

التيروهمجد تيرنازجلا تيطارقميدلا تيبعثلا
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
قرازو ميلعتلا يلاعلنا ثحبلاو يملعلا

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA BOUMERDES
DEPARTEMENT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

En vue de l'obtention du diplôme

De MASTER en GENIE DES PROCEDES

Option : Qualité et conservation des aliments

THEME

Extraction, purification et caractérisation d'une enzyme protéolytique issue de caillettes de bovins adultes. Aptitudes technologiques des extraits

Soutenu le : 22 Juin 2017

par : BOUCETTA Sabrina
BOUBRIT Soumeiya

Jury de soutenance :

Présidente	: M ^{me} TALANTIKITE S.	MCB (UMBB)
Promoteur	: M ^r . NOUANI A.	Pr. (UMBB)
Examinatrices	: Mme YELLES F.	MAA (UMBB)
	: M ^{me} BENMALEK N.	MAA (UMBB)

Promotion 2017

Remerciements

Avant tout nous remercions « ALLAH » le tous puissant, de nous avoir ouvert les portes du savoir et qui sans lui ce travail ne serait jamais réalisé.

Nous tenons à exprimer nos essentiels remerciements à nos parents pour leur éternel et inconditionnel soutien, toujours présents de notre naissance à ce jour.

Nos grands remerciements à Mr **NOUANI Abdelouahab**, notre encadreur pour sa générosité et l'aide nécessaire qu'il nous a apportées et nous a dirigé dans ce travail et qui nous avons prodigué ses conseils et ses orientations.

Notre profonde gratitude aux membres du jury qui vont juger ce travail.

Madame **Talantikite Souad** , présidente de ce jury

Madame **Yelles Fouzia** , examinatrice

Madame **Benmalek Nabila**, examinatrice

des enseignantes du département de technologie alimentaire, a qui nous leur devons un profond respect pour le savoir qu'ils nous ont transmis tout au long de leur carrière.

Un grand remerciement a Mr **Sabaoui Khaled**, responsable du laboratoire d'analyse de *l'entreprise FAIZ* pour ses précieux conseils, son dévouement sans limite pour les étudiants de notre département et son aide dans les applications technologiques. Merci Mr **SABAOUI**.

Enfin, que tous ceux, de loin comme de près, ont contribué à l'élaboration de ce mémoire trouvent ici l'expression de nos remerciements.

BOUCETTA Sabrina

BOUBRIT Soumeya

de la promotion Master MQCA 2015/2017

Résumé

Le lait de vache est un produit noble qui présente une grande valeur nutritionnelle. Il est utilisé dans les industries fromagères grâce à ces fortes aptitudes de coagulation.

L'objectif de notre travail est de valoriser des caillottes de bovin adulte destinées à l'abattage par l'isolement des extraits de pepsine destinés à la coagulation du lait.

L'obtention des extraits enzymatiques coagulants a été effectuée selon la méthode de **VALLES et FURET**, possédant une activité coagulante importante de 1697, une activité protéolytique de 0,68 et un taux de protéine de 23.68mg/ml

L'EEB obtenu a été prépurifié par une ultrafiltration avec un Cut off de 10 kDa. L'extrait obtenu est caractérisé par une activité coagulante de 1086 US, une activité protéolytique de 0.53 et un taux de protéine de 40 mg/ml.

L'influence de certains paramètres, pH du lait, température, concentration en enzyme et concentration en CaCl_2 a été étudiée. L'influence des effecteurs confirme l'appartenance des pepsines dans le groupe des aspartyl protéases. Par ailleurs, la purification sur G75 a élué une seule fraction dotée d'activité coagulante caractérisée par un PM égal à 35 kDa.

L'évaluation des propriétés sensorielles de la pâte de fromage par un jury de paneliste a montré une similitude dans la qualité du produit avec une pâte ferme, un bon aspect visuel et une texture très appréciée au tranchage.

Mot clé : coagulation, lait, fromage, enzyme, purification, aspartyle

ملخص

يعتبر حليب البقر غذاء ذو قيمة غذائية عالية يستعمل في صناعة الجبن بسبب قوة التثخن

الهدف من دراستنا هو تقييم معدة البقر من اجل استخراج إنزيمات تستعمل في صناعة الجبن

الإنزيم المستخلص الخام له قوة التثخن كبيرة قيمتها 1697 غني بالبروتينات 23.68 مغ مل

مر هذا الإنزيم بعدة مراحل من اجل تنقيته من الشوائب مع دراسة تأثير عدة عوامل مثل تأثير الحموضة تأثير تركيز

الإنزيم تأثير تركيز كلور الكالسيوم و تأثير الحرارة

الكلمات المفتاحية الحليب التثخن إنزيم الحموضة

Liste des tableaux

Tableau N°01 : Principales différences entre la chymosine A, B et C (Lilla 2005 ; Rampilli 2005 ; Harboe et al, 2010).....	04
Tableau N°2 : Origine des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait (Mietton et al 1994).....	05
Tableau N°3 : La composition des micelles du lait de vache (Vierling 1999).....	09
Tableau N°4 : Principales caractéristiques des constituants majeurs de la caséine de vache (Alais et Linden 1994	10
Tableau N°5 : Caractéristique d'extrait brut de la pepsine bovine.....	35
Tableau N°6 : caractéristique de l'extrait enzymatique ultrafiltré.....	38
Tableau N°7 : Bilan de purification d l'extrait coagulant de la pepsine bovine	49
Tableau N°8: Détermination du poids moléculaire des protéines standards.....	51
Tableau N°9 : Analyse physico-chimique de la pate de fromage	52
Tableau 10 : Résultats des analyse sensoriel du fromage après tranchage	53

