 0.05$) different (Table 4). However, the nickel content of WGC samples (0.03 ± 0.009 mg/kg dw) was higher ($p < 0.05$) than that of WG samples (0.01 ± 0.008 mg/kg dw) and the ammonia content of WGV samples (71 ± 23 mg/kg dw) was higher ($p < 0.05$) than that of WG samples (25 ± 10 mg/kg dw) (Table 4).

After steam cooking and vacuum steam cooking, the resulting WG (WGC and WGV) were stored at 5 °C and 28-30 °C for nine days leading to four types of cheese (WGVA, WGVF, WGCA, and WGCF) and two controls (WGTA and WGTF). The means of the physicochemical parameters (pH, water activity, dry matter, fat, and protein content) of these cheeses during storage are given in Table 5. It was observed that dry matter, crude protein, and fat contents were similar ($p \geq 0.05$) from day to day for all samples including the control samples except in the case of dry matter for WGCF and WGTF samples. For these two types of samples, a decrease in dry matter content was observed, from 45.4 % to 39.7 % for WGCF and from 46.9 % to 42.4 % for WGTF.

Table 5: Physicochemical parameters and proximal composition (mean±sd) of Wagashi Gassirè cheese during storage

Treatments	Storage days	pH	Aw	Dry matter (%)	Fat (g/100 g dw)	Protein (g/100 g dw)
WGCA (n/day=3)	0	6.5±0.0 ^a	0.997±0.002 ^a	45.4±0.6	48.8±5.2	37.5±0.9
	3	6.4±0.0 ^a	0.995±0.001 ^a	46.0±2.5	53.2±3.9	37.7±0.5
	6	6.0±0.1 ^b	0.994±0.002 ^a	44.9±2.7	50.4±3.0	37.1±1.0
	9	6.0±0.2 ^b	0.988±0.004 ^b	44.7±4.6	53.3±4.9	37.2±0.8
WGVA (n/day=3)	0	6.5±0.0 ^a	0.998±0.001 ^a	41.7±1.2	50.3±2.7	37.2±0.8
	3	6.5±0.0 ^a	0.996±0.000 ^{ab}	46.3±2.8	48.8±4.6	37.8±0.9
	6	6.3±0.1 ^{ab}	0.996±0.002 ^{ab}	43.2±3.3	49.7±5.5	37.4±0.7
	9	6.2±0.2 ^b	0.992±0.004 ^b	45.4±4.1	49.4±4.6	37.2±1.0
WGTA (n/day=3)	0	6.5±0.0 ^a	0.996±0.000	46.9±1.2	49.1±3.4	37.5±1.2
	3	5.5±0.2 ^b	0.993±0.001	44.0±2.9	53.5±3.1	38.7±1.6
	6	5.4±0.2 ^b	0.995±0.000	45.0±0.8	50.5±5.6	38.8±1.7
	9	5.3±0.1 ^b	0.994±0.002	44.3±5.8	48.7±6.1	38.7±6.1
WGCF (n/day=3)	0	6.5±0.0	0.997±0.002	45.4±0.6 ^a	48.8±5.2	37.5±0.9
	3	6.5±0.0	0.996±0.001	45.7±1.4 ^a	49.3±4.1	37.7±1.0
	6	6.6±0.0	0.997±0.001	39.7±3.5 ^b	48.2±2.2	36.8±1.3
	9	6.6±0.0	0.996±0.001	43.1±4.1 ^{ab}	46.0±5.2	37.4±0.9
WGVF (n/day=3)	0	6.5±0.0	0.998±0.001 ^a	41.7±1.2	50.3±2.7	37.2±0.8
	3	6.5±0.0	0.997±0.000 ^{ab}	42.5±0.6	50.7±3.4	37.4±1.1
	6	6.5±0.0	0.998±0.001 ^{ab}	43.1±1.9	49.0±5.7	37.5±1.2
	9	6.5±0.0	0.996±0.001 ^b	42.7±0.5	43.0±3.9	37.6±0.8
WGTF (n/day=3)	0	6.5±0.0 ^{ab}	0.996±0.000	46.9±1.2 ^a	49.1±3.4	37.5±1.2
	3	6.5±0.0 ^{ab}	0.997±0.001	43.0±2.7 ^b	50.9±3.9	37.4±1.0
	6	6.5±0.0 ^b	0.997±0.001	45.2±1.5 ^{ab}	49.3±2.4	37.8±1.4
	9	6.6±0.0 ^a	0.996±0.001	42.4±0.8 ^b	48.5±2.0	37.3±1.0

WGCA: cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGVA: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGTA: control Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGCF: cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGVF: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGTF: control Wagashi Gassirè stored at 5°C, sd: standard deviation, n/day: number of analysed samples per storage day, different superscripts in the same column indicate significant differences ($P<0.05$) between storage day per treatment, dw: dry weight

The pH and Aw of the WG samples preserved at 28-30 °C (WGVA and WGCA) significantly ($p < 0.05$) decreased at the end of the storage period. These decreases were more important for WGCA (6.5 – 6 for pH and 0.997 – 0.988 for Aw) than WGVA (6.5 – 6.2 for pH and 0.998 – 0.992 for Aw) samples. Moreover, the pH of the control samples decreased from 6.5 to 5.3 at the end of the storage period. pH was significantly different ($p < 0.05$) between day 3 and day 6 for WGVA (6.5 ± 0.0 vs 6.3 ± 0.1) and WGCA (6.4 ± 0.0 vs 6.0 ± 0.1) samples and between day zero and day 3 for control samples (WGTA 6.5 ± 0.0 vs 5.5 ± 0.2). Aw were significantly different ($p < 0.05$) between day six and day nine for WGCA (0.994 ± 0.002 vs 0.988 ± 0.004) and WGVA (0.996 ± 0.002 vs 0.992 ± 0.004) samples. For WG samples preserved at 5 °C, an average pH of 6.5 was observed during the storage for all treatments including the controls. Similar Aw was also obtained for all treatments including controls during the storage except for WGVF samples between day 6 and day 9. Indeed, Aw of WGVF at day 6 (0.998 ± 0.001) was significantly higher ($p < 0.05$) than that of day 9 (0.996 ± 0.001). At the end of the storage period, Aw of the WG samples preserved at 28-30 °C was below that of WG samples preserved at 5 °C.

The trend of the seventeen detected fatty acids during the storage period among the twenty-nine fatty acids tested in this study is presented in Table 6. It was observed that fatty acids contents were similar ($p \geq 0.05$) from day to day for all samples (WGVA, WGVF, WGCA, WGCF, WGTA, and WGTF) except for the control samples (WGTA and WGTF). For these two types of samples, the amount of SFA increased and MUFA decreased significantly ($p < 0.05$) during the storage, from 61 % to 68 % of total fatty acids for SFA and from 34 % to 28 % of total fatty acids for MUFA. The amount of PUFA remained constant (3.2-4.4 % of total fatty acids). This trend was observed for the individual fatty acids. As SFA, the amount of capric, lauric, myristic, and palmitoleic acids in the control samples increased significantly ($p < 0.05$) during storage and the amount of alpha-linoleic acid remained constant as it is a PUFA. As for fatty acids, essential minerals contents were similar ($p \geq 0.05$) from day to day for all samples (WGVA, WGVF, WGCA, WGCF, WGTA and WGTF) except for the control samples stored at 5 °C (WGTF) (Table 7). For these control samples, minor changes were observed for calcium, iron, and selenium.

Table 6: Fatty acids composition of Wagashi Gassirè cheese during preservation (mean±sd g/100 g total fatty acids)

Treatments	Storage days	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C24:0	C16:1	C18:1,9t	C18:1,9c
WGCA (n/day=3)	0	1.6±0.6	1.7±0.6	8.6±0.5	30.0±1.4	1.1±0.1	21.4±2.3	< 0.1	< 0.1	1.7±0.2	4.7*	27.6±1.6
	3	1.5±0.7	1.7±0.5	8.8±0.6	30.2±1.5	1.1±0.1	21.8±1.7	0.3*	< 0.1	1.7±0.2	4.2*	27.9±1.3
	6	1.8±0.3	1.9±0.3	8.9±0.7	30.7±0.5	1.0±0.1	22.4±0.7	< 0.1	< 0.1	1.6±0.1	< 0.1	26.8±0.9
	9	1.9±0.2	2.4±0.7	8.8±0.3	31.1±1.1	1.1±0.1	21.3±0.5	< 0.1	< 0.1	1.8±0.2	< 0.1	27.1±1.3
WGVA (n/day=3)	0	1.8±0.5	1.6±0.7	8.6±0.4	30.4±1.1	1.1±0.1	21.5±2.2	< 0.1	< 0.1	1.7±0.2	4.5*	27.8±1.1
	3	2.0±0.1	1.8±0.5	8.6±0.7	30.3±0.4	1.1±0.1	21.5±2.3	0.3*	< 0.1	1.7±0.1	4.9*	27.3±1.1
	6	1.8±0.4	1.9±0.1	9.0±0.6	31.3±0.2	1.0±0.1	22.6±0.3	< 0.1	< 0.1	1.6±0.1	< 0.1	26.6±0.3
WGTA (n/day=3)	9	1.6±0.1	2.3±0.9	8.8±0.5	31.8±1.7	1.0±0.2	21.8±0.9	< 0.1	1.4*	1.6±0.1	< 0.1	26.6±1.4
	0	1.0±0.0 ^b	1.0±0.0 ^b	8.2±0.2 ^b	28.9±1.2 ^b	1.2±0.0	20.4±1.3	0.3*	< 0.1	1.8±0.1	4.8±0.4	27.8±0.7
	3	1.5±0.6 ^{ab}	1.6±0.6 ^{ab}	8.6±0.5 ^{ab}	30.2±0.8 ^{ab}	1.1±0.1	21.6±2.0	< 0.1	< 0.1	1.7±0.2	4.8*	27.8±0.9
WGCF (n/day=3)	6	1.6±0.2 ^{ab}	2.0±0.1 ^a	9.1±0.5 ^a	31.7±0.3 ^a	1.0±0.1	22.8±0.9	< 0.1	< 0.1	1.7±0.2	< 0.1	27.2±0.8
	9	1.8±0.3 ^a	2.4±0.6 ^a	9.0±0.3 ^{ab}	31.3±1.2 ^a	1.1±0.1	21.6±0.8	< 0.1	< 0.1	1.7±0.1	< 0.1	26.8±1.3
	0	1.6±0.6	1.7±0.6	8.6±0.5	30.0±1.4	1.1±0.1	21.4±2.3	< 0.1	< 0.1	1.7±0.2	4.7*	27.6±1.6
WGVF (n/day=3)	3	1.6±0.6	1.6±0.6	8.6±0.6	30.2±0.6	1.1±0.1	21.6±2.2	0.4*	< 0.1	1.7±0.1	4.6*	27.5±1.1
	6	1.8±0.2	2.2±0.7	9.2±0.3	30.9±0.9	1.0±0.1	22.4±0.4	< 0.1	< 0.1	1.6±0.1	< 0.1	27.1±0.8
	9	1.7±0.2	2.3±0.5	8.9±0.1	31.3±1.1	1.1±0.1	21.7±1.2	< 0.1	< 0.1	1.7±0.1	< 0.1	27.3±0.9
WGTF (n/day=3)	0	1.8±0.5	1.6±0.7	8.6±0.4	30.4±1.1	1.1±0.1	21.5±2.2	< 0.1	< 0.1	1.7±0.2	4.5*	27.8±1.1
	3	1.8±0.4	1.6±0.5	8.7±0.4	29.9±1.6	1.1±0.1	22.0±2.0	0.4*	< 0.1	1.7±0.2	4.6*	28.0±1.3
	6	1.7±0.4	2.3±0.7	9.0±0.2	30.5±0.0	1.0±0.1	22.1±0.6	< 0.1	< 0.1	1.7±0.2	< 0.1	27.8±0.4
WGTF (n/day=3)	9	1.7±0.3	2.4±0.7	8.9±0.0	31.4±0.9	1.1±0.1	21.5±1.0	< 0.1	< 0.1	1.7±0.1	< 0.1	27.3±1.1
	0	1.0±0.0 ^b	1.0±0.0 ^b	8.2±0.2 ^b	28.9±1.2 ^b	1.2±0.0	20.4±1.3	0.3*	< 0.1	1.8±0.1	4.8±0.4	27.8±0.7
	3	2.0 ^{*a}	1.6±0.6 ^{ab}	8.6±0.7 ^{ab}	30.9±0.6 ^a	1.1±0.0	21.8±2.7	0.4*	< 0.1	1.8±0.2	5.0*	27.7±1.0
WGTF (n/day=3)	6	1.5±0.3 ^{ab}	2.2±0.7 ^a	9.1±0.2 ^a	30.3±0.0 ^{ab}	1.0±0.1	22.6±1.0	< 0.1	< 0.1	1.6±0.1	< 0.1	27.5±0.6
	9	1.7±0.2 ^a	2.4±0.7 ^a	8.9±0.3 ^{ab}	31.5±1.0 ^a	1.1±0.1	21.6±1.0	< 0.1	< 0.1	1.7±0.1	< 0.1	27.4±1.2

C10:0: capric acid, C12:0: lauric acid, C14:0: myristic acid, C16:0: palmitic acid, C17:0: heptadecanoic acid, C18:0: stearic acid, C20:0: behenic acid, C24:0: lignoceric acid, C16:1: palmitoleic acid, C18:1,9t: elaidic acid, C18:1,9c: oleic acid, WGCA: cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGVA: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGTA: control Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGCF: cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGVF: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGTF: control Wagashi Gassirè stored at 5°C, n/day: number of analysed samples per storage day, different superscripts in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$) between storage day per treatment, sd: standard deviation, *individual value, LOQ: 0.1% of total fatty acids

Table 6 (continuous): Fatty acids composition of Wagashi Gassirè cheese during preservation (mean±sd g/100 g total fatty acids)

Treatments	Storage days	C22:1	C18:2,9c,12c	C18:2,9c,11t	C18:2,9t,11t	C18:3	C18:4	SFA	MUFA	PUFA
WGCA (n/day=3)	0	< 0.1	1.6±0.1	1.1±0.3	0.8*	1.0±0.0	0.5*	64.7±5.1	30.9±4.5	4.2±0.6
	3	< 0.1	1.5±0.0	0.8±0.1	< 0.1	1.0±0.0	0.4*	65.4±4.1	31.1±3.8	3.4±0.6
	6	1.7*	1.5±0.0	1.3±0.6	< 0.1	1.0±0.0	0.5*	66.9±0.7	29.0±0.1	4.0±0.5
	9	< 0.1	1.6±0.3	1.1±0.1	< 0.1	1.0±0.1	0.5*	66.9±1.0	28.9±1.3	4.0±0.2
WGVA (n/day=3)	0	1.5±0.1	1.5±0.1	1.2±0.5	< 0.1	1.0±0.0	0.5*	65.2±4.2	31.1±3.8	3.6±0.6
	3	1.1*	1.5±0.0	0.8±0.0	0.8*	1.0±0.0	0.5±0.0	65.0±4.6	31.1±3.6	3.8±1.1
	6	1.7*	1.5±0.0	1.5*	< 0.1	1.0±0.0	0.5*	67.9±0.6	28.8±0.5	3.2±0.7
	9	< 0.1	1.6±0.4	1.4±0.0	< 0.1	0.9±0.0	< 0.1	68.0±1.7	28.3±1.6	3.6±1.1
WGTA (n/day=3)	0	< 0.1	1.6±0.1	0.8±0.0	0.7*	1.1±0.0 ^a	0.5±0.0	61.0±0.3 ^b	34.4±0.5 ^a	4.4±0.6 ^a
	3	< 0.1	1.5±0.0	1.0±0.2	< 0.1	1.0±0.0 ^{ab}	0.5*	64.9±3.9 ^{ab}	31.1±3.8 ^{ab}	3.8±0.1 ^a
	6	< 0.1	1.5±0.1	< 0.1	< 0.1	0.9±0.0 ^b	< 0.1	68.4±1.0 ^a	28.9±0.9 ^b	2.5±0.1 ^b
	9	< 0.1	1.5±0.0	1.1±0.3	< 0.1	1.0±0.0 ^{ab}	0.5*	67.3±1.1 ^a	28.6±1.2 ^b	4.0±0.4 ^a
WGCF (n/day=3)	0	< 0.1	1.6±0.1	1.1±0.3	0.8*	1.0±0.0	0.5*	64.7±5.1	30.9±4.5	4.2±0.6
	3	1.6*	1.5±0.0	1.1±0.2	0.7*	1.0±0.0	0.4±0.0	64.6±4.2	31.4±3.3	3.9±1.1
	6	< 0.1	1.5±0.2	1.3±0.7	< 0.1	0.9±0.1	< 0.1	67.7±1.7	28.8±0.8	3.3±1.2
	9	< 0.1	1.5±0.0	1.3±0.3	< 0.1	1.0±0.0	< 0.1	67.4±1.6	29.1±1.0	3.4±0.7
WGVF (n/day=3)	0	< 0.1	1.5±0.1	1.2±0.5	< 0.1	1.0±0.0	0.5*	65.2±4.2	31.1±3.8	3.6±0.6
	3	< 0.1	1.5±0.0	0.9±0.1	0.9*	1.0±0.0	0.5*	64.8±5.3	31.3±4.2	3.7±1.2
	6	< 0.1	1.5±0.0	1.3±0.7	< 0.1	1.0±0.0	< 0.1	66.8±1.0	29.5±0.6	3.5±0.9
	9	< 0.1	1.6±0.1	1.2±0.3	< 0.1	1.0±0.0	0.5*	67.2±1.5	29.1±1.2	3.6±0.7
WGTF (n/day=3)	0	< 0.1	1.6±0.1	0.8±0.0	0.7*	1.1±0.0 ^a	0.5±0.0	61.0±0.3 ^b	34.4±0.5 ^a	4.4±0.6
	3	< 0.1	1.6±0.1	0.8±0.0	< 0.1	1.0±0.0 ^{ab}	0.5±0.0	65.0±4.4 ^{ab}	31.2±3.9 ^{ab}	3.6±0.8
	6	< 0.1	1.5±0.1	1.2±0.3	< 0.1	1.0±0.0 ^b	< 0.1	66.9±0.5 ^a	29.2±0.7 ^b	3.7±0.3
	9	< 0.1	1.5±0.1	1.0±0.1	< 0.1	1.0±0.0 ^{ab}	< 0.1	67.4±0.7 ^a	29.1±1.3 ^b	3.3±0.7

C22:1: erucic acid, C18:2,9c,12c : linoleic acid, C18:2,9c,11t: rumenic acid, C18:2,9t,11t: isolinoleic acid, C18:3: γlinolenic acid, C18:4: stearidonic acid, SFA: Saturated Fatty Acids, MUFA: Monounsaturated Fatty Acids, PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids, WGCA: cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGVA: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGTA: control Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGCF: cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGVF: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGTF: control Wagashi Gassirè stored at 5°C, n/day: number of analysed samples per storage day, different superscripts in the same column indicate significant differences ($P<0.05$) between storage day per treatment, sd: standard deviation, *individual value, LOQ: 0.1% of total fatty acids