LISTE DES FIGURES

Figure N°1 : Modèle de micelle de caséine avec sous unités κ (Amiot et al 2002).....	11
Figure N°2 : Modification de la structure micellaire au cours de l'acidification (Jeantet 2007).....	13
Figure N°3 : Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation présure (Jeantet, 2007).....	14
Figure N°4 : Mécanisme de la coagulation du lait par la présure ((Garnier et al., 1968 ; Alais, 1984)).....	16
Figure N°5 : Caillette de bovin.....	21
Figure N°6 : Caillette de bovin découpé avant congélation.....	22
Figure N°7 : Extraction des enzymes à partir de caillette bovine (Valles et Furet 1977).....	23
Figure N° 8 : Dispositif d'ultrafiltration de laboratoire.....	26
Figure N°9: Schéma du dispositif d'ultrafiltration.....	27
Figure N°10: Dispositif du Système de chromatographie basse pression sur colonne G75 et spectrophotomètre UV-Vis pour la lecture à 280nm des fractions éluées.....	30
Figure N°11 : Droite d'étalonnage du log PM des standards protéiques.....	31
Figure N°12 : Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique ultrafiltré.....	39
Figure N°13 : Effet de température du lait sur activité coagulante de l'extrait enzymatique ultrafiltré.....	40
Figure N°14: Effet de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique ultrafiltré	41
Figure N°15 : Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante sur l'extrait enzymatique ultrafiltré.....	42
Figure N°16 : Effet de quelque Effecteur sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques de la caillette de bovins adultes.....	43
Figure N°17 : Influence de la température sur la stabilité de l'extrait enzymatique ultrafiltré.....	44

Liste des figures

Figure N°18 : Stabilité de l'extrait enzymatique ultrafiltre de au cours de sa conservation à température ambiante.....	45
Figure N°19 : Stabilité de l'extrait enzymatique ultrafiltre au cours de sa conservation à + 4° C	46
Figure N°20 : Stabilité de l'extrait enzymatique ultrafiltre au cours de sa conservation à -18 C °	47
Figure N°21 : Profil chromatographique d'EEUF sur gel séphadex G-75 de l'extrait enzymatique brut	48
Figure N°22: Profil d'élution sur Sephadex G-75 des protéines standards.....	50
Figure N°23 : Aspect et texture des pate de fromage témoin et expérimentale.....	53
Figure N°24 : Histogramme d`analyse statistique des paramètres sensoriels (aspect et Texture de la pate) au seuil de probabilité de 5%. L`intervalle entre les traits pleins (Somme des rangs compris entre 8 et 13) indique une différence non significative.....	54

Liste des abréviations

AC: Activité Coagulante.

AP: Activité Protéolytique.

BSA: Bovine sérum albumine.

CMP: Caseinomacropéptide.

Da: Dalton.

DO: Densité Optique.

°D: Degré Doronic.

EDTA: Acide Ethyle Diamine Tétra Acétique.M

EEB: Extrait Enzymatique Brut.

EEUF: Extrait Enzymatique Ultrafiltré.

EEP: Extrait Enzymatique Purifié.

ET : Ecart Type

MM: Masse Moléculaire.

pHi: pH isoélectrique

TCA: TriChloroAcetic acid

US: Soxhlet

Table des matières

Table des matières

Introduction.....	01
Synthèse bibliographique	
I.1Chapitre I : Enzyme Coagulants	
I.1.1Présure.....	03
I.1.1.1Chymosine : (E.C.3.4.23.4)	03
I.1.1.2Pepsine (E.C. 3.4.23.1, 2,3).....	04
I.1.2succédanés de présure.....	06
I.1.2.1Succédanés de présure d'origine animale.....	07
I.1.2.2Succédanés de présure d'origine végétale.....	08
I.1.2.3Succédanés de présure d'origine microbienne	08
I.2Chapitre II : Caséines	
I.2.1Caséines	09
I.2.2Structure des caséines.....	10
I.2.3Caséine κ	11
I.3Chapitre III : Coagulation du lait	
I.3.1Coagulation du lait.....	12
I.3.2Type de coagulation.....	12
I.3.2.1Coagulation acide.....	12
I.3.2.2Coagulation enzymatique.....	13
I.3.2.3Coagulation mixte.....	14
I.3.3Mécanisme d'action de la coagulation.....	14
I.3.3.1Phase primaire.....	15
I.3.3.2Phase secondaire.....	15
I.3.3.3Phase tertiaire.....	15
I.3.4Facteurs influant la coagulation du lait.....	17
I.3.4.1Effet de la température.....	17
I.3.4.2Effet du pH du lait.....	17

Table des matières

I.3.4.3	Effet de la teneur en ions calcium (CaCl_2).....	17
I.3.4.4	Effet de la concentration en d'enzyme.....	17
I.4	Chapitre IV : Fromage	
I.4.1	Fromage.....	17
I.4.2	Les étapes de fabrication du fromage.....	18
I.4.2.1	Coagulation.....	19
I.4.2.2	Egouttage.....	19
I.4.2.3	Salage.....	19
I.4.2.4	Affinage.....	19

Matériel et méthodes

II.1	Matériel biologique.....	21
II.1.1	Caillette de bovin.....	21
II.2	Obtention de l'extrait coagulant	22
II.3	Extraction de L'enzyme brut.....	22
II.4	Etude de l'extrait brut	24
II.4.1	Activité coagulante.....	24
II.1.2	Activité protéolytique.....	24
II.4.3	Détermination de l'indice AC/AP.....	25
II.4.4	Dosage des protéines.....	25
II.5	Prépurification concentration des extraits enzymatiques	25
II.5.1	Ultrafiltration des extraits enzymatiques	25
II.5.2	Caractérisation de l'extrait pré-purifié.....	27
II.5.2.1	Effet du pH.	27
II.5.2.2	Effet de la température	28
II.5.2.3	Effet de la concentration en CaCl_2	28
II.5.2.4	Effet de concentration en enzyme.....	28
II.5.2.5	Effet de quelque effecteur de protéases sur l'activité de l'extrait enzymatique.....	28
II.5.2.6	Etude de la stabilité d'extrait enzymatique ultrafiltre :.....	28
II.5.2.6.1	Stabilité thermique	28
II.5.2.6.2	Stabilité par la conservation.....	28

Table des matières

II.6 Purification de l'extrait prépurifié par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75	29
II.6.1 Détermination du poids moléculaire	30
II.7 Aptitudes technologiques : Essai de fabrication d'une pate de fromage pressée.....	31
II.7.1 Procédé de fabrication	31
II.7.2 Etapes de la fabrication	32
II.3 Méthode analytiques.....	33
II.3.1 Analyse physicochimique.....	33
II.3.2 Rendement fromager.....	33
II.4 Aptitudes technologiques.....	33
II.4.1 Evaluation de la texture de la pate	33

Résultats et discussion

III. Résultat et discussion.....	35
III.1 Obtention de la condition d'extraction d'enzyme coagulante	35
III.2 Caractérisation de l'extrait brut	35
III.2.1 Activité coagulante	35
III.2.2 Indice AC/AP	36
III.2.3 Activité protéolytique.....	37
III.2.4 Détermination de taux de protéines de l'extrait enzymatique brut	37
III.3 Prépurification et concentration de l'extrait clarifié par ultrafiltration avec un cut of de 10 KDA	38
III.3.1 Caractérisation de l'extrait enzymatique ultrafiltré.....	39
III.3.1.1 Effet du pH du lait sur l'activité coagulante.....	39
III.3.1.2 Effet de la température du lait	40
III.3.1.3 Effet de la concentration de CaCl_2 du lait.....	41
III.3.1.4 Effet de la concentration en enzyme.....	42
III.3.1.5 Effet de quelques effecteurs sur l'activité de l'extrait enzymatique ultrafiltre	43
III.3.1.6.1 Stabilité thermique	43
III.3.1.6.2 Stabilité par la conservation	44

Table des matières

III.4 Purification d'extrait enzymatique ultrafiltre de pepsine bovine	48
III.4.1 Bilan de purification d'extrait coagulant de la pepsine bovine	49
III.4.2 Détermination du poids moléculaire de la pepsine bovine	50
III.5 Application fromagère : Essai de fabrication d'une pâte de fromage pressée à partir de lait de vache	52
III.5.1 Analyse physico-chimique de fromage	52
III.5.2 Rendement fromager.....	52
III.6. Aptitudes technologiques.....	53
III.6.1 Aspect et texture de la pâte de fromage.....	53
 Conclusion générale	
Conclusion générale.....	54

Introduction

Introduction

Dans les années 80, à l'heure de la crise d'approvisionnement en enzymes de coagulation du lait, seules la pepsine bovine et porcine présentaient un intérêt industriel suivi des enzymes d'origine microbienne. Les deux premières se sont révélées adéquates et sont, par conséquent, largement utilisées en fromagerie sous forme de mélange avec la présure. Mais depuis les deux dernières décades, cet engouement a été délaissé et la chymosine transgénique est devenu un substitut d'excellence.

Parmi les voies de substitution de la présure, la production d'enzymes coagulant le lait à partir de la culture microbienne, suscite un intérêt pour la fromagerie locale et dans le monde où plusieurs souches de microorganismes font l'objet de productions industrielles de protéases coagulantes. En Algérie, où quelques rares fromageries existent, la source de protéase coagulant le lait est certainement *Aspergillus niger var. awamori*, une enzyme probablement transgénique réglementée dans notre pays qui produit 100% de chymosine. Des études comparatives de cette enzyme avec la chymosine ont indiqué de grandes similarités dans le mécanisme de la coagulation du lait et plusieurs variétés de fromages préparées avec cet extrait sont semblables à ceux obtenus avec la présure traditionnelle.

Il est utile de rapporter que d'autres sources de protéases sont utilisées en fromagerie notamment celle d'origine végétale où plusieurs variétés de fromages nobles sont préparées à travers le monde. L'enzyme la plus connue est la *cardosine* obtenue à partir d'une macération de pistil du cardon (*Cynara cardunculus*).

Qu'en est-il des protéases d'origine animale aujourd'hui. La majorité des chercheurs se vantent à dire que les extraits issus des caillottes de ruminants ne sont plus attractifs suite aux pathologies qui affectent le cheptel bovin particulièrement celles dues à la maladie de la vache folle. Cependant, la déperdition aujourd'hui se fait sentir sur le plan économique où des volumes importants de protéases coagulant le lait (particulièrement la pepsine) ne sont pas valorisés. Cet état de fait a été encouragé par le développement du génie microbien et du génie génétique dans la production des enzymes d'origine microbienne bon marché. Toutefois, l'emploi de la pepsine bovine seule ou en synergie avec la pepsine porcine est toujours en vigueur dans certains fromages.

Introduction

En Algérie, comme cite plus haut, l'industrie naissante du fromage utilise essentiellement la source microbienne par des importations massives. C'est dans un esprit de recherche que nous intéresses à l'estomac de bovin adulte destiné à l'abattage pour produire des extraits à partir de la caillette destinés à la coagulation du lait. En effet, Dans une revue de la littérature, travaux rapportent que cette classe de protéases révèle dans leurs structures la présence de deux résidus aspartyles (Asp³² et Asp²¹⁵) au niveau de leurs sites actifs et le haut degré de similitude de structure confère à ces dernières des actions analogues sur les caséines des laits.