Table 7: Essential minerals composition of Wagashi Gassirè cheese during preservation (mean±sd mg/kg dw)

Treatments	Storage days	Na	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Mo
WGCA (n/day=3)	0	641±56	702±63	8553±324	2976±205	12986±354	0.8±0.1	3.8±0.4	0.5±0.0	58±0	0.2±0.0	< LOQ
	3	609±72	695±47	8558±262	2902±224	12926±238	0.7±0.1	3.7±0.8	0.5±0.0	58±1	0.2±0.0	0.1*
	6	611±46	701±84	8694±144	3068±244	13650±814	0.7±0.1	3.8±0.7	0.5±0.0	61±3	0.2±0.0	< LOQ
	9	615±50	684±82	8640±321	2995±345	12722±519	0.8±0.1	4.8±1.6	0.5±0.0	59±3	0.2±0.0	< LOQ
WGVA (n/day=3)	0	640±69	703±92	851±558	3081±238 ^{ab}	12922±834	0.7±0.1	6.2±2.9	0.5±0.0	58±4	0.2±0.0	< LOQ
	3	572±42	697±59	8723±419	2828±111 ^{ab}	13292±585	0.7±0.1	3.8±0.3	0.9±0.4	59±2	0.2±0.0	< LOQ
	6	639±102	705±94	8590±575	3123±290 ^a	13222±1031	0.7±0.1	4.3±1.2	0.5±0.0	59±5	0.2±0.0	< LOQ
	9	550±21	678±77	8680±308	2694±230 ^b	13113±146	0.7±0.1	3.8±0.8	0.8±0.5	60±1	0.2±0.0	< LOQ
WGTA (n/day=3)	0	604±40	714±33	8478±502	2906±52	13018±384	0.7±0.1	4.0±0.5	0.5±0.0	58±2	0.3±0.0	< LOQ
	3	630±52	722±90	8804±472	2976±365	13308±1119	0.7±0.1	3.9±0.9	0.5±0.0	59±5	0.3±0.0	< LOQ
	6	589±30	700±118	8587±696	2927±91	13411±961	0.8±0.2	5.5±2.2	1.1±0.6	61±4	0.2±0.0	< LOQ
	9	633±119	695±81	8786±384	2957±600	12999±253	0.7±0.1	3.6±0.6	0.5±0.0	60±5	0.2±0.0	< LOQ
WGCF (n/day=3)	0	641±56	702±63	8553±324	2976±205	12986±354	0.8±0.1	3.8±0.4	0.5±0.0	58±0	0.2±0.0	< LOQ
	3	589±49	699±64	8576±235	2833±114	12955±110	0.7±0.1	3.8±0.4	0.7±0.3	58±1	0.2±0.0	< LOQ
	6	702±116	705±40	8472±116	3473±701	13117±90	0.7±0.1	3.8±0.7	0.5±0.0	59±1	0.2±0.0	< LOQ
	9	625±47	689±35	8615±193	3069±189	13205±373	0.7±0.1	3.6±0.6	0.9±0.0	59±2	0.2±0.0	< LOQ
WGVF (n/day=3)	0	640±69	703±92	8515±558	3081±238	12922±834	0.7±0.1	6.2±2.9	0.5±0.0	58±4	0.2±0.0	< LOQ
	3	606±11	677±55	8409±121	3000±306	13049±669	0.8±0.1	5.3±2.2	0.5±0.0	59±3	0.3±0.0	< LOQ
	6	611±50	691±75	8499±314	2948±411	12877±502	0.8±0.1	3.8±0.8	0.5±0.0	58±3	0.2±0.0	< LOQ
	9	635±53	682±63	8591±233	3072±302	13130±708	0.7±0.1	4.0±0.8	0.5±0.0	59±3	0.2±0.0	< LOQ
WGTF (n/day=3)	0	604±40	715±33	8478±502	2906±52	13018±384 ^{ab}	0.7±0.1	4.0±0.5 ^{ab}	0.5±0.0	58±2	0.3±0.0 ^a	< LOQ
	3	627±40	695±60	8513±120	3217±165	13795±844 ^a	0.7±0.1	5.0±0.7 ^a	0.6±0.1	62±4	0.2±0.0 ^{ab}	< LOQ
	6	571±41	661±74	8358±87	2765±302	12479±303 ^b	0.7±0.1	3.4±0.7 ^b	0.4±0.0	57±2	0.2±0.0 ^{ab}	< LOQ
	9	619±56	676±68	8282±349	2999±357	12839±514 ^{ab}	0.7±0.1	3.4±0.5 ^b	0.4±0.0	58±2	0.2±0.0 ^b	< LOQ

WGCA: cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGVA: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGTA: control Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGCF: cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGVF: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGTF: control Wagashi Gassirè stored at 5°C, n/day: number of analysed samples per storage day, different superscripts in the same column indicate significant differences ($P<0.05$) between storage day per treatment, sd: standard deviation, *individual value, dw: dry weight, LOQ: see Table S1.

The analysis of the detected chemical hazards i.e. trace elements and biogenic amines during WG storage are presented in Tables 8 and 9 respectively. Trace elements showed minor changes during the storage. However, the trend in biogenic amine contents was associated with temperature and storage period. Indeed, ammonia and tryptamine contents increased significantly ($p < 0.05$) during the storage and this increase was more important for WG samples stored at 28-30 °C than those stored at 5 °C. Moreover, six biogenic amines were detected at least one step of the preservation process at 5 °C contrary to ten at 28-30 °C. AFM1 was not detected during the storage period in WG samples for all treatments.

Table 8: Trace metallic elements composition of Wagashi Gassirè cheese during preservation (LB mean±sd mg/kg dw)

Treatments	Storage days	Al	V	Sb	Cr	Co	Ni	Rb	Sr	Tl	Ba	U
WGCA (n/day=3)	0	< LOQ	0.095±0.014	< LOQ	0.026±0.023	0.01±0.00	0.03±0.00	18±0	4.5±0.3	< LOQ	1.0±0.9	0.0003±0.0005
	3	< LOQ	0.094±0.010	1.5±2.1	0.015±0.010	0.02±0.00	0.02±0.01	17±0	4.5±0.3	0.09±0.15	0.5±0.9	< LOQ
	6	< LOQ	0.087±0.006	< LOQ	0.051±0.045	0.02±0.00	0.03±0.00	17±0	4.7±0.3	< LOQ	1.5±0.1	0.0003±0.0006
	9	< LOQ	0.093±0.018	< LOQ	0.037±0.040	0.01±0.00	0.04±0.02	17±2	4.5±0.2	< LOQ	0.5±0.9	< LOQ
WGVA (n/day=3)	0	< LOQ	0.107±0.022	< LOQ	0.005±0.004	0.01±0.00	0.01±0.00	18±0	4.4±0.2	< LOQ	1.0±0.8	< LOQ
	3	< LOQ	0.090±0.009	< LOQ	0.014±0.025	0.02±0.00	0.01±0.01	16±0	4.5±0.4	< LOQ	1.5±0.1	< LOQ
	6	< LOQ	0.090±0.011	< LOQ	0.120±0.149	0.02±0.00	0.03±0.02	18±2	4.5±0.1	< LOQ	1.0±0.8	< LOQ
WGTA (n/day=3)	9	< LOQ	0.084±0.013	< LOQ	0.025±0.018	0.02±0.00	0.02±0.01	15±1	4.6±0.3	< LOQ	1.5±0.1	< LOQ
	0	< LOQ	0.097±0.014	< LOQ	0.006±0.005	0.02±0.00 ^b	0.01±0.00	17±1	4.4±0.2	< LOQ	1.6±0.1	< LOQ
	3	< LOQ	0.095±0.015	< LOQ	0.010±0.017	0.01±0.00 ^b	0.02±0.01	18±2	4.5±0.1	< LOQ	1.0±0.8	< LOQ
WGCF (n/day=3)	6	< LOQ	0.091±0.000	< LOQ	0.025±0.021	0.02±0.00 ^a	0.03±0.02	16±0	4.7±0.5	< LOQ	1.1±1.0	< LOQ
	9	< LOQ	0.095±0.014	< LOQ	0.038±0.035	0.01±0.00 ^b	0.03±0.00	17±2	4.6±0.2	< LOQ	1.0±0.9	< LOQ
	0	< LOQ	0.095±0.014	< LOQ	0.026±0.023	0.01±0.00	0.03±0.00	18±0	4.5±0.3	< LOQ	1.0±0.9	0.0003±0.0005
WGVF (n/day=3)	3	< LOQ	0.088±0.014	< LOQ	0.032±0.018	0.02±0.00	0.01±0.00	16±0	4.5±0.2	< LOQ	1.4±0.1	< LOQ
	6	< LOQ	0.098±0.007	< LOQ	0.026±0.022	0.01±0.00	0.02±0.00	20±4	4.5±0.2	< LOQ	1.0±0.9	< LOQ
	9	< LOQ	0.092±0.011	< LOQ	0.026±0.033	0.02±0.00	0.03±0.01	17±1	4.6±0.3	< LOQ	0.5±0.9	< LOQ
WGTF (n/day=3)	0	< LOQ	0.107±0.022 ^a	< LOQ	0.005±0.004 ^b	0.01±0.00	0.01±0.00	18±0	4.4±0.2	< LOQ	1.0±0.8	< LOQ
	3	< LOQ	0.094±0.017 ^{ab}	< LOQ	0.182±0.110 ^a	0.02±0.00	0.03±0.01	17±1	4.5±0.1	< LOQ	1.5±0.1	< LOQ
	6	< LOQ	0.095±0.004 ^{ab}	< LOQ	0.050±0.056 ^b	0.02±0.00	0.04±0.01	17±1	4.5±0.1	< LOQ	0.5±0.9	< LOQ
WGTF (n/day=3)	9	< LOQ	0.070±0.002 ^b	< LOQ	0.043±0.022 ^b	0.02±0.01	0.04±0.02	17±0	4.5±0.1	< LOQ	1.4±0.0	0.0006±0.0011
	0	81±131	0.097±0.014	< LOQ	0.006±0.005 ^b	0.02±0.00	0.01±0.00	17±1	4.4±0.2	< LOQ	1.6±0.1	< LOQ
	3	163±274	0.085±0.005	0.8±0.8	0.067±0.041 ^a	0.07±0.06	0.03±0.02	17±1	4.8±0.4	< LOQ	1.6±0.1	0.0013±0.0009
WGTF (n/day=3)	6	< LOQ	0.063±0.055	< LOQ	0.035±0.024 ^{ab}	0.01±0.00	0.02±0.01	16±1	4.3±0.1	< LOQ	0.9±0.8	< LOQ
	9	< LOQ	0.090±0.015	< LOQ	0.018±0.019 ^{ab}	0.01±0.00	0.03±0.01	17±1	4.4±0.2	< LOQ	1.0±0.8	< LOQ

WGCA: cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGVA: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGTA: control Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGCF: cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGVF: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGTF: control Wagashi Gassirè stored at 5°C, n/day: number of analysed samples per storage day, different superscripts in the same column indicate significant differences ($P<0.05$) between storage day per treatment, sd: standard deviation, *individual value, LB: lower bound, dw: dry weight, LOQ: see Table S1.

Table 9: Biogenic amines composition of Wagashi Gassirè cheese during preservation (LB mean±sd mg/kg dw)

Treatments	Storage days	Ammonia	Methylamine	Cadaverine	Tryptamine	2-Phenylethylamine
	0	61±19 ^b	< 0.4	< 0.4	5.9±5.3 ^b	< 0.4
WGCA	3	186±72 ^b	< 0.4	< 0.4	5.1±4.5 ^b	< 0.4
(n/day=3)	6	774±88 ^{ab}	< 0.4	11±20	70±111 ^b	17±16
	9	1312±818 ^a	< 0.4	< 0.4	521±413 ^a	12±12
	0	71±23 ^b	< 0.4	< 0.4	5.7±5.0 ^{ab}	< 0.4
WGVA	3	93.26 ^b	< 0.4	< 0.4	2.5±4.4 ^b	< 0.4
(n/day=3)	6	212±131 ^b	2.8±4.9	< 0.4	2.4±4.2 ^b	3.2±2.9
	9	1004±795 ^a	< 0.4	< 0.4	182±189 ^a	< 0.4
	0	25±10 ^b	< 0.4	< 0.4	7.5±0.4	< 0.4
WGTA	3	295±61 ^{ab}	< 0.4	26±14	2.8±4.9	< 0.4
(n/day=3)	6	625±287 ^a	< 0.4	41±36	5.7±9.8	< 0.4
	9	680±402 ^a	< 0.4	44±22	2.8±5.0	2.9±2.5
	0	61±19	< 0.4	< 0.4	5.9±5.3	< 0.4
WGCF	3	66±25	< 0.4	< 0.4	6.8±6.5	< 0.4
(n/day=3)	6	82±18	< 0.4	< 0.4	7.3±6.7	< 0.4
	9	89±27	< 0.4	< 0.4	6.9±6.5	< 0.4
	0	71±23 ^{ab}	< 0.4	< 0.4	5.7±5.0	< 0.4
WGVF	3	50±24 ^b	< 0.4	< 0.4	9.4±9.9	< 0.4
(n/day=3)	6	85±3.6 ^{ab}	< 0.4	< 0.4	6.3±5.5	< 0.4
	9	96±15 ^a	< 0.4	< 0.4	5.7±9.9	1.3±2.2
	0	25±10 ^b	< 0.4	< 0.4	7.5±0.4	< 0.4
WGTF	3	27±26 ^b	< 0.4	< 0.4	2.8±4.9	< 0.4
(n/day=3)	6	36±9.4 ^{ab}	< 0.4	< 0.4	4.5±7.9	< 0.4
	9	64±18 ^a	< 0.4	< 0.4	4.7±8.1	< 0.4

WGCA: cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGVA: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGTA: control Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGCF: cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGVF: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGTF: control Wagashi Gassirè stored at 5°C, n/day: number of analysed samples per storage day, different superscripts in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$) between storage day per treatment, sd: standard deviation, LB: lower bound, dw: dry weight, LOQ: 0.4 mg/kg dw

Table 9 (continuous): Biogenic amines composition of Wagashi Gassirè cheese during preservation (LB mean±sd mg/kg dw)

Treatments	Storage days	Putrescine	Spermidine	Serotonin	Spermine	Tyramine
	0	< 0.4	< 0.4	1.6±2.8	< 0.4	< 0.4
WGCA	3	< 0.4	0.7±1.3	6.7±1.2	< 0.4	2.2±3.8
(n/day=3)	6	10±8	< 0.4	4.4±1.1	5.1±8.8	85±133
	9	17±1	< 0.4	27±43	< 0.4	124±111
	0	< 0.4	< 0.4	3.3±3.1	< 0.4	< 0.4
WGVA	3	< 0.4	< 0.4	3.0±2.8	< 0.4	< 0.4
(n/day=3)	6	< 0.4	< 0.4	1.7±3.0	< 0.4	10±11
	9	10±11	< 0.4	25±38	< 0.4	< 0.4
	0	< 0.4	< 0.4	5.3±0.2	< 0.4	< 0.4
WGTA	3	19±12	< 0.4	3.3±3.3	< 0.4	< 0.4
(n/day=3)	6	17±13	< 0.4	3.3±3.4	< 0.4	11±19
	9	33±18	< 0.4	1.3±2.2	< 0.4	19±27
	0	< 0.4	< 0.4	1.6±2.8	< 0.4	< 0.4
WGCF	3	< 0.4	< 0.4	3.8±3.3	< 0.4	< 0.4
(n/day=3)	6	< 0.4	< 0.4	3.1±2.9	< 0.4	< 0.4
	9	< 0.4	< 0.4	1.2±2.1	1.1±1.9	< 0.4
	0	< 0.4	< 0.4	3.3±3.1	< 0.4	< 0.4
WGVF	3	< 0.4	< 0.4	2.1±3.6	< 0.4	< 0.4
(n/day=3)	6	< 0.4	< 0.4	1.9±3.4	< 0.4	< 0.4
	9	< 0.4	< 0.4	2.7±2.4	< 0.4	< 0.4
	0	< 0.4	< 0.4	5.3±0.2	< 0.4	< 0.4
WGTF	3	< 0.4	< 0.4	40±67	< 0.4	< 0.4
(n/day=3)	6	< 0.4	< 0.4	1.1±2.0	< 0.4	< 0.4
	9	< 0.4	1.1±2.0	1.2±2.1	< 0.4	< 0.4

WGCA: cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGVA: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGTA: control Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGCF: cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGVF: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGTF: control Wagashi Gassirè stored at 5°C, n/day: number of analysed samples per storage day, different superscripts in the same column indicate significant differences ($P<0.05$) between storage day per treatment, sd: standard deviation, LB: lower bound, dw: dry weight, LOQ: 0.4 mg/kg dw

3.3. Sensorial characteristics of cooked and vacuum-cooked Wagashi Gassirè preserved at different temperatures

The sensory evaluation of the WG cheese during storage is shown in Table 10. The flavour, colour, texture, and overall acceptability score of all the WG cheese stored at 28-30 °C (WGCA and WGVA) decreased significantly ($p < 0.05$), whereas sensorial attributes score of the WG stored at 5 °C (WGCF and WGVF) remained similar from day to day for flavour and texture. Colour and overall acceptability of WGCF and WGVF showed minor changes during the storage. Notable was the rejection of WGCA cheese at the four-day (1.0 for acceptability).

Table 10: Sensorial characteristics of Wagashi Gassirè cheese during preservation (mean±sd)

Treatments	Storage days	Flavour	Colour	Texture	Acceptability
WGCA	0	4.9±0.1 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	4.9±0.1 ^a
	1	4.7±0.7 ^a	4.6±0.7 ^a	4.9±0.2 ^a	4.4±1.4 ^a
	2	3.7±1.4 ^b	3.7±1.4 ^b	3.5±1.3 ^b	2.7±1.8 ^b
	3	2.3±1.3 ^c	2.9±1.5 ^c	2.6±1.3 ^c	1.8±1.2 ^{cb}
	4	1.4±0.5 ^d	1.4±0.5 ^d	1.4±0.5 ^d	1.0±0.0 ^c
WGVA	0	4.9±0.1 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	4.9±0.1 ^a
	1	4.6±0.8 ^{ab}	4.6±1.2 ^{ab}	4.5±0.9 ^{ab}	4.4±1.2 ^{ab}
	2	4.0±1.2 ^b	3.9±1.3 ^b	4.2±1.0 ^{bc}	3.5±1.7 ^{bc}
	3	3.9±1.3 ^b	4.1±1.3 ^b	4.4±0.8 ^{abc}	3.6±1.6 ^{bc}
	4	4.4±0.8 ^{ab}	5.0±0.0 ^a	3.8±1.3 ^c	3.2±1.6 ^c
WGCF	0	4.9±0.1	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0	4.9±0.1 ^a
	1	4.6±0.5	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0	4.6±0.5 ^{ab}
	2	4.6±0.8	4.6±0.8 ^b	5.0±0.0	4.5±0.8 ^b
	3	4.8±0.3	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0	4.8±0.3 ^{ab}
	4	4.7±0.2	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0	4.8±0.3 ^{ab}
WGVF	0	4.9±0.1	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0	4.9±0.1 ^a
	1	4.6±0.5	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0	4.6±0.5 ^{ab}
	2	4.6±0.8	4.6±0.8 ^b	5.0±0.0	4.5±0.8 ^b
	3	4.8±0.3	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0	4.9±0.1 ^{ab}
	4	4.6±0.7	4.6±0.8 ^b	5.0±0.0	4.5±0.8 ^b

WGCA: cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGVA: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 28°C, WGCF: cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, WGVF: vacuum cooked Wagashi Gassirè stored at 5°C, n/day: number of analysed samples per storage day, different superscripts in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$) between storage day per treatment, sd: standard deviation

4. Discussion

4.1. Impact of the heating process on the physicochemical characteristics and nutritional composition of Wagashi Gassirè

The characteristics of milk and WG samples of the present study i.e. proteins and fat contents (Barłowska et al., 2011; Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2013; Périera, 2014; Dossou et al., 2016a; Djibril et al., 2019), fatty acids composition (Haug et al., 2007; Kalač et Samková, 2010; Samková et al., 2012), essential minerals content (Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2013; Pereira, 2014; de la Fuente et Juarez, 2015) were similar to the data reported by the available literature.