Pour rendre compte des résultats des travaux de notre recherche, le document traite essentiellement 3 chapitres :

1. **La synthèse bibliographique**, elle rapporte les travaux sur la présure de remplacement, le lait et les mécanismes d'action des enzymes coagulant le lait
2. **La méthodologie**, ce chapitre rapporte les méthodes ayant trait à la production, la caractérisation et l'étude de certaines propriétés des extraits enzymatiques
3. **Les résultats et discussion**, cette partie traite des résultats sur les propriétés biochimiques de l'extrait et un essai de fabrication d'une pâte de fromage pressée d'une analyse sensorielle portant particulièrement la texture et l'aspect de la pâte.

Synthèse bibliographique

I.1 Chapitre I : Enzyme Coagulants

I.1.1. Présure

La présure est une enzyme protéolytique, extrait de la quatrième poche de l'estomac (abomasum ou caillette) des jeunes ruminants nourris exclusivement au lait (avant sevrage) (**Eck et Gillis, 1997**).

La présure de veau est l'agent coagulant traditionnellement utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages (**Alais, 1984 ; Ramet, 1997**). Elle contient deux fractions actives, l'une majeure, constituée par la chymosine (80%) l'autre, mineure, par la pepsine (10 – 20%) (**Alais, 2003**).

I.1.1.1. Chymosine : (E.C.3.4.23.4)

La chymosine est sécrétée inactive sous forme de “pro-chymosine” dans la caillette, sous l'action de l'acidité provenant du suc gastrique, elle se transforme en “chymosine active” (**Goursaud, 1999**). C'est une protéase acide aspartate. Son poids moléculaire est de 30 700 Da. Elle est constituée d'une seule chaîne peptidique renfermant 323 acides aminés (**Foltmann, 1979**).

La prochymosine devient active sous l'action de l'acidité présente dans le milieu gastrique. a pH 4-5, elle est convertie en chymosine mature par coupure d'un pro-segment de 42 acides aminés N terminaux, tandis qu'à pH 2, elle subit un clivage d'un peptide de 27 acides aminés N-terminaux générant un intermédiaire actif appelé pseudo-chymosine de 338 acides aminés (37,4 kDa) **Pedersen et al, (1979) et Rictet et al, (1998)**. Ce dernier est stable à un pH inférieur à 3 ou supérieur à 6 mais à pH 4,5, il se transforme en chymosine (**Kumar et al, 2010**).

L'activité optimale de la chymosine est à pH 5,5 et à une température de 42°C. Il ya plusieurs configuration de la chymosine telle que : la chymosine A, la chymosine B, la chymosine C, les principales différences entre ces chymosine sont indiquer dans le tableau au dessous (**Tableau N°1**).

Partie I : Synthèse bibliographique

Tableau N°1 : Principales différences entre la chymosine A, B et C (LILLA et al, 2005 ; Rampilli et al, 2005 ; Harboe et al, 2010).

Propriétés	Chymosine A	Chymosine B	Chymosine C
Acides aminés différents	Acide aspartique en position 244	Glycine en position 244	Plusieurs acides aminés différents
MM	35,71 kDa	35,65 kDa	Non déterminé
pHi	4,44	4,57	4,60
Stabilité	Moins stable, facilement dégradable	Plus stable, difficilement dégradable	Plus stable, difficilement dégradable
Abondance dans la présure animale	Peu abondante	La plus abondante	Composant mineur
Activité	Activité coagulante 30% supérieure à celle de la chymosine B ; $\approx 290 \text{ IMCU mg}^{-1}$	La plus faible activité coagulante ; $\approx 223 \text{ IMCU mg}^{-1}$	Activité coagulante 65% supérieure à celle de la chymosine B ; $\approx 368 \text{ IMCU mg}^{-1}$

1.1.1.2.Pepsine (E.C. 3.4.23.1, 2,3)

La pepsine est une protéase acide sécrétée dans le sac gastrique de tous les mammifères après sevrage sous forme de précurseur inactif appelé pepsinogène d'un poids moléculaire de 42000 daltons. Contrairement à la chymosine, la pepsine a une activité plus élevée et une activité coagulante faible.

✓ Propriétés

La présure a deux propriétés importantes qui sont :

- ❖ Une activité élevée sur la caséine κ qui conduit à la déstabilisation micellaire au cours de la phase de coagulation.
- ❖ Une activité faible de protéolyse générale sur les différentes fractions caséiniques, qui intervient essentiellement pendant l'affinage du fromage.

Partie I : Synthèse bibliographique

Tableau N°2 : Origine des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait

Origine	Enzymes	
Animaux	Ruminants	Chymosine + pepsine
	• Veaux (*)	
	• Chevaux (*)	
	• Agneaux (*)	
	• Bovins adultes (*)	
	Monogastriques	
	• Porc	Pepsine + chymosine
Végétaux	• Oiseaux	Pepsine
	• Poulets	
		Pepsine
	• Figuier (suc)	Ficine
	• Ananas (tige)	Broméline
	• Chardon, artichaut	
	• Gaillet	
Moisissures	• Courge	
	• <i>Endothia parasitica</i> (*)	
	• <i>Mucor pusillus</i> (*)	Protéase
	• <i>Mucor miehei</i> (*)	Protéase
	• <i>Aspergillus niger</i>	Protéase
Levures		Chymosine "PVGG" **
	• <i>Kluyvermyces lactis</i>	Chymosine "PVGG" **
Bactéries	• <i>Escherichia coli</i>	Chymosine "PVGG" **
	• <i>Bacillus subtilis</i>	Subtiline "PVGG" **

* coagulants autorisés en France

** PVGG : préparée par voie de génie génétique

I.1.2. Succédanés de la présure

La présure traditionnelle telle que la chymosine est très utilisée dans les industries fromagères. La forte demande subit l'approvisionnement de la présure est plus difficile. Des travaux ont été lancés afin de trouver d'autres sources potentielles de protéase pour remplacer la présure nommée succédané de présure (**Nouani et al, 2009**)

Les enzymes coagulantes appelées aussi les succédanés de présure, ils sont classés en 3 catégories selon l'origine de l'enzyme :

- ❖ Succédanés de présure d'origine animale.
- ❖ Succédanés de présure d'origine végétale.
- ❖ Succédanés de présure d'origine microbienne.