After packaging (vacuum packaging and simple packaging) and prior storage, WG samples of the present study were steam-cooked leading to WGC and WGV. The physicochemical and nutritional properties of WG, WGC, and WGV samples were similar. This means that steam cooking and vacuum steam cooking had no significant effect on the physicochemical and nutritional composition of the WG. According to the literature, cooking processes such as steaming, boiling, frying, stewing, roasting, baking, or grilling, produce numerous changes in the composition (vitamins, fatty acids, minerals, proteins), the digestibility of food products as well as in the bioavailability of food components (Barciela-Alonso and Bermejo-Barrera, 2015).

In general, heating at high temperatures causes mineral losses. Boiling produced the highest losses of minerals, followed by heating with steam, stewing, and frying due to the water solubility of minerals which increases with the temperature (Barciela-Alonso and Bermejo-Barrera, 2015). This was confirmed by the results obtained by Dossou et al (2024). Significant differences were found between WWG (white WG) and RWG (red WG) regarding essential minerals (sodium, magnesium, phosphorus, potassium, and calcium) contents. WWG was richer in minerals (essentials and metals) than RWG and minerals losses were more than 50% for calcium, potassium, magnesium, sodium, and rubidium, but less for phosphorus. RWG was obtained by cooking WWG in coloured water. The differences in mineral content were therefore linked to the colouring process. Minerals leached from WWG into coloured water during colouring process. Moreover, Tchobo et al (2014) tested the hot colouration using *Sorghum vulgare* panicle (15 g/l wet weight), salt (10 g/l wet weight) and potash (3 g/l wet weight). A decrease of fat content of 10 % dry weight was observed after the colouration and was explained by the fat extraction process during the hot colouration. In the present study, no significant differences were observed in the mineral content of the WG, WGC, and WGV samples. All the samples were packaged before steaming, which prevented the minerals from leaching out. Changes in mineral bioavailability are also produced during the cooking process. This could be due to changes in food composition during the cooking procedure, such as protein degradation, water or other soluble constituents losses, and the removal or inactivation of anti-nutrients like oxalic acid and phytic acid. For example, an important reduction in zinc bioavailability from cereals and pulses while, in general, an important increase in iron

bioavailability during the heating treatment were found by Hemalatha et al (2007) for all the food grains studied. The changes in the bioavailability of both minerals were linked to the nature of the interaction of the two minerals with food proteins during heat processing, and also to the variations in other constituents of the food matrix. The bioavailability of a compound depends on the physical properties of the food matrix. The bioavailability of minerals in WG food matrix should be studied in relation to the traditional heating processes as no data are available in this respect.

During food processing, food proteins may undergo a variety of chemical modifications (Hemalatha et al., 2007). Heating is the most common food processing operation and the one that has the greatest role in protein denaturation and the derivatisation chemistry of food proteins. At temperatures up to 100 °C, the protein denaturation translates into effects of interest, such as enzymatic inactivation of lipases, proteases, etc., improvement of digestibility or reduction of toxicity (Gomez et al., 2020; Meade et al., 2005). Moreover, if food processing involves high temperatures, protein crosslinks often result, producing substantial changes in the structure of proteins and, therefore, the functional and nutritional properties of the final product. Crosslinking has been shown to lower the digestibility of food because the crosslinked, aggregated protein is less accessible to digestive enzymes (Meade et al., 2005). In lipids, heat treatment produces fusion (Gomez et al., 2020). Heating processing which caused fat extraction, hence decreasing fat content is steaming, grilling, and microwaving (Gomez et al., 2020; Abdalla and Nusr, 2009). In the present study, no significant differences were observed in the proteins and fat content of the WG, WGC, and WGV samples. As explained in the case of minerals, all the samples were packaged before steaming, which prevented the fat extraction by the steam used. However, other changes may occur during steaming, as reported in the literature (Barciela-Alonso and Bermejo-Barrera, 2015; Meade et al., 2005). These modifications are not the subject of the present study but should be the subject of further research.

As demonstrated by the data of the present study, packaging the WG before the heat treatment should be recommended to the WG processors as this would preserve the WG nutrients by preventing the leaching phenomena observed by Dossou et al (2024).

4.2. Impact of cooking and storage temperature on the shelf life of Wagashi Gassirè

During storage of cheese, physicochemical changes (creaming of fat, gelation of protein solutions, syneresis of curds, and crystallization of minerals), chemical changes (non-enzymatic browning and oxidation of fat), and biochemical transformations such as growth of micro-organisms, enzymatic degradation (glycolysis, proteolysis, and lipolysis), ripening of cheese and fermentations occurs (Jalilzadeh et al., 2015; Mazou et al., 2012). These changes/transformations modify the composition of the product for better (enhancing the characteristics features of cheese, especially the texture, and flavour) and for worse (oxidation of fat, growth of moulds and pathogenic bacteria) (Tchobo et al., 2014). The consequences of these transformations are the limitation of the shelf life of cheese. To extend

the shelf life of the products, several methods have been developed including the use of thermal processing (steaming, boiling, frying, stewing, roasting, baking, or grilling), packaging (vacuum packaging, modified atmosphere packaging, active packaging, intelligent packaging, edible films, and coatings), high pressure processing, foods additives, and natural antioxidant ingredients (essential oils and spices, plants extracts) (Gomez et al., 2020). In the present study, the vacuum packaging combined with the steaming was tested using four types of cheese (WGVA, WGVF, WGCA, and WGCF) and two control (WGTA and WGTF) samples stored for nine days at 5 °C and 28-30 °C.

No significant differences were observed in the dry matter content, protein content, fat content, fatty acids composition, and essential minerals composition of the four types of cheese (WGVA, WGVF, WGCA, and WGCF) tested during the storage period in this study. This means that, regardless of the storage temperature, the conservation treatments (packaging and simple steaming/vacuum steaming) preserved the gross components of WG during storage. This showed the relative efficiency of this combined preservation method in comparison to the other methods reported by literature regarding WG preservation in Benin. Mazou et al (2012) tested the effect of temperature (-2, 6, and 25 °C) and salt (unsalted vs salted WG at 7 % wet weight) on the quality of WG during storage. After one week, unsalted WG stored at 25 °C was completely spoiled. Moreover, average loss of 20 % of water and 2 % wet weight of fat were observed for the other WG. The authors attributed the fat decrease to the lipolytic activity of microorganisms inherent in WG stored at 6 °C. However, this fat content decrease could also be due to the possible leakage of some fat into the brine solution as observed by Abdalla and Nusr (2009). Combined effects of drying with hot air (60 °C in oven for 4 hours) and vacuum packaging on the shelf life of WG (white and coloured) during storage (4-5 °C and 28-32 °C for 60 days) were tested by Dossou et al (2016b). These authors observed a decrease in dry matter, proteins, and fat contents of all WG samples stored at 28-32 °C due to proteolysis and lipolysis of WG proteins and fat related to the growth of spoilage microbiota. However, the dry matter, proteins, and fat contents of all WG samples stored at 4-5 °C remained similar during the storage (Dossou et al., 2016b). In the above-cited literature (Dossou et al., 2016b; Mazou et al., 2012), it was observed that important loss of WG nutrients (proteins, fat, minerals) occurs during the treatments tested for WG preservation purposes, contrary to the findings of the present study. This relative efficiency of the combined preservation method used in the present study was also supported by fatty acids variation of the control samples (WGTA and WGTF). Indeed, SFA (capric, lauric, myristic, and palmitoleic acids) increased and MUFA decreased while PUFA remained similar over time. This trend is not desirable as these SFA are probably associated with an increase in cardiovascular risk, obesity, and some cancers (Haug et al., 2007; González-Martín et al., 2020). Then, SFA daily intake is recommended to be as low as possible (EFSA, 2019). In the present study, the pH and Aw of the WGVA and WGCA samples decreased and these decreases were more important for WGCA than WGVA samples while pH and Aw remained constant for WGVF and WGCF samples over time. The decrease of pH reported in this study could indicate fermentative activity related

to the development of the lactic acid microflora naturally present in the milk before processing or in the environment. The growth and activity of spoilage microflora are mostly a function of substrate base and chemical and physical parameters such as temperature, pH, water activity, and atmosphere (Gram et al., 2002). Most of the spoilage microflora of WG include mesophilic bacteria, yeasts, and moulds that grow rapidly at ambient temperature (Dossou et al., 2016b; Mazou et al., 2012). The decrease of temperature inhibits the development of most of them, preserving the WG against spoilage, as observed in this work during the storage of WG. On basis of the decrease of the pH observed in the present study, WG was better preserved by vacuum packaging than simple packaging and by a lower temperature than ambient temperature. Moreover, the lowest pH obtained in the present study (6.0 for WGCA after 9 days of storage) was higher than the pH 5.8 reported by Mazou et al (2012) after one week of storage showing the relative efficiency of the combined preservation method used in the present study.

4.3. Trends in chemical contaminants during the preservation process

As for physicochemical characteristics and nutritional composition, the chemical hazards content of cow milk and WG were fully discussed in studies 2 and 3 of this thesis manuscript. The average lead, AFM1 and dioxins contamination of milk and WG observed in the present study were not exceeding the maximum level set by the Beninese Regulation (MAEP, 2007), European Commission (EC, 2023), and the CODEX (FAO/WHO, 2019).

After packaging (vacuum packaging and simple packaging) and prior storage, WG samples of the present study were steam-cooked leading to WGC and WGV. Regarding this treatment, nickel and ammonia contents increased in WGC and WGV samples respectively. These changes are minors as well as the changes observed in trace elements contents of the different WG tested during storage.

Spoilage microflora activity in WG could result in the formation of biogenic amines, produced from free amino acids subjected to decarboxylase enzymes (EFSA, 2011). Synthesis of biogenic amines is possible by the conjugation of several conditions: availability of the substrate amino acids, the presence of microorganisms with the appropriate catabolic pathway activated, and the environmental conditions favourable to the decarboxylation activity (Linares et al., 2011, 2012; Visciano et al., 2012). The main biogenic amines generally found in cheeses are putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, and tryptamine (Novella-Rodríguez et al., 2003; EFSA, 2011; Loizzo et al., 2013). Tryptamine and serotonin were the main biogenic amines detected during WG storage. Spermidine is converted by microorganisms to spermine and its concentration is generally lower than that of spermine (Baixas-Nogueras et al., 2005). The non-detection of spermine during the first six days of storage in the WG samples of the present study indicated low microbial activity during this period. In this study, the amounts of biogenic amines in WG samples stored at ambient temperature were higher than that stored at 5 °C. This variation agreed with that of pH showing that WG was better preserved by vacuum packaging than simple packaging and by lower temperature than ambient temperature.

4.4. Impact of the preservation process on the sensorial attributes of Wagashi Gassirè

The WG samples stored at 5 °C retained their sensory quality longer than WG samples stored at ambient temperature. Moreover, sensorial attributes of WG samples were better preserved by vacuum packaging than the simple packaging. These evaluations made by the panelists agreed the results of the physicochemical, nutritional, and chemical hazards analyses of the present study.

Conclusion

From the results of this study, the beneficial effect of packaging WG was demonstrated as it preserved the principal nutrients (proteins, fat, and minerals) of the products by preventing the leaching phenomenon during processing. At room temperature, the vacuum packaging was more efficient as the sensorial attributes of WG samples were better preserved than simple packaging. Vacuum packaging and storage of the WG at ambient temperature may be recommended to the WG processors and traders as storage of WG at lower temperatures is not available in the WG production and distribution area in Benin.

References

- Abdalla MOM, Nusr SM. 2009. Effect of cooking and vacuum packaging on chemical composition and sensory characteristics of white soft cheese. *Journal of Applied Sciences Research*. 5(10): 1421-1424.
- Aïssou RCB, Aïssi MV, Youssao AKI, Soumanou MM. 2016. Caractéristiques physico-chimiques du fromage Peulh produit dans les conditions optimales de coagulation à partir du lait de deux races de vaches du Bénin. *Nature et Technologie, B- Sciences Agronomiques et Biologiques*. 14 :37-43.
- Alam O, Billah M, Yajiea D. 2018. Characteristics of plastic bags and their potential environmental hazards. *Resources, Conservation and Recycling*. 132:121-129. doi: 10.1016/j.resconrec.2018.01.037.
- Appiah F, Ellis WO, Mathias J, Oduro I. 1998. Studies on traditional cheese (Woagashie) production in the Ashanti region. *Journal of Ghana Science Association*. 1(1): 96–104. doi: 10.4314/jgsa.v1i1.17790.
- Baba-Moussa F, Baba-Moussa L, Ahissou H, Bokossa I, Capo-Chichi B, Toukourou F, Sanni A. 2007. Propriétés coagulantes de *Calotropis procera* et ses possibilités d'utilisation en industrie agro-alimentaire. *Revue Cames*. 5:7-12.
- Baixas-Nogueras S, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC. 2005. Biogenic amine index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Food Protection*. 68(11):2433-2438. doi: 10.4315/0362-028x-68.11.2433.

- Barciela-Alonso C, Bermejo-Barrera P. 2015. Variation of food mineral content during industrial and culinary processing. In: de la Guardia M, Garrigues S, editors. Handbook of mineral elements in Food. Chichester: John Wiley and Sons; p. 645-668.
- Barłowska J, Szwajkowska M, Litwinczuk Z, Krol J. 2011. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00163.x.
- de la Fuente MA, Juárez M. 2015. Milk and dairy products. In: de la Guardia M, Garrigues S, editors. Handbook of mineral elements in Food. Oxford: John Wiley and Sons; p. 645-668.
- Djibril ASD, Bothon FTD, Agbangnan DPC, Avlessi F. 2019. Girolando and Borgou cow's milk: physico-chemical and nutritional characterization. *American Journal of Food Science and Technology*. 7(6):242-245. doi: 10.12691/ajfst-7-6-12.
- Dossou J, Adote S, Soulé H. 2006. Production et transformation du lait frais en fromage peuhl au Bénin, Rapport de guide de bonnes pratiques. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Dossou J, Atchouke GD, Dabadé DS, Azokpota P, Montcho JK. 2016. Evaluation comparative de la qualité nutritionnelle et sanitaire du lait de différentes races de vaches de quelques zones d'élevage du Bénin. *European Scientific Journal*. 12(3):140-159. doi:10.19044/esj.2016.v12n3p141.
- Dossou J, Montcho KJ, Londji S, Atchouke GDL, Odjo S. 2016. Procédé amélioré de conservation et de stabilisation du fromage peuhl par l'effet combiné du traitement thermique et du conditionnement sous vide. *European Scientific Journal*. 12 :189-209. doi :10.19044/esj.2016.v12n36p189.
- Dossou WA, Komagbe G, Seko Orou BMT, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, et al. 2024. Nutritional composition and chemical safety of Wagashi Gassirè cheese sold in the southern Benin markets. *Dairy*. 5(2):271-286. doi:10.3390/dairy5020022.
- Dossou WA, Seko Orou BMT, Komagbe G, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, et al. 2022. Processing and preservation methods of Wagashi Gassirè, a traditional cheese produced in Benin. *Heliyon*. 8, Article e10605. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e10605.
- Douny C, Benmedjadi S, Brose F, Iko Afé OH, Igout A, Hounhouigan DJ, Anihouvi VA, Scippo ML. 2019. Development of an analytical method for the simultaneous measurement of 10 biogenic amines in meat: application to Beninese grilled pork samples. *Food Analytical Methods*. 12:2392–2400. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.06.013.
- Douny C, El Khoury R, Delmelle J, Brose F, Degand G, Moula N, Farnir F, Clinquart A, Maghuin-Rogister G, Scippo ML. 2015. Effect of storage and cooking on the fatty acids profile of omega-3 enriched eggs and pork meat marketed in Belgium. *Food Science and Nutrition*. 3(2):140-152. doi:10.1002/fsn3.197.

- EC (European Commission). 2023. Commission regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. Brussels: EC.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2011. Scientific Opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2011.2393.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2019. Dietary reference values for the EU. <https://multimedia.efsa.europa.eu/drvs/index.htm?lang=en>. Assessed 2023 June 30.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2019. General standard for contaminants and toxins in food and feed CODEX STAN 193-1995. Rome: FAO/WHO
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226(1):497-509.
- Gobert S, Pasqualini V, Dijoux J, Lejeune P, Durieux EDH, Marengo M. 2017. Trace element concentrations in the apex predator swordfish (*Xiphias gladius*) from a Mediterranean fishery and risk assessment for consumers. *Marine Pollution Bulletin*. 120:364-369. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.05.029.
- Gomez I, Janardhanan R, Ibañez FC, Beriain MJ. 2020. The effects of processing and preservation technologies on meat quality: sensory and nutritional aspects. *Foods*. doi:10.3390/foods9101416.
- González-Martín MI, Vivar-Quintan AM, Revilla I, Salvador-Esteban J. 2020. The determination of fatty acids in cheeses of variable composition (cow, ewe's, and goat) by means of near infrared spectroscopy. *Microchemical Journal*. 156,104854. doi:10.1016/j.microc.2020.104854.
- Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M. 2002. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol*. 78(1):79-97. doi:10.1016/S0168-1605(02)00233-7.
- Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. 2007. Bovine milk in human nutrition-a review. *Lipids Health Diseases*. 6,25. doi:10.1186/1476-511X-6-25.
- Hemalatha S, Platel K, Srinivasan K. 2007. Influence of heat processing on the bioaccessibility of Zn and iron from cereals and pulses consumed in India *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 21:1-7.
- ISO (International Organization for Standardization). 2014. Milk and milk products-Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation ISO 8968-1:2014. Geneva, Switzerland: ISO.
- ISO (International Organization for Standardization). 2017. Foodstuffs-Determination of water activity. ISO 18787:2017. Geneva, Switzerland: ISO.
- Jalilzadeh A, Tunçtürk Y, Hesari J. 2015. Extension shelf life of cheese: a review. *International Journal of Dairy Science*. 10 (2): 44-60.

- Kalač P, Samková E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*. 55(12):521-537. doi: 10.17221/2485-CJAS.
- Keke M, Yehouenou B, de Souza C, Sohounhloúé D. 2009. Evaluation of hygienic and nutritional, quality of peulh cheese treated by sorghum vulgaris and pimenta racemosa (miller) extracts. *Scientific Study and Research*. 1:29-46.
- Kora S. 2005. Contribution à l'amélioration de la technologie de production du fromage peulh au Bénin. [Thèse d'ingénieur agronome]. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Linares DM, Del Río B, Ladero V, Martínez N, Fernández M, Martín MC, Álvarez MA. 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*. Article 180. doi:10.3389/fmicb.2012.00180.
- Linares DM, Martín MC, Ladero V, Alvarez MA, Fernández M. 2011. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(7):691-703. doi: 10.1080/10408398.2011.582813.
- Loizzo MR, Menichini F, Picci N, Puoci F, Spizzirri UG, Restuccia D. 2013. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science and Technology*. 30(1):38–55. doi:10.1016/j.tifs.2012.11.005.
- MAEP (Ministère de l'Agriculture de l'Élevage et de la Pêche). 2014. Etude des filières lait et viande, Rapport définitif sur la filière lait (PAFILAV). Cotonou : MAEP.
- MAEP (Ministère de l'Agriculture de l'Élevage et de la Pêche). 2007. Arrêté N° 0362/ MAEP/D-CAB/SGM/DRH/DP/SA du 30 octobre 2007 de fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en République du Bénin. Cotonou: MAEP.
- Mattiello S, Caroprese M, Matteo CG, Fortina R, Martini A, Martini M, Parisi G, Russo C, Zecchinia M. 2018. Typical dairy products in Africa from local animal resources. *Italian Journal of Animal Science*. 15(19):740-754. doi:10.1080/1828051X.2017.1401910.
- Mazorra-Manzano MA, Moreno-Hernández JM, Ramírez-Suarez JC. 2018. Milk-clotting plant proteases for cheesemaking. In: Guevara MG, Daleo GR, editors. *Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes*. Switzerland: Springer Nature; p. 21-41.
- Mazou M, Tchobo P, Degnon G, Mensah A, Soumanou MM. 2012. Effect of temperature and salt on the quality of Waragashi during storage in Benin Republic. *African Journal of Food Science*. 6 (20): 494-499.
- McSweeney PLH, Ottogalli G, Fox PF. 2017. Diversity and classification of cheese varieties: an overview. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fourth Edition. San Diego: Academic Press. 781-804. doi: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00031-4.
- Meade SJ, Reid EA, Gerrard JA. 2005. The impact of processing on the nutritional quality of food proteins. *Journal of AOAC International*. 88(3):904-922.

- Novella-Rodríguez S, Veciana-Nogués MT, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. 2003. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of Food Science*. 68:750-755. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb08236.x.
- Pereira PC. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 30:619-627. doi:10.1016/j.nut.2013.10.011.
- Samková E, Špička J, Pešek M, Pelikánová T, Hanuš O. 2012. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science*. 42(2):83-100. doi:10.4314/sajas.v42i2.1.
- Schwendel BH, Wester TJ, Morel PCH, Tavendale MH, Deadman C, Shadbolt NM, Otter DE. 2015. Invited review: Organic and conventionally produced milk-An evaluation of factors influencing milk composition. *Journal of Dairy Science*. 98 :721–746. doi : 10.3168/jds.2014-8389.
- Scippo ML, Eppe G, De Pauw E, Maghuin-Rogister G. 2004. DR-CALUX screening of food samples: evaluation of the quantitative approach to measure dioxin, furans and dioxin-like PCBs. *Talanta*. 63(5):1193-202. doi: 10.1016/j.talanta.2004.05.037.63.
- Seme K, Pitala W, Osseyi GE. 2015. Qualité nutritionnelle et hygiénique de laits crus de vaches allaitantes dans la région maritime au sud-Togo. *European Scientific Journal*. 11: 359-376.
- Sessou P, Boko C, Hounmanou G, Osseni SD, Hounkpe E, Azokpota P, Youssao I, Sohounhloue D, Farougou S. 2016. Preservation of traditional cheese Wagashi using essential oils: impact on microbiological, physico-chemical and sensorial characteristics. *British Microbiology Research Journal*. 15(4): 1-13.
- Sessou P, Farougou S, Azokpota P, Youssao I, Yèhouenou B, Ahounou S, Sohounhloué DCK. 2013a. Endogenous methods for preservation of Wagashi, a Beninese traditional cheese. *African Journal of Agricultural Research*. 8 :4254-4261. doi : 10.5897/AJAR2013.6908.
- Tchobo PF, Ahouannou C, Amegnon NA, Mazou M, Alitonou AG, Sohounhloue DCK, Soumanou MM. 2014. Physico-chemical and microbiological characteristics of dried wagashi, *African Journal of Food Science*. 8(8):447-455. doi: 10.5897/AJFS2013.1103.
- Uzeh RE, Ohenhen RE, Rojgubokan AK. 2006. Microbiological and nutritional qualities of dairy products: nono and wara. *Nature Science*. 4(3):37–40.
- Visciano P, Schirone M, Tofalo R, Suzzi G. 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. *Frontiers in Microbiology*. Article 188. doi: 10.3389/fmicb.2012.00188.
- Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. 2013. Milk and dairy product composition. In: Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D, editors. *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome: FAO; p. 41-102.

Supplementary data

Table S1: Limit of quantification (LOQ) for minerals.

Minerals	LOQ (mg/kg dw)	
	Milk	Wagashi Gassirè
Lithium (Li)	0.00012	0.00012
Beryllium (Be)	0.00000	0.00000
Boron (B)	0.05846	0.05846
Sodium (Na)	0.85893	0.85895
Magnesium (Mg)	1.15738	1.15741
Aluminium (Al)	2.88630	2.88638
Phosphorus (P)	7.55685	7.55705
Potassium (K)	0.08515	0.08515
Calcium (Ca)	4.88334	4.88348
Vanadium (V)	0.00600	0.00600
Chromium (Cr)	0.05305	0.05306
Iron (Fe)	1.13790	1.13794
Manganese (Mn)	0.01881	0.01881
Cobalt (Co)	0.00227	0.00227
Nickel (Ni)	0.00549	0.00549
Copper (Cu)	0.42409	0.42410
Zinc (Zn)	0.05914	0.05914
Arsenic (As)	0.03586	0.03587
Selenium (Se)	0.25724	0.25725
Rubidium (Rb)	0.00105	0.00105
Strontium (Sr)	0.04392	0.04392
Molybdenum (Mo)	0.01252	0.01252
Silver (Ag)	0.00378	0.00378
Cadmium (Cd)	0.00329	0.00329
Tin (Sn)	0.01280	0.01280
Antimony (Sb)	0.00777	0.00777
Barium (Ba)	0.01905	0.01905
Thallium (Tl)	0.00033	0.00033
Lead (Pb)	0.02447	0.02447
Bismuth (Bi)	0.01058	0.01058
Uranium (U)	0.00046	0.00046

dw: dry weight, ww: wet weight

DISCUSSION GENERALE

3. DISCUSSION GÉNÉRALE

3.1. Production, conservation et sources de contamination chimique du Wagashi Gassirè

Au Bénin, parmi les divers produits laitiers disponibles sur le marché, le WG demeure le produit le plus répandu et le plus consommé, tant en milieu rural qu'en milieu urbain (Dossou et al., 2006 ; Mattiello et al., 2018). La production du WG est réalisée sur toute l'étendue du territoire béninois à deux niveaux : la production traditionnelle qui assure la quasi-totalité de la disponibilité du WG sur l'étendue du territoire national et la production semi-industrielle réalisée par quelques mini-laiteries avec des tentatives d'amélioration des procédés traditionnels (MAEP, 2014). Le présent travail vise principalement à améliorer les procédés traditionnels de production et de conservation pour une amélioration de la qualité du WG produit et vendu au Bénin.

Les données sur la technologie de production du WG au Bénin ont été documentées (Dossou et al., 2006 ; MAEP, 2014 ; Anihouvi et al., 2019). En effet, il a été rapporté que la production du WG s'effectue en cinq étapes : (1) filtration du lait ; (2) préchauffage du lait assimilé à une pasteurisation du lait à 60 °C environ pendant 5 minutes ; (3) coagulation du lait qui consiste à ajouter au lait pasteurisé du coagulant ; (4) chauffage de l'ensemble constitué du lait et du coagulant à 70 °C environ (pendant 5 à 10 min) jusqu'à la formation du coagulum et du lactosérum avec une remontée de la température à 100 °C pendant trois à cinq minutes jusqu'à ce que le lactosérum devienne jaunâtre et transparent ; (5) moulage et égouttage. Globalement les étapes de production de WG identifiées au cours de la présente étude sont identiques à celles qui ont été documentées. Toutefois, quelques nouvelles variantes des procédés traditionnels de production de WG ont été enregistrées, principalement, au niveau de la coagulation du lait qui est une étape capitale de la production du WG. Les innovations introduites au niveau de la coagulation ont conduit à une diversité de procédés de production de WG donnant lieu à des produits de qualité variable qui ne répondent pas toujours aux préférences des consommateurs et aux réglementations normatives.

Il faut dire que la coagulation du lait qui s'opère au cours de la production du WG est enzymatique. Le coagulant est une enzyme végétale extraite des organes du *Calotropis procera* qui s'obtient de différentes façons. En effet, la tige et la feuille du *C. procera* peuvent être pilées dans un mortier et triturées avec du lait. Le mélange obtenu est homogénéisé et filtré pour obtenir le coagulant qui peut aussi provenir des fleurs ou de la sève (le latex) de *C. procera* (Dossou et al., 2006, Anihouvi et al., 2019), ou uniquement des feuilles de *C. procera* (Dah et al., 2018) ou encore de l'ensemble constitué des feuilles, des tiges, des fruits et de la sève dans des proportions données (Dossou et al., 2006 ; Belewu et al., 2005). Les tiges et les feuilles sont également broyées dans de l'eau et filtrées. Le filtrat obtenu est aussi un coagulant. Les feuilles et/ou tiges de *C. procera* peuvent être broyées et ajoutées directement au lait chauffé sans filtration (Dossou et al., 2022). Toutes ces options de coagulation pourraient avoir un effet sur la qualité de WG obtenu.

Pour les consommateurs, mais aussi les productrices de WG, la qualité du produit est liée à ses attributs sensoriels dont le principal critère est la blancheur (Dossou et al., 2022). Par contre, Hounsou et al (2022) identifie la texture ferme comme le principal critère d'appréciation de la qualité du WG suivi de l'aspect compact sans poches d'air en surface et de l'odeur de lait de vache. Selon ces auteurs, tous les acteurs de la chaîne de valeur WG considèrent la texture comme le principal critère de qualité souhaitable, car elle permet de différencier un produit ancien d'un nouveau, donc frais. Par exemple, la cuisson journalière du WG diminue progressivement la fraîcheur du produit jusqu'à ce que la texture devienne très dure (Hounsou et al., 2022). Selon Dossou et al (2022), les mailles des filtres utilisés lors de la filtration du lait et de la préparation des coagulants sont très peu serrées laissant des débris qui se retrouvent dans le WG induisant une désapprobation notable du WG par les consommateurs. À ce critère de désapprobation s'ajoute la présence de la graisse en fusion observable en surface du WG durant les périodes les plus chaudes de l'année (Dossou et al., 2022).

D'autres facteurs de production peuvent impacter négativement la qualité du WG. Il s'agit du matériel et du lait utilisés pour la production. En effet, au Bénin, les casseroles utilisées pour la production du WG sont toutes en aluminium. Celui-ci pourrait aussi contaminer le WG au cours de la production (Jitaru et al., 2019). Par ailleurs, des probables contaminations chimiques du lait par des dioxines et PCBs, des résidus de pesticides et de médicaments vétérinaires avaient été rapportées également (Vaccher et al ; 2020 ; Ingenbleek et al., 2019 ; Dossou et al., 2016a), en raison des pratiques agro-pastorales en cours dans les zones de production du lait et de WG au Bénin (Mensah et al., 2014 ; Douny et al., 2021 ; Ingenbleek et al., 2019 ; Dossou et al., 2016a). De plus, en l'absence d'emballage adapté, la poussière pourrait être une source de contamination par le plomb, car elle se dépose sur le WG lors de la production et de la commercialisation (Mama et al., 2013 ; Ekanem, 1998).

La conservation du WG aussi bien au niveau des consommateurs qu'au niveau des producteurs est une contrainte majeure. Quelques pratiques traditionnelles de conservation du WG ont été rapportées (Sessou et al., 2013 ; MAEP, 2014) à savoir : le séchage au soleil, la conservation dans du lactosérum, la conservation dans de l'eau simple ou colorée (par les panicules de *Sorghum vulgare*), le chauffage journalier, la friture et le fumage. Certaines pratiques pouvant générer des contaminations chimiques du WG ont été recensées au cours de la présente thèse. En effet, environ un quart des productrices et des commerçants de WG interviewés font cuire le WG journalièrement dans des sachets plastiques noirs/blancs qui ne sont pas destinés à entrer en contact avec les aliments ou pas reconnus comme tels. Les sachets plastiques sont en général des polymères de polyéthylène, de polyvinyle, de polypropylène, de polystyrène ou de polyamide dans lesquels des éléments traces métalliques, notamment le plomb, le cadmium et le chrome, et des composés organométalliques (additifs) sont encapsulés afin d'optimiser leurs propriétés et de réduire les coûts de production. Ces additifs et éléments traces métalliques peuvent

migrer progressivement dans l'environnement tout au long de leur cycle de vie en réponse à la lumière ou à la chaleur (Alam et al., 2018). Ainsi donc, la cuisson du WG dans des sacs plastiques réalisée par certaines productrices et commerçantes peut réduire la flore d'altération du produit, certes, mais pourrait aussi générer une forte contamination du WG par les éléments traces métalliques (Sessou et al., 2016 ; Alam et al., 2018).

Eu égard à ce qui précède, il existe un risque potentiel lié à la consommation du WG qui pourrait contenir certains contaminants chimiques préjudiciables à la santé du consommateur. Ce risque doit être évalué afin de permettre aux pouvoirs publics de prendre des mesures qui s'imposent.

3.2. Caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles du Wagashi Gassirè produit au Bénin

Le lait et les produits laitiers sont des aliments riches en nutriments essentiels (matières grasses, protéines et minéraux) (Haug et al., 2007). Les caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles des produits laitiers dépendent dans une grande mesure de celles du lait utilisé pour leur formulation. Selon la littérature, le lait de vache contient (en poids frais) en moyenne 87 % d'eau, 4 à 5 % de lactose, 3 % de protéines, 3 à 4 % de matières grasses, 0,8 % de minéraux et 0,1 % de vitamines (Pereira, 2014). La composition du lait de vache est généralement influencée par des facteurs génétiques, physiologiques, nutritionnels et environnementaux (saison, situation géographique, conditions climatiques) (Schwendel et al., 2015). Dans le cadre de ce travail, afin d'évaluer l'effet de la qualité du lait sur les caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles du WG produit, des échantillons de lait ont été collectés dans trois zones géographiques du Bénin à savoir Nikki au nord, Dassa au centre et Kpomasse au sud. Les teneurs en protéines (3,1 % ; 2,6 % et 3,4 %), en matières grasses (5,1 % ; 5,1 % et 4,5 %) et en minéraux totaux (0,6 % ; 0,6 % ; non déterminé) en poids frais du lait, obtenues, respectivement à Nikki, Dassa et Kpomasse sont similaires à celles qui sont rapportées dans la littérature à l'exception des teneurs en minéraux totaux de tous les échantillons analysés et de la teneur en protéines des échantillons de lait de Dassa. Pour ces échantillons, les valeurs obtenues semblent plus faibles que celles rapportées. En général, il y a autant de protéines que de matières grasses dans le lait (1/1) et par conséquent dans les fromages obtenus par coagulation enzymatique (Wijesinha-Bettoni et Burlingame, 2013). Pour le WG, des auteurs ont différemment rapporté des teneurs (poids frais) en protéines (33-37 %), en matières grasses (6-8 %), en cendres (1,3-1,8 %) et en eau (45-51 %) (Adeyeye, 2017), d'une part, et en protéines (23 %), matières grasses (18 %), en cendres (1,5 %) et eau (55 %) (Uzeh et al., 2006), d'autre part. Ces données correspondent à des rapports protéines/grasses d'environ 5/1 (Adeyeye, 2017) et 1/1 (Uzeh et al., 2006). Un rapport protéines/grasses d'environ 5/1 s'expliquerait par la qualité du lait utilisé, associée aux conditions de production du WG (données non fournies par les auteurs). Dans la présente étude, des teneurs en eau de 59 % pour les échantillons de WG provenant d'Abomey-Calavi, 61 % pour Nikki et 68 % pour Dassa sont associées à des teneurs en protéines de 13 % ; 13 % et 10 % poids frais

pour Abomey-Calavi, Nikki et Dassa, respectivement, et des teneurs en matière grasse de 21 %, 20 % et 16 % poids frais pour Abomey-Calavi, Nikki et Dassa, respectivement. Ces données correspondent à des rapports protéines/graisse d'environ 1/1 pour tous les échantillons de WG analysés et sont similaires aux rapports protéines/graisse des échantillons de lait correspondant. Par ailleurs, les échantillons de lait de Dassa présentent une faible teneur en protéines en comparaison à ceux provenant de Nikki avec pour conséquence une faible teneur en protéines des échantillons de WG de Dassa en comparaison aux échantillons de Nikki.

Les AGS, AGMI et AGPI représentaient respectivement 64-66 %, 28-34 % et 1,6-4,2 g/100 g des acides gras détectés dans tous les échantillons de lait et de WG analysés, les acides palmitique, stéarique et myristique représentant environ 80-90 % des AGS. Ces valeurs sont similaires à celles rapportées dans la littérature pour le lait de vache et les fromages issus du lait de vache (Haug et al., 2007 ; Kalač et Samková, 2010 ; Samková et al., 2012). Les mammifères ne disposent pas des enzymes permettant de synthétiser de novo deux AGPI : l'ALA et le LA, qui sont considérés comme des acides gras essentiels. Ces acides gras jouent de multiples rôles, par exemple dans la structure de la membrane cellulaire ou la signalisation cellulaire (Markiewicz-Kęszycka et al., 2013). LA et ALA ont été détectés dans certains échantillons de lait et de WG de cette étude. La détection de l'acide ruménique, un acide linoléique conjugué, dans certains échantillons de lait et de WG est particulièrement intéressante, car son ingestion aurait des effets anti-cancérogènes (Haug et al., 2007 ; Kalač et Samková, 2010).