Les succédanés de présure doivent représenter certains nombres de conditions pour pouvoir être utilisés :

- ❖ l'activité protéolytique doit être faible comparativement à l'activité coagulante.
- ❖ la spécificité protéolytique sur la β -caséine doit être faible, sinon l'amertume se produit dans le fromage (**Dalgleish, 1992 ; Fox et Kelly, 2004**).
- ❖ la pureté chimique et la qualité microbiologique doivent être élevées.
- ❖ le rendement fromager devrait être identique à celui de la présure (**Germonville, 2003**) et (**Mistry, 2012**).
- ❖ prix nettement inférieur à celui de la présure de veau (**Nouani et al, 2009**)

✓ *Caractéristique physico-chimique de succédanés de présure*

- ❖ Bonne solubilité dans l'eau : Celle-ci conditionne la répartition du produit et permet l'obtention d'une coagulation homogène dans toute la masse du lait.
- ❖ Une odeur et couleur faible ou nulle de façon à ne pas modifier l'aspect et les qualités organoleptiques du fromage.
- ❖ Un degré de pureté élevée, indispensable pour éviter divers accidents dus à la prolifération des micro-organismes indésirables ou à des activités d'enzymes contaminants.
- ❖ Absence de toxicité pour le consommateur.
- ❖ Activité antibiotique nulle de façon à ne pas perturber le développement des ferments lactiques au cours du processus d'élaboration du fromage.
- ❖ Activité protéolytique et lipolytique faible.

I.1.2.1. Succédanés de présure d'origine animale

I.1.2.1.1 Pepsine bovine (E.C.3.4.23.1)

Nommée aussi la pepsine A, elle provient de l'estomac d'animaux adultes, sa masse moléculaire est de 33370 Da et contient 313 acides aminés (**Graindy, 1978**), (**Fox, 1969**) et (**Mathieu, 1981.**). La pepsine bovine a une activité protéolytique proche de celle de la chymosine, cette activité dépend du pH du milieu, elle est généralement active dans des milieux acide ou le PH est de 1.5 à 2 et l'activité soit plus élevée (**Goursaud, 1992**). Par contre dans des milieux basique pH supérieure de 6.3, l'activité baisse rapidement et le lait ne coagule pas (**Eck et Gillis, 1997**). La pepsine bovine est destinée à la fabrication du Cheddar (**Shamsuzzuman et al, 1985**) et (**Cuvellier, 1999**).

D'après **Bengana, (2001)**, le remplacement de la présure par la pepsine bovine permet la fabrication de fromage à patte molle type Camembert.

I.1.2.1.2. Pepsine porcine

Nommée aussi la pepsine B, elle à une particularité plus limitée que la pepsine bovine et dégrade faiblement l'hémoglobine (**Linden et Humbert, 1991**). Elle est composée d'une seule chaîne polypeptidique de 321 résidus d'acides aminés et sa masse moléculaire est de 35000 Da (**Sepulveda et al, 1975**) et (**Kageyama et Takahashi, 1976**).

Le mélange de la pepsine porcine avec la présure permet la fabrication de fromage acide de bonne qualité (**Ramet, 1990**). Elle est utilisée aussi pour la fabrication des fromages à patte molle et à patte pressé non cuite grâce à l'application des traitements de correction (augmentation du T °C de maturation, de la concentration en CaCl₂).

I.1.2.1.3. Pepsine gastrique

Nommée aussi pepsine C, elle à une forte activité vis-à-vis l'hémoglobine (**Linden et Humbert, 1991**). Elle est extrait de proventricule de poulet utilisé pour la fabrication du fromage à patte molle, les résultats obtenue sont comparer avec un fromage faite par la présure confirme qu'il ya aucune déférence dans le rendement et la qualité du fromage. D'après l'étude de **Morsli, (1996)**.

Cette pepsine à été utilisé en Israël pour la fabrication des fromages locaux d'après (**Cuvellier, 1999**). Récemment en Turquie les travaux en été reprise (**Hasan Temiz, 2009**).

I.1.2.2.Succédanés de présure d'origine végétale

Des travaux très récents menés sur des substrats de plantes ont été publiés montrant le nouvel intérêt que suscite les protéases d'origine végétale (**Egito et al ; 2007;Tejada et al., 2008; Chazarra et al., 2007; Pereira et al., 2008**). Il existe plusieurs préparations coagulantes issues de règne végétale et sont extraite par macération de différente partie de plante supérieure (**Eck et Gillis, 1997**).

Parmi les espaces connues de climat tempéré on peut citer : le gaillet, l'artichaut et le chardon (**Rao et al, 1998 ; Sousa et Malkata, 2005 ; Silva et Malkata, 2005**).

Actuellement la tendance tans vers les coagulants végétaux grâce à la disponibilité de matériel végétale et la forte stabilité de coagulase (**Nadhour et Belloul, 2003**) cet extrait présente un bonne potentiel coagulant dans l'industrie fromager.

I.1.2.3.Succédanés de présure d'origine microbienne

Plusieurs protéases d'origine microbienne on été utilisé dans la fabrication du fromage car ils ont le même fonctionnement que celle de la chymosine. Elles sont produites par fermentation. Elle présente des inconvénients telle que une grande activité protéolytique, un rendement faible dans la fabrication fromagère (**Harboe et al, 2010**).