Selon la littérature, les minéraux essentiels les plus abondants dans le lait et les produits laitiers sont le calcium et le phosphore (de la Fuente et Juarez, 2015 ; Pereira, 2014 ; Wijesinha-Bettoni et Burlingame, 2013). Dans le présent travail, les onze minéraux essentiels testés (sodium, magnésium, phosphore, potassium, calcium, fer, manganèse, cuivre, zinc, sélénium et molybdène) ont tous été détectés dans tous les échantillons de lait et de WG, le calcium et le phosphore étant les plus abondants. Leurs concentrations étaient similaires à celles rapportées dans la littérature pour les races bovines Girolando, Borgou, Borgou-Gir et Lagunaire élevées au Bénin (Djibril et al., 2019 ; Dossou et al., 2016a). En nutrition humaine, un apport adéquat en calcium et en phosphore est essentiel. Un apport suffisant en calcium et en phosphore dans l'alimentation permet d'avoir des os et des dents en bonne santé, et le calcium peut également contribuer à prévenir l'hypertension, à réduire les risques de cancer du côlon ou du sein, à améliorer le contrôle du poids et à réduire le risque de développer des calculs rénaux (Haug et al., 2007). Outre le calcium et le phosphore, le sélénium a été détecté dans certains échantillons de lait et de WG. Le sélénium est important pour la santé humaine ; il joue un rôle dans le système immunitaire et antioxydant ainsi que dans la synthèse et la réparation de l'ADN (Haug et al., 2007).

Par ailleurs, les variations saisonnières et régionales de la qualité du lait et leur effet sur la qualité du WG qui en est issu ainsi que l'effet des trois principales méthodes de préparation du coagulant sur la qualité du WG dérivé ont été testés. Pour les trois coagulants testés, les compositions physico-chimique

et nutritionnelle des échantillons de WG obtenus étaient similaires indiquant que la dose de l'enzyme coagulante, la calotropaine, dans chaque coagulant testé était probablement constante. Les coagulants étaient la sève et les filtrats des mélanges de tiges de *C. procera* et de lait et la combinaison de tige et feuilles de *C. procera* et de lait. En effet, les productrices maîtrisent les quantités de coagulants nécessaires à la production de WG en fonction du type de lait, obtenant ainsi des WG de qualité similaire. Il faut signaler que les productrices impliquées dans cette étude appartiennent au groupe socioculturel Peulh, connu pour sa maîtrise des méthodes de production du WG, et disposant de plus de 10 ans d'expérience dans la production du WG (Dossou et al., 2006, 2022). Toutefois, la maîtrise de la dose de coagulant reste entière pour les productrices les moins expérimentées et les entreprises locales qui s'intéressent à la production et à la commercialisation du WG. En effet, une grande variabilité a été observée dans les quantités de *C. procera* utilisées pour les différentes productions (Dossou et al., 2022) ce qui pose aussi la question de la durabilité de cette technologie fromagère au regard des pressions exercées sur le *C. procera*. Par ailleurs, les coagulants extraits du *C. procera* avec de l'eau et ceux extraits avec du lait doivent être évalués dans une perspective de comparaison des méthodes d'extraction de l'enzyme coagulante.

A l'analyse des résultats, il est apparu une variabilité saisonnière des caractéristiques physico-chimiques du lait de vache. En effet, les échantillons de lait produit durant la saison des pluies présentaient des teneurs en protéines, en matières grasses et en AGS plus élevées que ceux de la saison sèche. Toutefois, ces différences saisonnières n'ont pas affecté les teneurs en protéines, en matières grasses et en AGS des échantillons de WG correspondants. Outre l'effet de la saison, les variations des teneurs en protéines, en matières grasses et en minéraux essentiels du WG sont aussi associées aux régions de production. Comme indiqué plus haut, les échantillons de lait collectés à Dassa présentent une teneur en protéines plus faibles que ceux provenant de Nikki avec pour conséquence une faible teneur en protéines des échantillons de WG de Dassa en comparaison aux échantillons de Nikki. Les variations saisonnières et régionales de la composition du lait seraient principalement liées aux changements dans la disponibilité et la qualité des pâturages au cours de l'année et des autres aliments utilisés pour nourrir les vaches, comme rapporté par Johansen et al (2002). Il y a une différence de composition des pâturages naturels entre les différentes saisons climatiques de l'année dans les différentes régions concernées par cette étude, comme rapporté par Dahouda et al (2019). Les implications de ces différences de composition ne sont pas connues au niveau physico-chimique et mériteraient d'être approfondies.

3.3. Risques chimiques associés à la consommation du lait et du Wagashi Gassirè produit au Bénin

L'AFM1, les dioxines et PCBs, les amines biogènes, et les éléments traces métalliques dont l'arsenic, le cadmium, le plomb et le mercure sont les principaux contaminants chimiques mis en évidence dans le lait et les produits laitiers qui ont été testés dans le cadre de ce travail.

En Afrique subsaharienne, l'AFM1 est la mycotoxine la plus étudiée dans les produits laitiers (Akinyemi et al., 2021). L'AFM1 est le métabolite hydroxylé de l'aflatoxine B1. Celui-ci est formé par des enzymes associées au cytochrome P450 du foie et excrété directement dans le lait des vaches laitières, ce qui entraîne une contamination des produits laitiers qui en sont issus (Zinedine et al., 2021). L'aflatoxine M1 est classée dans le groupe 2B (cancérogène possible) par le Centre international de recherche sur le cancer (IARC, 2002). En raison du rôle important des produits laitiers, en particulier du lait, dans l'alimentation humaine, la présence d'AFM1 dans le lait et les produits laitiers est source d'inquiétude. Dans la présente recherche, l'AFM1 a été détectée dans les échantillons de WG provenant d'Abomey-Calavi (0,3 µg/kg poids frais), de Dassa (0,17 µg/kg poids frais), mais pas dans les échantillons de WG provenant de Nikki. Environ, 60 % des échantillons de lait provenant de Dassa (0,08 µg/kg poids frais), 40 % de ceux provenant de Nikki (0,01 µg/kg poids frais) et 80 % de ceux provenant de Kpomasse (0,02 µg/kg poids frais) étaient contaminés par l'AFM1. Les teneurs en AFM1 observées dans les échantillons analysés sont toutes inférieures à la limite maximale fixée par la norme générale du Codex (FAO/OMS, 2019) soit 0,5 µg/kg poids frais dans le lait et les produits laitiers. Par contre, les échantillons provenant d'Abomey-Calavi et de Dassa ne sont pas conformes à la législation béninoise (MAEP, 2007) et au Règlement (UE) 2023/915 de la Commission Européenne (EC, 2023) qui ont fixé à 0,05 µg/kg poids frais la limite maximale pour l'AFM1 dans le lait cru et les produits laitiers. Toutefois, les marges d'exposition calculées pour le cancer du foie dû à l'ingestion d'AFM1 (en se basant sur les données de contamination du WG provenant d'Abomey-Calavi) étaient bien supérieures à 10.000, ce qui indique que l'ingestion d'AFM1 par la consommation du WG est peu préoccupante pour la santé. Il convient de noter que des marges d'exposition inférieures à 10.000 liées à l'ingestion de l'AFM1 ont été rapportées par Kortei et al (2020) pour différentes régions du Ghana à la suite de la consommation de lait de vache cru.

Les polychloro-dibenzo-p-dioxines (PCDD) et les polychloro-dibenzofurannes (PCDF), communément appelés « dioxines », et les biphényles polychlorés (polychlorinated biphenyls, PCBs) sont un groupe de contaminants environnementaux. Les dioxines sont des sous-produits de combustion de nombreux procédés industriels et les PCBs sont largement utilisés dans de nombreuses applications industrielles, généralement sous la forme de mélanges techniques complexes (AFSCA, 2013). Les dioxines et PCBs ont été détectées dans l'ensemble des échantillons de lait et WG testés. Leurs concentrations étaient proches de la limite de quantification de la méthode DR-CALUX utilisée. Par ailleurs, les teneurs en dioxines et PCBs observées sont largement inférieures aux limites maximales fixées par la législation béninoise (MAEP, 2007) et le Règlement (UE) 2023/915 de la Commission Européenne (EC, 2023) à savoir 6 et 4 pg/g de graisse respectivement dans le lait et les produits laitiers. De nombreuses activités humaines, telles que le trafic routier, génèrent directement ou indirectement des dioxines. Les émissions provenant de la combustion de déchets plastiques contribuent à une importante pollution de l'air par les dioxines et les PCBs (Rusin et al., 2019). Les points de collecte des échantillons de WG provenant

d'Abomey-Calavi étaient susceptibles d'être contaminés par l'environnement. Le WG était vendu sans emballage et les dioxines et PCBs pourraient s'y déposer pendant la vente, étant donné que le dépôt atmosphérique est généralement la principale voie d'entrée des dioxines et PCBs dans les chaînes alimentaires (Mamontova et al., 2007). En outre, des dioxines et PCBs ont été détectés dans les échantillons de lait. En raison des processus de transport et de dépôt atmosphériques, les dioxines générées par les retombées de la combustion sont dispersées sur les sols et les plantes. Les animaux qui broutent ou fouinent le sol peuvent absorber des dioxines et PCBs qui sont excrétées dans le lait produit. Une attention particulière doit donc être accordée à la qualité de l'alimentation de la vache laitière pour ainsi limiter la contamination indirecte du WG par les dioxines et PCBs.

Dix-sept minéraux non essentiels ont été étudiés dans ce travail. Parmi ces minéraux non essentiels, certains dont le plomb et l'arsenic ont fait l'objet d'une évaluation de risque en se basant sur les niveaux de contamination observés dans les échantillons de WG provenant d'Abomey-Calavi. L'évaluation des risques pour le plomb et l'arsenic basés sur la néphrotoxicité du plomb et les effets néfastes de l'arsenic (cancer du poumon, cancer de la peau, cancer de la vessie, lésions cutanées) ont donné lieu à des marges d'exposition supérieures à 1 dans tous les cas indiquant que les ingestions du plomb et de l'arsenic via la consommation de WG sont peu préoccupantes pour la santé (EFSA, 2009, 2010). Toutefois, la contamination moyenne en plomb du WG observée dans ces échantillons de WG d'Abomey-Calavi dépassait la limite maximale fixée par la législation béninoise (MAEP, 2007), la Commission européenne (CE, 2023) et le CODEX (FAO/WHO, 2019), à savoir 0,02 mg/kg dans le lait et les produits laitiers. Par contre, les échantillons de lait et de WG analysés ultérieurement (collectés chez des productrices à Dassa, Nikki, et produit à l'unité pilote du projet WALAC à partir du lait collecté à Kpomasse) présentaient des niveaux de contamination très faibles. Cette différence de contamination peut être liée au moment du prélèvement des échantillons. Les échantillons de WG d'Abomey-Calavi ont été collectés lors de leur distribution sur les marchés. Ces échantillons sont passés par un circuit de commercialisation, contrairement aux échantillons testés ultérieurement. Le WG est vendu non emballé et la poussière pourrait être une source de contamination au plomb, car elle se dépose sur le WG pendant la distribution (Ekanem, 1998). Ainsi donc, les conditions actuelles de commercialisation du WG peuvent expliquer la contamination en plomb. Une solution consisterait à développer des emballages adaptés (food grade) au WG afin de limiter les dépôts environnementaux, sources de contamination environnementale du WG.

Dans la présente étude, les calculs de caractérisation de risque indiquent que l'ingestion de certains contaminants chimiques, principalement le plomb et l'AFM1, par la consommation du WG est peu préoccupante pour la santé. Toutefois, ces conclusions sont à relativiser, car les calculs effectués ne considèrent qu'une seule source alimentaire de ces contaminants chimiques. Afin de mieux caractériser ces risques, il conviendrait d'élargir les calculs à l'ensemble des sources alimentaires du plomb et de l'AFM1. En effet, l'ingestion de ces deux contaminants chimiques constitue un problème de santé

publique au Bénin. La prévalence à une teneur sanguine en plomb supérieure au seuil de 50 µg/L fixé par l'US Centers for Disease Control and Prevention est de 31,3 % chez les femmes enceintes d'Abomey-Calavi/Bénin, 54,8 % chez les enfants âgés de 1 an et 59,5 % chez les enfants âgés de 6 ans dans la commune d'Allada/Bénin (Guy et al., 2018 ; Ahmadi et al., 2020). Par ailleurs, Gong et al (2022) ont rapporté des quantités de 32,8 pg d'aflatoxine/mg d'albumine dans le sang des enfants de 9 mois à 5 ans et une association entre l'exposition aux aflatoxines par la consommation du maïs et de l'arachide et le retard de croissance chez ces enfants. L'ingestion des aflatoxines est à l'origine du cancer du foie et la prévalence (sur 5 ans) du cancer du foie est de 5,9 pour 100 000 personnes au Bénin. En 2022, sur les 622 cas de cancer du foie diagnostiqués, 583 décès ont été enregistrés correspondant à une mortalité de plus de 93 % (GLOBOCAN, 2022). Ainsi donc, une attention particulière doit être portée aux sources de contamination chimique des denrées alimentaires afin de réduire leur prévalence et leur niveau de contamination, protégeant ainsi la santé des consommateurs.

3.4. Efficacité des méthodes améliorées de production et de conservation du Wagashi

Gassirè

La problématique de la maîtrise du dosage du coagulant au cours de la production du WG restait entière. En effet, une variabilité a été observée dans les quantités de *C. procera* utilisées pour les différentes productions (Dossou et al., 2022). Les quantités de *C. procera* utilisées variaient de 3 à 15 g par kilogramme de lait (rapport 1/5) pour des WG de qualité similaire. Afin de répondre à cette problématique de la durabilité de la technologie Peulh au regard des pressions exercées sur *C. procera* mais aussi de répondre aux préférences des consommateurs, une optimisation des principaux paramètres de coagulation du lait lors de la production du WG a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré qu'il est possible d'obtenir avec 5 g de tige de *C. procera*, une coagulation du lait en 16 minutes, un rendement brut de 29 %, un coefficient de rétention de matière sèche de 64 % et du WG de teneur (poids sec) en matières grasses de 42 % , de teneur en protéines de 39 % et une luminance de 93,3 à partir d'un lait présentant une teneur en protéines (poids sec) de 25,5 % ; une teneur en matières grasses de 33,4 % et une luminance de 86,9. Cette étude apporte une amélioration notable de la technologie Peulh de production du WG. En effet, les suivis de production réalisés en amont de cette étude montraient des temps de coagulation moyens de 28 minutes pour un rendement fromager de 29 %, des WG de teneurs (poids sec) moyennes en protéines et en graisse de 53 % et 33 %, une luminance de 93 à partir de lait présentant des teneurs en protéines (poids sec) de 22,9 % et en graisse de 41 % et une luminance de 91. Ainsi donc, une réduction significative du temps de coagulation et une nette amélioration de la couleur du WG ont été obtenues. Ces améliorations ont été confirmées par les résultats des tests sensoriels qui révèlent une bonne acceptabilité du WG produit dans les conditions optimales. Enfin, en comparaison avec les autres études réalisées sur la question du dosage du coagulant (Rayantou, 2017 ; Chikpah et al., 2014 ; Aïssou et al., 2016 ; Dossou et al., 2006 ; Kra et al., 2006, 2009), les données des présentes études

reflètent la réalité de la production et les améliorations proposées sont facilement applicables, car elles ne nécessitent pas l'usage d'un équipement à l'exception d'une balance pour la pesée de *C. procer*.

En aval de la production du WG, la problématique de la conservation est tout aussi importante. En l'absence d'un emballage adapté, les divers modes de conservation de WG en usage ne limitent que très peu les risques de contaminations microbiennes et chimiques ainsi que les capacités de conservation, de transport et de commercialisation du WG vers les marchés nationaux, régionaux et internationaux (Sessou et al., 2016). Parmi ces méthodes de conservation, une attention particulière a été portée à la cuisson journalière, car les conditions de mise en œuvre de cette méthode permettent de détruire les microorganismes d'altération du WG, mais pourraient aussi générer une forte contamination du WG par le plomb, le cadmium et le chrome notamment et un lessivage important des minéraux essentiels (Sessou et al., 2016 ; Alam et al., 2018). Afin de répondre à cette problématique, l'effet combiné du conditionnement sous vide et du traitement thermique a été testé. Les échantillons de WG ainsi traités ont été conservés durant 9 jours à basse température (5 °C) et à température ambiante (28 °C) afin de suivre leur évolution. Les résultats montrent que le conditionnement du WG avant le traitement thermique serait recommandable, car il préserve le WG contre le lessivage des nutriments observé lors des traitements thermiques (cuisson, friture, etc.) comme l'ont souligné Barciela-Alonso et Bermejo-Barrera (2015). Aussi, ces auteurs ont-ils montré que les traitements thermiques affectent la digestibilité des constituants alimentaires ainsi que leur biodisponibilité. Ces traitements induisent d'importantes modifications des protéines et des lipides de la matrice alimentaire allant dans le sens d'une amélioration ou d'une dégradation des caractéristiques organoleptiques du produit comme l'ont rapporté Gomez et al (2020), Tchobo et al (2014) et Meade et al (2005). Ces modifications n'ont pas été étudiées dans la présente étude, mais pourraient faire l'objet de recherches ultérieures.

Plusieurs études antérieures avaient été réalisées sur la conservation du WG par l'utilisation d'un traitement thermique (Dossou et al., 2016b ; Tchobo et al., 2014 ; Mazou et al., 2012). Les résultats obtenus dans ces études montrent toujours une importante perte de nutriments (protéines, graisse, minéraux) lors du stockage du WG. Par contre, dans le présent travail, aucune différence significative n'a été observée pour la teneur en matière sèche, la teneur en protéines, la teneur en matières grasses, la composition en acides gras et la composition en minéraux essentiels, quels que soient la température de stockage testée (5 °C vs 28 °C) et le traitement thermique réalisé (cuisson sous vide vs cuisson simple). Cela signifie que, quelle que soit la température de stockage, les traitements de conservation (cuisson sous vide vs cuisson simple) ont préservé les composants du WG pendant le stockage. Cette efficacité relative des traitements utilisés est également confirmée par la variation de la composition en acides gras des échantillons contrôles. En effet, les AGS (acides caprique, laurique, myristique et palmitoléique) ont significativement augmenté et les AGMI ont significativement diminué, tandis que les AGPI sont restés similaires au cours de la conservation pour ces échantillons. Cette tendance n'est pas souhaitable,

car ces AGS seraient associés à une augmentation du risque cardiovasculaire, à l'obésité et à certains cancers (Haug et al., 2007 ; González-Martín et al., 2020). Sur la base de l'évolution du pH et des amines biogènes observée au cours des essais de stockage, et des scores d'appréciation donnés par les panélistes lors des tests de rejets effectués, le WG se conserverait mieux dans un emballage sous vide que dans un emballage simple à basse température.

Pour une distribution du WG dans les marchés régionaux et internationaux, une conservation de longue période s'avère nécessaire. Cette problématique de la conservation de longue durée pour des marchés autres que nationaux a été abordée par certaines études (Dossou et al., 2016b ; Mazou et al., 2012). Dans ces études, les expérimentations ont porté sur 24 (Mazou et al., 2012) et 60 jours (Dossou et al., 2016b). Les résultats obtenus par Mazou et al (2012) indiquent que la combinaison du salage et du stockage à basse température (-2 et 6°C) préserve les caractéristiques du WG sur la durée de l'expérimentation. Pour Dossou et al (2016b), la combinaison du séchage à air chaud (60°C, 4 heures), du conditionnement sous vide et du stockage à basse température (4-5°C) pendant 60 jours permettrait de conserver les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques du WG. Dans la présente étude, l'expérimentation de stockage est réalisée sur 9 jours, une durée certes suffisante pour la distribution du WG dans les marchés nationaux, mais insuffisante pour une distribution vers les régionaux et internationaux. Toutefois, la stabilité des caractéristiques du WG stocké à basse température (5°C) observé dans cette étude suggère une stabilité du WG sur une longue durée suffisante pour une distribution vers les marchés régionaux et internationaux. Il conviendrait de travailler sur des méthodes de conservation de longue durée à des températures ambiantes comprises entre 25 et 30°C.

3.5. Applicabilité des améliorations et pérennité de la technologie du Wagashi Gassirè

Le projet WALAC à l'origine de ce travail avait identifié l'une des principales contraintes au développement des technologies alimentaires locales béninoises : le transfert de technologie. Dans le domaine de la production et de la conservation du WG, plusieurs travaux scientifiques d'amélioration avaient été menés avant le projet WALAC (Baba-Moussa et al., 2007 ; Keke et al., 2009 ; Mazou et al., 2012 ; Tchobo et al., 2014 ; Aïssou et al., 2016 ; Dossou et al., 2016a). Mais ces travaux restaient limités aux sphères technologiques de la recherche scientifique sans transfert de technologie vers les groupes cibles. Les capacités d'innovation du secteur étaient donc freinées par ce cloisonnement entre les chercheurs et les productrices du WG. Une nouvelle approche de recherche s'imposait. Dans cette approche, les groupes cibles devraient définir les priorités de la recherche et être associés aux prises de décision des chercheurs afin de faciliter leur appropriation des résultats de recherche. Cette c'est approche qui a été adoptée par le projet WALAC avec sa plateforme de partie prenante rassemblant les divers acteurs de la chaîne de valeur WG, principalement les productrices et les commerçantes de WG. Cette plateforme est l'organe de validation des activités de recherche, mais aussi des résultats des travaux. Dans le cadre de ce travail, l'ensemble des résultats a été validé par cette plateforme et des

démonstrations de l'utilisation des résultats ont été faites afin de permettre aux principales actrices (productrices et commerçantes de WG) de la filière de s'approprier les avantages liés aux améliorations proposées par le projet WALAC.

Toutefois, les améliorations proposées dans ce travail questionnent la durabilité de la technologie du WG. Aussi, l'utilisation de certains organes d'une plante, comme la racine ou la jeune pousse, est très préjudiciable à la survie de la plante, contrairement à la tige ou la sève qui sont préjudiciables à la survie de la plante (Lawin et al., 2016). Par ailleurs, l'augmentation de la production du WG implique une augmentation de l'utilisation des tiges du *Calotropis procera*. Selon Lawin et al (2016), le prélèvement excessif des organes de plantes à des fins médicinales et/ou alimentaires associé à la déforestation, les changements climatiques, l'agriculture, la pression démographique, l'élevage et les feux de végétation constitue des facteurs de menace sur la phytodiversité. Pour ces mêmes auteurs, les menaces pesant sur le *Calotropis procera* sont négligeables du fait que cette plante est renouvelée régulièrement par l'homme (conservation dans le champ, dans le jardin de case et mixte) (Lawin et al., 2016).

3.6. Limites de cette étude

L'objectif général de cette thèse de doctorat est de contribuer à l'amélioration des procédés de production et de conservation du WG. Afin d'atteindre cet objectif, cinq études ont été réalisées dont une enquête portant sur la technologie, deux études de caractérisation, une étude d'optimisation de coagulation du lait et une étude d'amélioration de la conservation du WG.

L'enquête technologique a identifié des critères de préférences des consommateurs. Une telle identification aurait été plus pertinente avec l'utilisation des outils normés de profilage sensoriel, comme l'outil CATA (Check All That Apply). Cet outil présente aux consommateurs un ensemble de mots ou expressions ou phrases qui décrivent les attributs du produit et le consommateur choisit ceux qui décrivent mieux ses expériences avec le produit évalué. Les expressions proposées concernent les caractéristiques organoleptiques du produit, les émotions qu'ils suscitent, les intentions d'achat, les applications éventuelles et tout autre mot ou expression se rapportant au produit évalué. Cette approche permet une évaluation statistique rigoureuse des critères de préférences.

Dans la première étude de caractérisation, la taille de l'échantillon de WG analysé est relativement faible (n=15), ce qui rend les résultats peu pertinents. Toutefois, cette étude était une étude préliminaire permettant de circonscrire les analyses physico-chimiques, nutritionnelles et de contaminants chimiques à considérer pour le WG. L'importance de cette étude préliminaire réside dans le fait qu'elle a mis en évidence un effet probable de la coloration à chaud sur le lessivage des minéraux du WG à confirmer lors des études ultérieures. Celles-ci ont exploré l'effet de la coloration à froid. Toujours dans l'étude préliminaire, une évaluation de risque a été effectuée en considérant le WG comme seule source alimentaire des contaminants chimiques considérés. Par ailleurs, les données de consommation utilisées pour cette évaluation de risque ne sont pas spécifiques au WG.

L'évaluation des effets de la saison et de la région géographique sur la qualité du lait et du WG qui en est issu constituait la deuxième étude de caractérisation. La mise en évidence d'une variation saisonnière de la qualité du lait serait plus pertinente avec un échantillonnage couvrant une année avec des prélèvements hebdomadaires. Ceci permettrait une meilleure couverture des fluctuations saisonnières des zones géographiques considérées. L'étude de l'influence probable des variantes technologiques de production du WG identifiées lors de l'enquête avait été associée à l'étude des saisons et des régions. Un seul échantillonnage avait donc été réalisé pour étudier trois facteurs (saisons, régions et procédés). Toutefois, une dissociation des échantillonnages de ces différents effets (saison et région vs procédés) serait plus pertinente. En effet, plus les effets testés sont nombreux, plus il est difficile d'identifier les contributions réelles des paramètres étudiés aux différentes conclusions.

Lors de l'exploration des pistes d'amélioration de la conservation, les durées des essais de stockage du WG ont été très limitées. Le stockage aurait dû être prolongé en considérant les durées nécessaires à la distribution du WG dans les marchés internationaux les plus lointains, en l'occurrence, 3 à 4 mois après le conditionnement. En dehors des contrôles utilisés dans les essais de conservation, des échantillons témoins issus des productions en conditions réelles hors laboratoire auraient dû être introduits dans le dispositif expérimental afin de mieux mesurer l'efficacité des traitements de conservation réalisés.

Dans les études 2 à 5 de cette thèse de doctorat, les analyses physico-chimiques, nutritionnelles et de contaminants chimiques sont presque identiques sur les échantillons collectés. Toutefois, il aurait été plus pertinent de définir les analyses en fonction des objectifs des différentes études. Par exemple, la détermination des acides gras volatiles, des produits d'oxydation des acides gras, en particulier les peroxydes, et l'acidité titrable serait plus pertinente pour les échantillons analysés lors des expérimentations de conservation du WG (Etude 5).

**CONCLUSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES**

4. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

4.1. Conclusion générale

Les objectifs spécifiques de cette thèse de doctorat étaient de décrire les procédés traditionnels de production, les pratiques de conservation et les conditions de commercialisation du WG, de caractériser le WG sur les plans nutritionnels et physico-chimiques en tenant compte de certains facteurs de variation de la qualité du lait, en l'occurrence la saison et la région de production, de caractériser les risques chimiques liés à la consommation du WG, de déterminer les conditions optimales de coagulation du lait pour une production de WG de qualité physico-chimique et nutritionnelle satisfaisante et de définir les meilleures conditions de conservation du WG par l'utilisation des procédés combinant le traitement thermique et le conditionnement sous vide.

Au terme des différentes études réalisées, on peut retenir qu'il existe plusieurs modes de préparation de l'extrait de *C. provera* utilisé pour la coagulation du lait lors de la production du WG au Bénin. Les conditions de production, de stockage et de commercialisation/distribution du WG, ainsi que les pratiques d'élevage et la saisonnalité du lait utilisé comme matière première sont autant de facteurs susceptibles d'affecter les qualités nutritionnelles et sanitaires du WG. La saisonnalité du lait et son impact sur la qualité du WG ont été confirmés. Par ailleurs, la région géographique de production du lait est un facteur contribuant significativement aux différences de composition du WG produit au Bénin. Ces résultats contribuent à la caractérisation nutritionnelle du WG et présentent un intérêt pour le développement de l'appellation d'origine protégée en cours au Bénin pour le WG. Par ailleurs, l'AFM1 et le plomb se révèlent être les principaux contaminants chimiques du lait et du WG. Bien que les expositions chroniques calculées aient montré des risques négligeables pour l'ingestion du plomb et de l'AFM1 via la consommation du WG, il urge de réduire cette contamination, car aucun niveau de contamination n'est sûr au regard des effets néfastes desdits contaminants sur la santé.

L'amélioration des conditions d'extraction du coagulant et des conditions de coagulation permet de produire du WG répondant aux critères de préférence des consommateurs. Mais celle-ci n'est qu'une première étape dans le développement d'un procédé technologique rentable et facile à utiliser pour la production d'un WG de qualité standardisée. Enfin, un effet bénéfique du conditionnement du WG avant traitement thermique a été observé sur la préservation des principaux nutriments (protéines, matières grasses et minéraux). À température ambiante, le conditionnement sous vide du WG a été associé à des attributs sensoriels mieux préservés qu'avec un simple emballage. Le conditionnement sous vide, associé à un stockage à température ambiante, peut être recommandé aux commerçantes, sachant que la réfrigération n'est généralement pas accessible dans les zones de production du WG au Bénin.

4.2. Perspectives

Les différentes études constituant cette thèse ont contribué à la compréhension des relations entre la qualité du lait, les technologies traditionnelles et la qualité du WG produit au Bénin. Les améliorations de production et de conservation proposées constituent une avancée dans le développement et l'appropriation de technologies sûres, efficaces et faciles d'utilisation par les productrices qui sont les principales actrices de la chaîne de valeur WG en aval de la production du lait. Au terme de ces différentes études et au vu de leurs limites ci-dessus mentionnées, plusieurs axes de recherche sont envisageables à savoir :

- évaluer la qualité du WG issu de l'ensemble des variantes technologiques non prises en compte dans ce document,
- identifier les contributions respectives de la production, de la commercialisation et de la distribution à la contamination chimique du WG,
- évaluer les niveaux de consommation du WG dans les différentes zones de production et distribution du Bénin,
- évaluer les risques liés à l'ingestion du plomb et de l'AFM1 par l'approche probabiliste en considérant les autres sources alimentaires de ces contaminants chimiques,
- déterminer les produits d'oxydation des acides gras au cours de la conservation du WG,
- évaluer l'acceptabilité/adoption des innovations proposées et déterminer leur rentabilité,
- déterminer une forme de présentation du coagulant de *Calotropis procera* qui serait plus facile d'utilisation que les formes actuelles,
- déterminer dans différentes situations la durée de vie des extraits de *Calotropis procera* obtenu dans les conditions optimales.

Au vu des résultats des différentes études présentées dans ce document, les recommandations suivantes sont proposées :

- à l'endroit des éleveurs de vaches laitières : toujours respecter les délais d'attente après les traitements médicamenteux des vaches, réaliser la traite dans les meilleures conditions d'hygiène et s'assurer de la bonne qualité de l'alimentation des vaches pour obtenir un lait de bonne qualité microbiologique et chimique ;
- à l'endroit des productrices de WG : réaliser la production du WG dans un environnement plus ou moins clos (une cuisine et non à l'air libre) en utilisant les quantités de tiges de *Calotropis procera* définies dans cette étude afin d'avoir un WG de qualité standard pour ainsi éviter les défauts de fabrication ;
- à l'endroit des commerçants de WG : prioriser l'utilisation d'emballage plastique alimentaire biodégradable et appliquer la cuisson sous vide en lieu et place de la cuisson journalière afin de garantir l'innocuité du WG vendu aux consommateurs ;

- à l'endroit des consommateurs de WG : privilégier la consommation de WG local aux fromages importés et promouvoir le WG local en acceptant de payer la qualité du produit mis sur le marché ;
- à l'endroit des entrepreneurs du secteur agroalimentaire : s'approprier les résultats de cette thèse qui sont une avancée importante dans la caractérisation du WG en vue de sa certification sous différents labels (comme le label IG soutenu par le projet ACED Bénin) ; ceci renforcera le positionnement de beaucoup d'entreprises fromagères sur le marché concurrentiel des produits laitiers ;
- à l'endroit de la communauté scientifique : mobiliser des ressources pour la mise en œuvre des axes de recherche énumérés dans les perspectives de cette thèse ; ce qui permettra de répondre à plusieurs questions de recherche et de contribuer à la consommation du WG de bonne qualité ;
- à l'endroit des décideurs politiques : renforcer la législation, les contrôles et le management des risques sanitaires au Bénin, et soutenir la communauté scientifique et les différents acteurs de la chaîne de valeur WG dans leurs efforts de valorisation de ce patrimoine béninois.

Références

- Aboudoulaye MCD, Kaya S. 2020. Characterisation and standardisation of wangashi cheese production steps. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 19(4): 375–386. doi: 10.17306/J.AFS.2020.0827.
- Achaglinkame MA, Dari L, Mörlein D. 2023. A review of dairy production and utilization in Ghana and Benin. *Discover Food*. 3(13). doi:10.1007/s44187-023-00053-9.
- Addo KK, Mensah GI, Aning KG, Nartey N, Nipah GK, Bonsu C, Akyeh ML, Smits HL. 2011. Microbiological quality and antibiotic residues in informally marketed raw cow milk within the coastal savannah zone of Ghana. *Tropical Medicine and International Health*. 16(2):227–232. doi:10.1111/j.1365-3156.2010.02666.x.
- Adechian SA, Nasser-Baco M, Akponikpe I, Imorou-Toko I, Egah J, Affoukou K. 2015. Les pratiques paysannes de gestion des pesticides sur le maïs et le coton dans le bassin cotonnier du Bénin. *Vertigo*. 15: 2. doi:10.4000/vertigo.16534.
- Adeyeye SAO. 2017. A preliminary study on the quality and safety of street-vended warankasi (a Nigerian soft white cheese) from Ibadan, Oyo state, Nigeria. *British Food Journal*. 119 (2):322-330. doi:10.1108/BFJ-05-2016-0218.
- Adigbli C. 2014. À Kandi, les bœufs meuglent de détresse, Benin l'élevage entre tribulations et espoir. <https://www.senepius.com/article/kandi-les-b%C5%93ufs-meuglent-de-d%C3%A9tresse-0>. Consulté le 12 mars 2024.
- AFSCA (Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire). 2013. Risques des substances carcinogènes et/ou génotoxiques dans les denrées alimentaires : Contaminants environnementaux. Dossier SciCom N° 2011/04 : auto-saisine. Avis 01-2013.
- AFSCA (Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire). 2009. Estimation l'exposition au plomb par la population belge. Dossier Sci Com N°2009/14. Avis 36-2009.
- Agbohessi PT, Imorou-Toko I, Yabi JA, Dassoundo-Assogba JFC, Kestemont P. 2011. Caractérisation des pesticides chimiques utilisés en production cotonnière et impact sur les indicateurs économiques dans la Commune de Banikoara au nord du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 5(5): 1828-1841.s
- Ahmadi S, Le Bot B, Zoumenou R, Durand S, Fiévet N, Ayotte P, Massougbdji A, Alao MJ, Cot M, Glorennec P, et al. 2020. Follow-up of elevated blood lead levels and sources in a cohort of children in Benin. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17, 8689. doi:10.3390/ijerph17228689.
- Ahouangninou C, Fayomi BE, Martin T. 2011. Évaluation des risques sanitaires et environnementaux des pratiques phytosanitaires des producteurs maraîchers dans la commune rurale de Tori-Bossito (Sud-Bénin). *Cahier Agricultures*. 20 (3) : 216-222. doi :10.1684/agr.2011.0485.

- Aïssi MV, Aïssou RCB, Soumanou MM. 2016. Influence de la complémentation des vaches laitières Girolando importées au Bénin sur les caractéristiques physico-chimiques du lait et du Waragashi (fromage Peuhl). Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin. ISSN :1840-7099.
- Aïssi VM, Soumanou MM, Bankolè H, Toukourou F, de Souza CA. 2009. Evaluation of hygienic and mycological quality of local cheese marketed in Benin. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3(3): 2397-2404.
- Aïssou RCB, Aïssi MV, Youssao AKI, Soumanou MM. 2016. Caractéristiques physico-chimiques du fromage Peuhl produit dans les conditions optimales de coagulation à partir du lait de deux races de vaches du Bénin. Nature et Technologie, B- Sciences Agronomiques et Biologiques. 14 :37-43.
- Akinyemi MO, Ayeni KI, Ogunremi OR, Adeleke RA, Oguntoyinbo FA, Warth B, Ezekiel CN. 2021. A review of microbes and chemical contaminants in dairy products in sub-Saharan Africa. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 20:1188–1220. doi: 10.1111/1541-4337.12712.
- Alam O, Billah M, Yajiea D. 2018. Characteristics of plastic bags and their potential environmental hazards. Resources, Conservation and Recycling. 132:121-129. doi: 10.1016/j.resconrec.2018.01.037.
- Anfossi L, Baggiani C, Giovannoli C, D’Arco G, Passini C, Giraudi G. 2012. Occurrence of aflatoxin M1 in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. Food Control. 25(1): 125-130. doi:10.1016/j.foodcont.2011.10.027.
- Anihouvi EL, Salih H, Anihouvi VB, Kesenkas H. 2019. Dairy Products Production in Benin. Akademik Gıda. 17(4):508-516. doi: 10.24323/akademik-gida.667265.
- Appiah F, Ellis WO, Mathias J, Oduro I. 1998. Studies on traditional cheese (Woagashie) production in the Ashanti region. Journal of Ghana Science Association. 1(1): 96–104. doi: 10.4314/jgsa.v1i1.17790.
- Baba-Moussa F, Baba-Moussa L, Ahissou H, Bokossa I, Capo-Chichi B, Toukourou F, Sanni A. 2007. Propriétés coagulantes de *Calotropis procera* et ses possibilités d’utilisation en industrie agro-alimentaire. Revue Cames. 5:7-12.
- Babatoundé S, Sidi H, Houinato M, Oumorou M, Mensah GA, Sinsin BA. 2011. Valeur alimentaire des fourrages consommés par les taurillons Borgou sur les parcours naturels du centre du Bénin. International Journal of Biological and Chemical Sciences. 5(6): 2382-2394.
- Barciela-Alonso C, Bermejo-Barrera P. 2015. Variation of food mineral content during industrial and culinary processing. In: de la Guardia M, Garrigues S, editors. Handbook of mineral elements in Food. Chichester: John Wiley and Sons; p. 645-668.