Parmi les espèces microbiennes utilisées pour la fabrication à grande échelle sont : *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Cryphonectria parasitica* (**Claverie-Martin et Vega-Hernànndez, 2007**). D'après (**Chitpinityol et Crabbe, 1998 et Germonville ; 2003**) la protéase aspartique produite par *Rhizomucor miehei* est la plus utilisé dans les industries fromagère. En Algérie une protéase transgénique d'origine microbienne *Aspergillus niger var. awamori* est actuellement utilise par les fromagers dans la coagulation du lait.

I.2Chapitre II : Caséines

I.2.1.Caséines

Elles représentent 80 % des protéines du lait. Ce sont elles qui constituent le coagulum qui donnera naissance, après égouttage et maturation, au fromage.

Les protéines du lait peuvent être réparties en deux catégories :

- ❖ les caséines (insoluble à pH 4.6)
- ❖ les protéines du lactosérum (soluble à pH4.6).

L'appellation caséine regroupe en fait quatre protéines majeures : les caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ et des protéines mineures (existant en plus faible quantité) ainsi que des composants issus de l'hydrolyse de la caséine β par la plasmin (γ caséines et protéase-peptones).

La micelle de caséine est une particule sphérique d'un diamètre de 30 à 300nm (**Mahaut et al, 2000**).

Toutes les micelles n'ont pas les mêmes dimensions mais la même composition. Les grosses micelles ont une charge minérale plus élevés et des proportions relatives de caséine β et κ plus faible que les petites. (**Brule et al, 1997**).

Tableau N°3 : La composition des micelles du lait de vache. (Vierling, 1999).

Constituants	%
Caséine	94
Calcium	2,9
Magnésium	0,1
Phosphore organique	0,8
Phosphore inorganique	1,4
Citrate (en acide citrique)	0,5

Partie I : Synthèse bibliographique

Caractéristiques des constituants majeurs de la caséine de vache :

Tableau N°4 : Principales caractéristiques des constituants majeurs de la caséine de vache (Alais et Linden, 1994) * Données pour les variantes α_s -B, α_{s2} -A, β -A₂, κ -B et γ -A₂

Caséines	α_{s1}	α_{s2}	β	κ	γ
Proportion moyenne en p. cent	36	10	34	13	3
Poids moléculaire (Da)	23600	25250	24000	19000	21000
Résidus d'acides aminés *	199	207	209	169	181
Phosphore (p. cent)	1.10	1.23-1.60	0.56	0.2	0.16
Glucides (p. cent)	0	0	0	5	0
Résidus cystéine*	0	2	0	220	0
Proline	17	10	35	0	34
Sensibilité au calcium	++	+++	+	+++	?
Sensibilité à la chymosine	+	-	+	A ; B	-
Variants génétiques	A ; B ;	A ; B ; D	A ₁ ; A ₂ ; A ₃ ;	5.30	A ₁ ; A ₂ ;
Hydrophobicité (en KJ)	C ; D	4.64	B ; C ; E	18	A ₃ ; B
Groupes acides (Asp + Glu + Px2)	4.89	49-55	5.66	17	-
Groupes basiques (Lys + Arg + His)	48 25	33	31 20		16 16

1.2.2. Structure des caséines

Jusqu'à maintenant, on a proposé différents modèles structuraux de micelles et il semble clair que les micelles sont formées de sous-micelles reliées ensemble par des ponts phosphate de calcium. Les sous-micelles périphériques sont plus hydrophiles et contiennent une plus grande proportion de κ -caséine.

La constitution de la micelle de caséine est différente au centre et en périphérie. Les caséines β et α_{s1} sont plus présentes au centre de la micelle et forment le cœur hydrophobe, tandis que la partie externe de la micelle est formée de caséines α_{s1} , α_{s2} et κ (Amiot et al ; 2002) (Figure N°1)