- Barłowska J, Sz wajkowska M, Litwinczuk Z, Krol J. 2011. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10:291-302. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00163.x.
- Belewu MA, Belewu KY, Nkwunonwo CC. 2005. Effect of biological and chemical preservatives on the shelf life of West African soft cheese. *African Journal of Biotechnology*. 4(10):1076-79.
- Bellinger DC. 2004. Lead. *Paediatrics*. 113(4):1016–1022.
- Ben Amira A, Besbes S, Attia H, Blecker C. 2017 Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*. 20 (1): 76-93. doi:10.1080/10942912.2017.1289959.
- Bodeau-Livinec F, Glorennec P, Cot M, Dumas P, Durand S, Massougbodji A, Ayotte P, Le Bot B. 2016. Elevated blood lead levels in infants and mothers in Benin and potential sources of exposure. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 13, 316. doi:10.3390/ijerph1303031.
- Bodkowski R, Czyż K, Kupczyński R, Patkowska-Sokoła B, Nowakowski P, Wiliczkiwicz A. 2016. Lipid complex effect on fatty acid profile and chemical composition of cow milk and cheese. *Journal of Dairy Science*. 99(1):57-67. doi: 10.3168/jds.2015-9321.
- CAN (Conseil National de l'Alimentation et de la Nutrition). 2014. Guide alimentaire du Bénin.
- Capuano E, van der Veer G, Boerrigter-Eenling R, Elgersma A, Rademaker J, Sterian A, van Ruth SM. 2014. Verification of fresh grass feeding, pasture grazing and organic farming by cows farm milk fatty acid profile. *Food Chemical*. 164:234-241. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.011.
- Chabi TR, Adegbidi A, Lebailly P. 2015. Valorisation des produits laitiers dans les ménages Peul du Nord-Est du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 9(6): 2716-2726.
- Chikpah SK, Teye GA, Teye M, Mawuli FF. 2014. Effects of different concentrations of fresh and dried *Calotropis procera* (sodom apple) extract on cow milk coagulating time, cheese yield and organoleptic properties of west african soft cheese (wagashie). *European Scientific Journal*. 10(27): 317-326.
- Costa A, Lopez-Villalobos N, Sneddon NW, Shalloo L, Franzoi M, De Marchi M, Penasa M. 2019. Invited review: Milk lactose - Current status and future challenges in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 102:5883–5898. doi :10.3168/jds.2018-15955.
- CSS (Conseil Supérieur de la Santé). 2019. Recommandations alimentaires pour la population belge adulte. Avis n° 9284.

- Dah PA, Guira F, Tankoano A, Traore K, Sawadogo-Lingani H, Savadogo A. 2018. Cheese processing, marketing, utilisation, and consumption in Burkina Faso. *Current Journal of Applied Science and Technology*. 29(5):1–12. doi:10.9734/CJAST/2018/42863.
- Dalgleish DG, Corredig M. 2012. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*. 3: 449-467. doi:10.1146/annurev-food-022811-101214.
- de la Fuente MA, Juárez M. 2015. Milk and dairy products. In: de la Guardia M, Garrigues S, editors. *Handbook of mineral elements in Food*. Oxford: John Wiley and Sons; p. 645-668.
- Dehoux JP, Hounsou-Vè G. 1993. Productivité de la race bovine Borgou selon les systèmes d'élevage traditionnels au Nord-Est du Bénin. *World Animal Review*. 74(75) : 36-48.
- Djibril ASD, Bothon FTD, Agbangnan DPC, Avlessi F. 2019. Girolando and Borgou cow's milk: physico-chemical and nutritional characterization. *American Journal of Food Science and Technology*. 7(6):242-245. doi: 10.12691/ajfst-7-6-12.
- Dobson ADW. 2017. Mycotoxins in cheese. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese chemistry, physics and microbiology*. 4th edition. Amsterdam: Elsevier; p. 595-601.
- Dognon SR, Dognon HR, Youssao AKA, Scippo M-L, Youssao AKI. 2018. The use of pesticides in agriculture in North East Benin. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 12(2) : 48-63.
- Doko AS, Gbégo T, Tobada P, Mama YHLR, Tchobo A, Alkoiret TI. 2012. Performances de reproduction et de production laitière des bovins Girolando à la ferme de Kpinnou au Sud-Ouest du Bénin. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin*. Numéro spécial Elevage & Faune. 35-47.
- Dorne JCLM, Bordajandi LR, Amzal B, Ferrari P, Verger P. 2009. Combining analytical techniques, exposure assessment and biological effects for risk assessment of chemicals in food. *Trends in Analytical Chemistry*. 28(6):695-707.
- Dossou J, Adote S, Soulé H. 2006. Production et transformation du lait frais en fromage peuhl au Bénin, Rapport de guide de bonnes pratiques. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Dossou J, Atchouke GD, Dabadé DS, Azokpota P, Montcho JK. 2016. Evaluation comparative de la qualité nutritionnelle et sanitaire du lait de différentes races de vaches de quelques zones d'élevage du Bénin. *European Scientific Journal*. 12(3):140-159. doi:10.19044/esj.2016.v12n3p141.
- Dossou J, Montcho KJ, Londji S, Atchouke GDL, Odjo S. 2016. Procédé amélioré de conservation et de stabilisation du fromage peuhl par l'effet combiné du traitement thermique et du conditionnement sous vide. *European Scientific Journal*. 12:189-209. doi :10.19044/esj.2016.v12n36p189.

- Dossou WA, Seko Orou BMT, Komagbe G, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, et al. 2022. Processing and preservation methods of Wagashi Gassirè, a traditional cheese produced in Benin. *Heliyon*. 8, Article e10605. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e10605.
- Douny C, Zoumenou YMBG, Aïna M, Toko II, Igout A, Guedegba L, Chabi SK, Kestemont P, Scippo ML. 2021. Contamination of water, sediment and fish with residues of pesticides used in cotton production in Northern Benin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 81:367–385. doi:10.1007/s00244-021-00888-2.
- DSA (Direction de la Statistique Agricole). 2024. Production vivrière et industrielle au niveau national de 2016 à 2023. Cotonou : DSA.
- EC (European Commission). 2005. Commission regulation (EC) 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuff. Brussels: EC.
- EC (European Commission). 2023. Commission regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. Brussels: EC.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2005. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2005.282.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Safety of aluminium from dietary intake. New Jersey: John Wiley and Sons. doi :10.2903/j.efsa.2008.754.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2009. Scientific opinion on arsenic in food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2009.1351.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Scientific Opinion on lead in food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi :10.2903/j.efsa.2010.1570.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2011. Scientific Opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2011.2393.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2017. Update: Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2017.4658.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2018. Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5333.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2019. Dietary reference values for the EU. <https://multimedia.efsa.europa.eu/drvs/index.htm?lang=en>. Assessed 2023 June 30.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2020. Risk assessment of aflatoxins in food. New Jersey: John Wiley and Sons. doi:10.2903/j.efsa.2020.6040.

- EFSA (European Food Safety Authority). 2024. Chemical contaminants in food and feed. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/chemical-contaminants-food-feed>. Assessed 2024 March 07.
- Ekanem, O. 1998. The street food trade in Africa: Safety and socio-environmental issues. *Food Control*. 9(14):211-15. doi:10.1016/S0956-7135 (97)00085-6.
- Elgersma A, Tamminga S, Ellen G. 2006. Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*. 131: 207-225. doi:10.1016/j.anifeeds.2006.06.012.
- FAO/CEDEAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture/ Communauté Économique des États de l'Afrique de l'Ouest). 2016. Revue des filières bétail/viande et lait et des politiques qui les influencent au Bénin. Abuja : FAO/CEDEAO.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2019. General standard for contaminants and toxins in food and feed CODEX STAN 193-1995. Rome: FAO/WHO
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2016. Manuel de procedure, 25ème edition. Rome: FAO/WHO
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2018. Norme générale pour le fromage CXS 283-1978. Rome: FAO/WHO.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2006. Food safety risk analysis, a guide national food safety authorities. Rome: FAO/WHO
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Statistics). 2024. Production: crops and livestock products. FAO Data. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Assessed 10 February 2022.
- Ferrari S. 2013. Comparaison de la compétitivité prix et hors-prix entre l'élevage semi-intensif et l'élevage intensif de la filière laitière locale dans la région de Dakar (Sénégal). [Mémoire de Master]. Bruxelles : Université Libre de Bruxelles.
- Fox PF, McSweeney PLH. 2017. Cheese : an overview. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fourth Edition. San Diego: Academic Press; p. 781-804. doi: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00001-6.
- Gbangboché AB, Alkoiret TI. 2011. Reproduction et production de lait des bovins de race Borgou et N'Dama au Bénin. *Journal of Applied Biosciences* 46: 3185-3194.
- GLOBOCAN (Global Cancer Observatory). 2022. Cancer today, Benin. Lyon : France.
- Gomez I, Janardhanan R, Ibañez FC, Beriain MJ. 2020. The effects of processing and preservation technologies on meat quality: sensory and nutritional aspects. *Foods*. doi:10.3390/foods9101416.
- Gómez-Cortés P, Juárez M, de la Fuente MA. 2018. Milk fatty acids and potential health benefits: An updated vision. *Trends in Food Science and Technology*. 81:1-9. doi: 10.1016/j.tifs.2018.08.014.

- Gong YY, Cardwell K, Hounsa A, Egal S, Turner PC, Hall AJ, Wild CP. 2002. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *British Medical Journal*. 325(7354):20-21. doi: 10.1136/bmj.325.7354.20.
- González-Martín MI, Vivar-Quintan AM, Revilla I, Salvador-Esteban J. 2020. The determination of fatty acids in cheeses of variable composition (cow, ewe's, and goat) by means of near infrared spectroscopy. *Microchemical Journal*. 156,104854. doi:10.1016/j.microc.2020.104854.
- Gouda A-I, Imorou-Toko I, Salami S-D, Richert M, Scippo M-L, Kestemont P, Schiffers B. 2018. Pratiques phytosanitaires et niveau d'exposition aux pesticides des producteurs de coton du nord du Bénin. *Cahiers. Agricultures*. 27, 65002. doi:10.1051/cagri/2018038.
- Guinee TP, Fox PF. 2017. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fourth Edition. San Diego: Academic Press; p. 317-375. doi: http: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2.
- Guinee TP, Gorry CB, O'Callaghan DJ, O'Kennedy BT, O'Brien N, Fenelon MA. 1997. The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation properties of milk. *International Journal of Dairy Technology*. 50:99–106.
- Guy M, Accrombessi M, Fievet N, Yovo E, Massougboji A, Le Bot B, Glorennec P, Bodeau-Livinece F, Briand V. 2018. Toxics (Pb, Cd) and trace elements (Zn, Cu, Mn) in women during pregnancy and at delivery, South Benin, 2014–2015. *Environmental Research*. 167:198–206. doi: 10.1016/j.envres.2018.06.054.
- Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. 2007. Bovine milk in human nutrition-a review. *Lipids Health Diseases*. 6,25. doi:10.1186/1476-511X-6-25.
- Heck JML, van Valenberg HJF, Dijkstra J, van Hooijdonk ACM. 2009. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science*. 92:4745-4755. doi:10.3168/jds.2009-2146.
- Henning DR, Baer RJ, Hassan AN, Dave R. 2006. Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads. *Journal of Dairy Science*. 89(4):1179-1188. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72187-7.
- Hounsou M, Dabadé DS, Götz B, Hounhouigan MH, Honfo GF, Albrecht A, Kreyenschmidt J, DJ Hounhouigan. 2022. Handling practices, quality and loss estimation along the value chain of Waragashi, a soft cheese from Benin. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 22(7): 20774-20792. doi: 10.18697/ajfand.112.21565.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. WHO. 82:171–275.
- Ingenbleek L, Huc R, Pereirac LL, Paineauc A, Coletc I, Konéd AZ, Adegboye A, Hossouf SE, Dembélé Y, Oyedelee AD, et al. 2019. Sub-Saharan Africa total diet study in Benin,

- Cameroon, Mali and Nigeria: Pesticides occurrence in foods. *Food Chemistry*:X. 2:100034, doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100034.
- Ingenbleek L, Jazet E, Dzossa DA, Adebayo BS, Ogungbangbe J, Dansou S, Diallo JZ, Kouebou C, Adegboye A, Hossou E, et al. 2017. Methodology design of the regional Sub-Saharan Africa total diet study in Benin, Cameroon, Mali and Nigeria. *Food and Chemical Toxicology*. 109(1):155-165. doi:10.1016/j.fct.2017.08.017.
- Ingenbleek L. 2019. Exposition par voie alimentaire de populations du Bénin, Cameroun, Mali et Nigéria à un large panel de substances chimiques. [Thèse de doctorat]. Bretagne : Université Bretagne Loire Agro Campus Ouest.
- INSAE (Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique). 2012. Enquête modulaire intégrée sur les conditions de vie des ménages, 2^{ème} édition. Cotonou : INSAE.
- INSAE (Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique). 2015. Enquête modulaire intégrée sur les conditions de vie des ménages, 3^{ème} édition, Rapport préliminaire. Cotonou : INSAE.
- Jacob M, Doris J, Rohm H. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. 64(1):14-33. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x.
- Jitaru P, Ingenbleek L, Marchonda N, Laurenta C, Adegboye A, Hossou SE, Koné AZ, Oyedele AD, Kisito CSKJ, Dembélé YK, et al. 2019. Occurrence of 30 trace elements in foods from a multi-centre Sub-Saharan Africa Total Diet Study: Focus on Al, As, Cd, Hg, and Pb. *Environment International*. 133, 105197. doi:10.1016/j.envint.2019.105197.
- Johansen AG, Vegarud GE, Skeie S. 2002. Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-type and Dutch-type cheeses. *International Dairy Journal*. 12:621-629. doi:10.1016/S0958-6946(02)00054-7.
- Kalač P, Samková E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*. 55(12):521-537. doi: 10.17221/2485-CJAS.
- Karovičová J, Kohajdová Z. 2005. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*. 59(1):70-79.
- Kassa SK, Ahounou GS, Dayo GK, Salifou CFA, Dotché OI, Issifou TM, Gandonou P, Kountinhouin GB, Mensah GA, Yapi-Gnaoré V, et al. 2016a. Évaluation et modélisation de la production de lait des vaches Girolando, Borgou, Lagunaire et croisées Azawak × Lagunaire, élevées dans le système semi-amélioré au Bénin. *Journal of Applied Biosciences*. 103:9829-9840. doi :10.4314/jab.v103i1.5.
- Kassa SK, Salifou FCA, Dayo GK, Ahounou S, Ogoudanan ID, Issifou TM, Kountinhouin B, Mensah AG, Yapi-Gnaoré V, Youssao AKI. 2016b. Influence du système de production et du temps de pâture sur la production de lait des vaches Borgou au Bénin. *Tropicultura*. 34(4) : 285-395.
- Kees M. 1996. Le fromage Peulh : facile à produire et bien apprécié, une technologie à vulgariser. Rapport de recherche GTZ, Université Eschborn, RFA. pp8-25

- Keke M, Yehouenou B, de Souza C, Sohounhloúé D. 2009. Evaluation of hygienic and nutritional quality of peulh cheese treated by sorghum vulgaris and pimenta racemosa (miller) extracts. *Scientific Study and Research*. 1:29-46.
- Khanal BKS, Pradhan M, Bansal N. 2019. Cheese: Importance and Introduction to Basic Technologies. *Journal of Food Science and Technology of Nepal*. 11:14-24.
- Kora S. 2005. Contribution à l'amélioration de la technologie de production du fromage peulh au Bénin. [Thèse d'ingénieur agronome]. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Kortei NK, Annan T, Kyei-Baffour V, Essuman EK, Boakye AA, Tettey CO, Boadi NO. 2022. Exposure assessment and cancer risk characterization of aflatoxin M1 (AFM1) through ingestion of raw cow milk in southern Ghana. *Toxicology Report*. 9: 1189–1197. doi:10.1016/j.toxrep.2022.05.015.
- Kpoussou AR, Paraiso MN, Sokpon CM, Alassan KS, Vignon RK, Keke RK, Bigot C, Domonhédou C, Gbédo SE, Séhonou J et al. 2020. Hépatite virale B lors d'une campagne de dépistage en population générale au Bénin: Séroprévalence et facteurs associés. *Pan African Medical Journal*. 37 (247). doi : 10.11604/pamj.2020.37.247.26070.
- Kra KAS, Megnanou RM, Saki SJ, Ackpa EE, Assidjo NE. 2009. Amélioration du rendement de la technique traditionnelle de production fromagère Peulh par l'utilisation appropriée d'extraits foliaires de *Calotropis procera*. *Revue Ivoirienne de Science et Technologie*. 13 :213-223.
- Kra S, Assidjo NE, Dioppoh KJ, Cardot P. 2006. Use of experimental design for Peuhl cheese process optimization. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 10 (2): 83 – 89.
- Larsen MK, Nielsen JH, Butler G, Leifert C, Slots T, Kristiansen GH, Gustafsson AH. 2010. Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. *Journal of Dairy Science*. 93:2863-2873. doi:10.3168/jds.2009-2953.
- Lawin IF, Laleye OAF, Agbani OP. 2016. Vulnérabilité et stratégies endogènes de conservation des plantes utilisées dans le traitement du diabète dans les communes de Glazoué et Savè au Centre-Bénin. *International Journal of Chemical and Biological Sciences*. 10(3): 1069-1085. doi : 10.4314/ijbcs.v10i3.14.
- Legg AK, Carr AJ, Bennett RJ, Johnston KA. 2017. General Aspects of Cheese Technology. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Netherland: Elsevier; p. 643-675. doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00026-0.
- Linares DM, Del Río B, Ladero V, Martínez N, Fernández M, Martín MC, Álvarez MA. 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*. Article 180. doi:10.3389/fmicb.2012.00180.
- Lindmark-Mansson H, Fondén R, Pettersson HE. 2003. Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal*. 13:409-425. doi:10.1016/S0958-6946(03)00032-3.