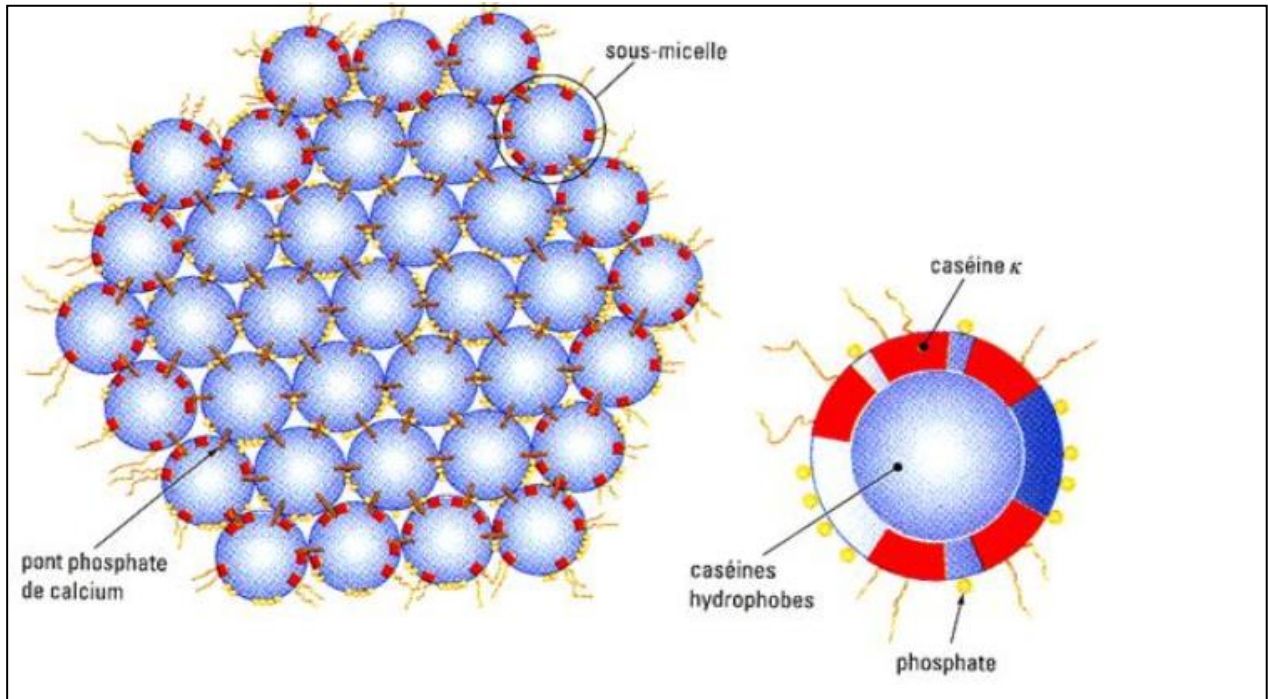


Figure N°1 : modèle de micelle de caséine avec sous unités κ (Amiot et al ; 2002).

I.2.3.Caséine κ

Une grande majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure. Cette caséine est insensible au Ca^{2+} et stabilise les autres caséines phosphorylées vis-à-vis de ce cation. La coagulation du lait se fait suite à la protéolyse de cette caséine par la présure qui scinde la molécule en deux parties : la partie N-terminale ou paracaséine κ (1-105) et le fragment C-terminale ou caséineomacropéptide (CMP : 106-169) aux propriétés très contrastées.

A pH 7 :

- ❖ le CMP possède une charge électrique négative et hydrophile.
- ❖ la paracaséine κ possède une charge électrique positive et hydrophobe.

Dans le caillé, seules sont récupérées les caséines α_{s1} , α_{s2} , β , et paracaséine κ tandis que le CMP se retrouve dans le lactosérum (**Debry, 2001**)

I.3 Chapitre III : Coagulation du lait

I.3.1. Coagulation du lait

❖ Définition

La coagulation du lait est une étape importante dans la préparation du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé. On distingue deux types de coagulation : la coagulation acide et la coagulation enzymatique. Cependant, en fromagerie, la coagulation du lait résulte le plus souvent de l'action combinée d'une enzyme et de l'acidification, seule varie l'importance relative de leur action coagulante respective.

I.3.2. Type de coagulation

I.3.2.1. Coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ($pH_i = 4,6$) soit :

- ❖ par acidification biologique à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains) **(Mahaut et al, 2005)**.
- ❖ par acidification chimique (injection de CO_2 addition de gluconodelta lactone) **(Mahaut et al, 2000)**.

Le gel formé présente une perméabilité satisfaisante, mais une friabilité élevée avec une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau. **(Figure N°2)**.

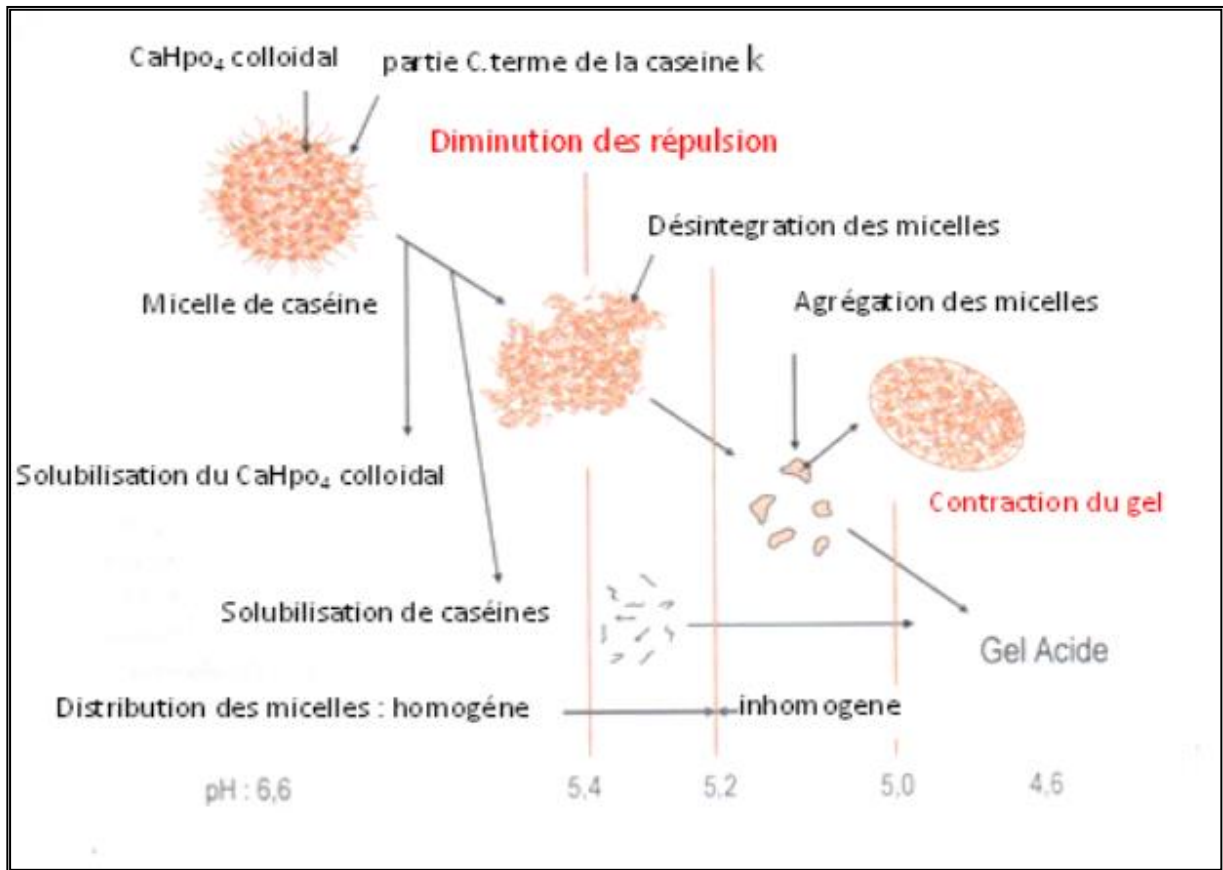


Figure N°2 : Modification de la structure micellaire au cours de l'acidification (Jeantet, 2007).