- Lock AL, Garnsworthy PC. 2002. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and delta9-desaturase activity in dairy cows. *Livestock Production Science*. 79:47-59. doi:10.1016/S0301-6226(02)00118-5.
- Loizzo MR, Menichini F, Picci N, Puoci F, Spizzirri UG, Restuccia D. 2013. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science and Technology*. 30(1):38–55. doi:10.1016/j.tifs.2012.11.005.
- Lopez C, Madec MN, Jimenez-Flores R. 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chemistry*. 120:22-33.
- Lucey JA. 2002. Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *Journal of Dairy Science*. 85:281–294.
- Madougou AM, Douny C, Moula N, Scippo M, Delcenserie V, Daube G, Hamani M, Korsak N. 2019. Survey on the presence of antibiotic residues in raw milk samples from six sites of the dairy pool of Niamey, Niger. *Veterinary World*. 12(12): 1970-1974.
- MAEP (Ministère de l’Agriculture de l’Elevage et de la Pêche). 2014. Etude des filières lait et viande, Rapport définitif sur la filière lait (PAFILAV). Cotonou : MAEP.
- MAEP (Ministère de l’Agriculture de l’Elevage et de la Pêche). 2017. Plan Stratégique de Développement du Secteur Agricole 2025. Cotonou : MAEP.
- MAEP (Ministère de l’Agriculture de l’Elevage et de la Pêche). 2007. Arrêté N° 0362/ MAEP/D-CAB/SGM/DRH/DP/SA du 30 octobre 2007 de fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en République du Bénin. Cotonou: MAEP.
- MAEP (Ministère de l’Agriculture de l’Elevage et de la Pêche). 2024. Arrêté N° 0362/ MAEP/D-CAB/SGM/DRH/DP/SA du 30 octobre 2007 de fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en République du Bénin. Cotonou: MAEP.
- Mama, D., B. Dimon, M. P. Aina, M. Adoukpe, J. Ahomadegbe, A. Youssao, A. Kouazoude, S. P. Kouanda, and M. Moudachirou. 2013. Transport urbain au Bénin et pollution atmosphérique: évaluation quantitative de certains polluants chimiques de Cotonou. *Int J Biol Chem Sci*. 7(1): 377-86. doi:10.4314/ijbcs.v7i1.33.
- Mamontova EA, Tarasova EN, Mamontov AA, Kuzmin MI, McLachlan MS, Khomutova MI. 2007. The influence of soil contamination on the concentrations of PCBs in milk in Siberia. *Chemosphere*. 67(9):71-8. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.05.092.
- Markiewicz-Kęszycka M, Czyżak-Runowska G, Lipińska P, Wójtowski J. 2013. Fatty acid profile of milk - a review. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 57:135-139. doi: 10.2478/bvip-2013-0026.

- Mattiello S, Caroprese M, Matteo CG, Fortina R, Martini A, Martini M, Parisi G, Russo C, Zecchinia M. 2018. Typical dairy products in Africa from local animal resources. *Italian Journal of Animal Science*. 15(19):740-754. doi:10.1080/1828051X.2017.1401910.
- Mazorra-Manzano MA, Moreno-Hernández JM, Ramírez-Suarez JC. 2018. Milk-clotting plant proteases for cheesemaking. In: Guevara MG, Daleo GR, editors. *Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes*. Switzerland: Springer Nature; p. 21-41.
- Mazou M, Tchobo P, Degnon G, Mensah A, Soumanou MM. 2012. Effect of temperature and salt on the quality of Waragashi during storage in Benin Republic. *African Journal of Food Science*. 6 (20): 494-499.
- McSweeney PLH, Ottogalli G, Fox PF. 2017. Diversity and classification of cheese varieties: an overview. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fourth Edition. San Diego: Academic Press; p. 781-804. doi: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00031-4.
- Meade SJ, Reid EA, Gerrard JA. 2005. The impact of processing on the nutritional quality of food proteins. *Journal of AOAC International*. 88(3):904-922.
- Mensah SEP, Aboh AB, Salifou S, Mensah GA, Sanders P, Abiola FA, Koudandé OD. 2014a. Risques dus aux résidus d'antibiotiques détectés dans le lait de vache produit dans le Centre Bénin. *Journal of Applied Bioscience*. 80 :7102-7112.
- Mensah SEP, Koudandé OD, Sanders P, Laurentie M, Mensah GA, Abiola FA. 2014c. Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique: risques de santé publique. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*. 33 (3):975-986.
- Mensah SEP, Laurentie M, Salifou S, Sanders P, Mensah GA, Abiola FA, Koudandé OD. 2014b. Usage des antibiotiques par les éleveurs bovins au centre du Bénin, quels risques pour la santé publique ? *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin*. 75:1-16.
- Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D. 2013. Introduction. In: Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D, editors. *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome: FAO; p.1-10.
- N'Diaye A. 2006. Le lait dans les stratégies de diversification des revenus des agropasteurs de la région de Fatick. [Mémoire d'Ingénieur Agronome]. Thiès : Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture.
- Nudda A, McGuire MA, Battacone G, Pulina G. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and ricotta. *Journal of Dairy Science*. 88(4):1311-1319. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72797-1.
- O'Donnell-Megaró AM, Barbano DM, Bauman DE. 2011. Survey of the fatty acid composition of retail milk in the United States including regional and seasonal variations. *Journal of Dairy Science*. 94:59-65. doi:10.3168/jds.2010-3571.

- Obeng-Gyasi E. 2022. Sources of lead exposure in West Africa. *Science*. 4, 33. doi :10.3390/sci4030033.
- Okry F, Chogou SK, Fanou-Fogny N, Moumouni F, Hounhouigan J. 2017. Local governance of a dairy sector in Benin republic: actors, roles, power relationships and perception of interdependency. *Asian Journal of Agricultural Extension, Economics and Sociology*. 21(4):1-14.
- Olatoye IO, Daniel OF, Ishola SA. 2016. Screening of antibiotics and chemical analysis of penicillin residue in fresh milk and traditional dairy products in Oyo state, Nigeria. *Veterinary World*. 9(9): 948-954.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). 2020. Rapport annuel OMS Bénin. Cotonou: Bénin.
- Panthi RR, Jordan KN, Kelly AL, Sheehan J.J. 2017. Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Netherland: Elsevier; p. 23-50. doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00002-8.
- Pereira PC. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 30:619-627. doi:10.1016/j.nut.2013.10.011.
- Rayanatou IA. 2017. Étude de la coagulation du lait par l'extrait de feuilles de *Calotropis procera* en réponse au contexte laitier dans la région de Maradi, au Niger. [Thèse de doctorat]. Bretagne : Université Bretagne Loire Agro Campus Ouest.
- Rayanatou IA. 2017. Étude de la coagulation du lait par l'extrait de feuilles de *Calotropis procera* en réponse au contexte laitier dans la région de Maradi, au Niger. [Thèse de doctorat]. Bretagne : Université Bretagne Loire Agro Campus Ouest.
- Roeder RA, Garber MJ, Schelling GT. 1998. Assessment of dioxins in foods from animal origins. *Journal of Animal Science*. 76 (1):142–151. doi:10.2527/1998.761142x.
- Rusin M, Dziubanek G, Marchwińska-Wyrwałb E, Ćwieląg-Drabeka M, Razzaghić M, Piekut A. 2019. PCDDs, PCDFs and PCBs in locally produced foods as health risk factors in Silesia Province, Poland. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 172(15):128-135. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.052.
- Sabi BP. 2004. Gestion pastorale de la vallée du fleuve Niger pour la production laitière. [Mémoire d'Ingénieur Agronome]. Abomey-Calavi : Université d'Abomey- Calavi.
- Saegerman C, Berkvens D. 2006. Introduction. In Huyghebaert A, Houins G, editors. *Application de l'évaluation des risques dans la chaîne alimentaire*. Bruxelles : Sci Com ; p. 7-13.
- Samková E, Špička J, Pešek M, Pelikánová T, Hanuš O. 2012. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science*. 42(2):83-100. doi:10.4314/sajas.v42i2.1.

- Schwendel BH, Wester TJ, Morel PCH, Tavendale MH, Deadman C, Shadbolt NM, Otter DE. 2015. Invited review: Organic and conventionally produced milk-An evaluation of factors influencing milk composition. *Journal of Dairy Science*. 98 :721–746. doi : 10.3168/jds.2014-8389.
- Senou M, Toléba SS, Adandédjan C, Poivey JP, Ahissou A, Touré FZ, Monsia C. 2008. Increased Milk Yield in Borgou Cows in Alternative Feeding Systems. *Revue d'Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux*. 61(2) :109-114.
- Sessou P, Boko C, Hounmanou G, Osseni SD, Hounkpe E, Azokpota P, Youssao I, Sohounhloue D, Farougou S. 2016. Preservation of traditional cheese wagashi using essential oils: impact on microbiological, physico-chemical and sensorial characteristics. *British Microbiology Research Journal*. 15(4):1-13. doi: 10.9734/BMRJ/2016/27536.
- Sessou P, Farougou S, Azokpota P, Youssao I, Yèhouenou B, Ahounou S, Sohounhloué DCK. 2013a. Endogenous methods for preservation of Wagashi, a Beninese traditional cheese. *African Journal of Agricultural Research*. 8 :4254-4261. doi : 10.5897/AJAR2013.6908.
- Sessou P, Farougou S, Yèhouenou B, Agbangnan P, Azokpota P, Issaka Y, Sohounhloue D. 2013b. Investigation on aflatoxin M1 content of traditional cheese wagashi produced in Benin. *African Journal of Food Science and Technology*. 4(4):76-79.
- Sessou P. 2013. Valorisation du fromage Peuhl Wagashi Gassiré au Bénin : Pratiques endogènes de conservation, screening des moisissures de contamination et perspectives de lutte biologique. [Thèse de doctorat]. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Shah MA, Mir SA, Paray MA. 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking : a review. *Dairy Science and Technology*. 94:5–16. doi: 10.1007/s13594-013-0144-3.
- Soulé AH. 2015. Analyse du système de production de lait dans les élevages bovins et fonctionnement des mini-laiteries installées au nord-bénin. [Thèse de doctorat]. Abomey-Calavi : Université d'Abomey-Calavi.
- Spizzirri UG, Restuccia D, Curcio M, Parisi OI, Iemma F, Picci N. 2013. Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector. *Journal of Food Composition and Analysis*. 29:43-51.
- Stratton JE, Hutkins RW, Taylor SL. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*. 54 :460-470.
- Tchobo PF, Ahouannou C, Amegnon NA, Mazou M, Alitonou AG, Sohounhloue DCK, Soumanou MM. 2014. Physico-chemical and microbiological characteristics of dried wagashi. *African Journal of Food Science*. 8(8):447-455. doi: 10.5897/AJFS2013.1103.
- Tyasi TL, Gxasheka M, Tlabela CP. 2015. Assessing the effect of nutrition on milk composition of dairy cows: A review. *International Journal of Current Science*. 17:56-63.

- Udomkun P, Wiredu AN, Nagle M, Bandyopadhyay R, Müller J, Vanlauwe B. 2017. Mycotoxins in Sub-Saharan Africa: Present situation, socio economic impact, awareness, and outlook. *Food Control*. 72:110-122.
- Uzeh RE, Ohenhen RE, Rojugboka AK. 2006. Microbiological and nutritional qualities of dairy products: nono and wara. *Nature Science*. 4(3):37–40.
- Vaccher V, Ingenbleek L, Adegboye A, Hossoud ES, Konée AZ, Oyedele AD, Kisito CSKJ, Dembélé YK, Huh R, Malaka IA, et al. 2020. Levels of persistent organic pollutants (POPs) in foods from the first regional Sub-Saharan Africa total diet study. *Environment International*. 135: 105413. doi:10.1016/j.envint.2019.105413.
- Visciano P, Schirone M, Tofalo R, Suzzi G. 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. *Frontiers in Microbiology*. Article 188. doi: 10.3389/fmicb.2012.00188.
- Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. 2013. Milk and dairy product composition. In: Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D, editors. *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome: FAO; p. 41-102.
- WPR (World Population Review). 2024. Milk Consumption by Country 2024. <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/milk-consumption-by-country>. Assessed 12 march 2024.
- Yaokorin Y. 2007. Influence de la période de mise-bas sur la production laitière. [Mémoire d'Ingénieur agronome]. Lomé : Université de Lomé.
- Youssao AKI, Dahouda M, Attakpa EY, Koutinhoun GB, Ahounou GS, Toleba SS, Balogoun BS. 2013. Diversité des systèmes d'élevages de bovins de race bovine Borgou dans la zone soudanienne du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 7(1): 125-146.
- Zinedine A, Salah-Abbes JB, Tantaoui-Elaraki SA. 2021. Aflatoxin M1 in Africa: exposure assessment, regulations, and prevention strategies – a review. In : de Voogt P, editor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Switzerland: Springer Nature; p. 73-108. doi:10.1007/398_2021_73.

Annexe : Valorisation des résultats de recherche

✓ Liste des articles publiés

Dossou WA, Seko Orou BMT, Komagbe G, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, Madode YE, Douny C, Scippo ML, Clinquart A, Azokpota P. 2022. **Processing and preservation methods of Wagashi Gassirè, a traditional cheese produced in Benin**. *Heliyon*. 8, Article e10605. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e10605.

Dossou WA, Komagbe G, Seko Orou BMT, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, Boutaleb S, Gobert S, Madode YE, Azokpota P, Clinquart A, Scippo ML, Douny C. 2024. **Nutritional composition and chemical safety of Wagashi Gassirè cheese sold in the southern Benin markets**. *Dairy*. 5(2):271-286. doi:10.3390/dairy5020022.

Komagbe GS, **Dossou WA**, Seko Orou BM-T, Sessou P, Azokpota P, Youssao I, Hounhouigan J, Scippo M-L, Clinquart A, Mahillon J and Farougou S. 2023. **State of the art of breeding, milking, and milk processing for the production of curdled milk and Wagashi Gassirè in Benin: Practices favoring the contamination of its dairy products**. *Frontiers in Sustainable Food System*. 6:1050592. doi: 10.3389/fsufs.2022.1050592.

Seko Orou BMT, Komagbe G, **Dossou WA**, Benon Monra A, Farougou S, Clinquart A, Poncelet M, Mongbo RL. 2023. **Fulani cheese “Wagashi gassire” market tested by covid-19 in Benin**. *American Journal of Humanities and Social Sciences Research*. 7(7):121-130.

✓ Liste des articles soumis pour publication

Dossou WA, Komagbe G, Seko Orou BMT, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, Boutaleb S, Gobert S, Madode YE, Azokpota P, Clinquart A, Scippo ML, Douny C. **Physicochemical characteristics, nutritional composition, and chemical hazards content of Wagashi Gassirè cheese from Benin: seasonal and regional variation**.

✓ Liste des projets d'articles

Dossou WA, Komagbe G, Seko Orou BMT, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, Boutaleb S, Gobert S, Madode YE, Azokpota P, Clinquart A, Scippo ML, Douny C. **Physicochemical characteristics, nutritional composition, and chemical hazards content of Wagashi Gassirè cheese from three processing methods**.

Dossou WA, Komagbe G, Seko Orou BMT, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, Boutaleb S, Gobert S, Madode YE, Azokpota P, Clinquart

A, Scippo ML, Douny C. **Optimisation des conditions de coagulation du lait lors de la production du fromage Peulh Wagashi Gassirè au Bénin.**

Dossou WA, Komagbe G, Seko Orou BMT, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, Boutaleb S, Gobert S, Madode YE, Azokpota P, Clinquart A, Scippo ML, Douny C. **Combined effect of steam cooking and vacuum packaging on the shelf life of Wagashi Gassirè cheese produced in Benin.**

✓ **Communications orales**

Dossou A, Douny C, Madode Y, Scippo ML, Azokpota P, Clinquart A. 2020. **Estimation of lead exposure of consumers of Wagashi Gassire (Peulh cheese) from southern Benin.** 7th Farah-day, Liège (Belgium), 20 November 2020, Proceeding p 22. Journées scientifiques de l'Institut Régional de Santé Publique (IRSP) du Bénin, 4^{ème} édition, Ouidah (Benin), 3-4 décembre 2020.

Dossou A, Douny C, Gobert S, Madode Y, Scippo ML, Azokpota P, Farougou S, Clinquart A. 2021. **Estimation of lead and arsenic exposure of Peulh cheese consumers from southern Benin.** Journées scientifiques du Centre Béninois de Recherche Scientifique et d'Innovation (CBRSI), 10^{ème} édition, Cotonou (Benin), 28-30 juin 2021. Colloque International du Centre Suisse de Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire (CSRS), 9-11 septembre 2021. Journées scientifiques du Conseil Africain et Malgache pour l'Enseignement Supérieur (CAMES), 5^{ème} édition, Dakar (Sénégal), 6-9 décembre 2021, Proceeding p 125.

Dossou A, Douny C, Madode Y, Azokpota P, Farougou S, Boutaleb S, Scippo ML, Clinquart A. 2021. **Seasonal variation of aflatoxin M1 in raw milk from Benin with an emphasis on risk assessment of human exposure.** Doctoriales de l'Ecole Doctorale des Sciences Agronomiques et de l'Eau de l'Université de Parakou (EDSAE-UP), 3^{ème} édition, 10-12 novembre 2021. Symposium International sur la Science et la Technologie (SIST), 4^{ème} édition, 15-19 novembre 2021. Journées scientifiques de l'Université de Degoudou (JS-UDDG), 1^{ère} édition, Degoudou (Burkina-Faso), 12-14 janvier 2022. Doctoriales Multidisciplinaires de l'Université d'Abomey-Calavi, 2^{ème} édition, Abomey-Calavi (Bénin), 25-28 septembre 2023. Colloque des Sciences Cultures et Technologies de l'Université d'Abomey-Calavi, 8^{ème} édition, Abomey-Calavi (Bénin), 25-28 septembre 2023.

Dossou WA, Seko Orou BMT, Komagbe G, Sessou P, Issaka YAKI, Farougou S, Hounhouigan DJ, Mahillon J, Mongbo R, Poncelet M, Madode YE, Douny C, Scippo ML, Clinquart A, Azokpota P. 2022. **Processing and preservation methods of Wagashi Gassirè, a traditional cheese produced in Benin.** Doctoriales Multidisciplinaires de l'Université d'Abomey-Calavi, 1^{ère} édition, Abomey-Calavi (Bénin), 7-9 novembre 2022.

Dossou A. **Amélioration des procédés traditionnels de production et de conservation du lait caillé et du Wagashi Gassirè au Bénin.** Doctoriales de l'Université Abdou Moumouni de Niamey. 8-10 décembre 2021, Niamey (Niger).

Dossou A, Madode Y, Sessou P, Azokpota P, Farougou S. 2023. **Stabilisation et conservation du Wagashi Gassirè : état des lieux et avancées des chercheurs et des praticiens**. Atelier de capitalisation des expériences de certification et/ou labellisation du fromage Gassirè Wagashi du Centre Africain pour le Développement Équitable (ACED), 20 octobre 2023, Cotonou (Bénin).

Dossou A, Madode Y, Douny C, Farougou S, Scippo ML, Clinquart A, Azokpota P. **Optimal conditions of milk coagulation during Peulh cheese Wagashi Gassirè production in Benin**. Symposium sur la recherche agricole en Afrique de l'Ouest et du Centre du Conseil Ouest et Centre Africain pour la Recherche et le Développement Agricoles (CORAF), 2^{ème} édition, 21-23 novembre 2023, Loé (Togo).

✓ **Posters**

Dossou A, Komagbe G, Madode Y, Sessou P, Mahillon J, Scippo ML, Azokpota P, Clinquart A. 2019. **Physico-chemical and technological assessment of curdled milk and Wagashi Gassire cheese from traditional processes in northern Benin**. 6th Farah-day, Liège (Belgium), 8 November 2019, Proceeding p 43. BIOFORUM, Liège (Belgium), 29 November 2019.

Dossou A, Douny C, Gobert S, Madode Y, Scippo ML, Azokpota P, Farougou S, Clinquart A. 2020. **Estimation of lead and arsenic exposure of Peulh cheese consumers from southern Benin**. Young reserchers's overseas day, 15th December 2020, Brussels (Belgium).

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2024/0480/13

ISBN 978-2-87543-218-6