I.3.2.2. Coagulation enzymatique

Il s'agit de l'action de la présure (plus précisément de la chymosine) qui va hydrolyser préférentiellement la caséine κ en un site préférentiel de coupure. **(Figure N°3)**

La coagulation de type présure a généralement lieu pour des pH compris entre 6.2 et 6.7 : pH pour lesquels la déminéralisation de la micelle est nulle ou faible. Dans ces conditions, la structure de la micelle est stabilisée. **(Lenoir et al, 1985).**

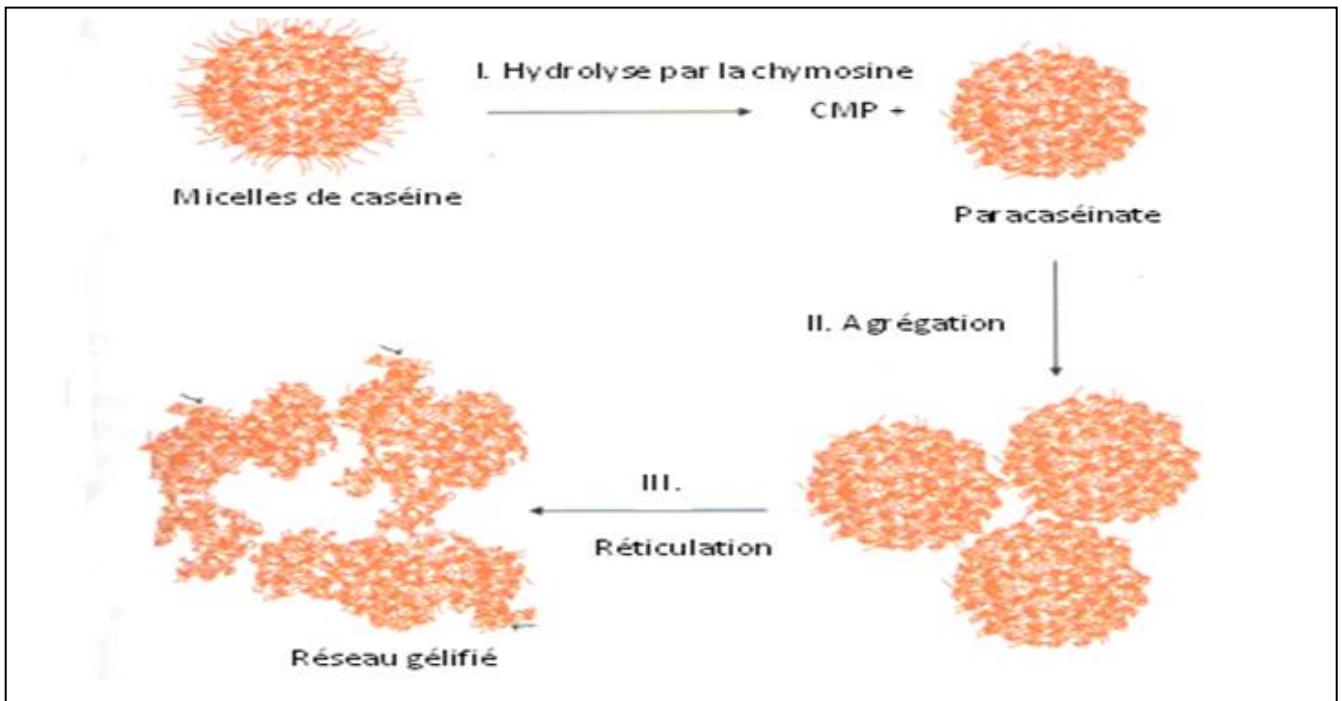


Figure N°3 : Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation présure (Jeantet, 2007).

I.3.2.3.Coagulation mixte

Ce type de coagulation consiste en l'action de la présure et l'acidification du lait. C'est la voie la plus utilisée dans les industries fromagères en particuliers pour la fabrication des fromages frais (petit suisse, demi sels....) et des fromages à pâte molle (Camembert, Brie...) (Green.1977 ; Cheftel et Cheftel, 1980 ; wigley 1996)

Dans les deux cas, après formation de coagulum, celui-ci s'exsude et se détache du lactosérum : c'est la synérèse de caillé ou égouttage. Ce phénomène de synérèse est rapide pour le coagulum par emprésurage et lent pour le coagulum acide (Lenoir, 1985).

I.3.3.Mécanisme d'action de la coagulation

On distingue 3 phases de coagulation :

- ❖ Phase primaire ou hydrolyse enzymatique.
- ❖ Phase secondaire ou agrégation des micelles.
- ❖ Phase tertiaire ou réticulation du gel (Mahaut et al ; 2003).

I.3.3.1.Phase primaire

La phase enzymatique correspond à une protéolyse limitée de la caséine κ , portant sur la liaison Phe105-Met106.

La chaîne peptidique de la caséine κ est ainsi coupée en 2 segments de caractéristiques différentes :

- ❖ Le segment 1-105 ou paracaséine κ est hydrophobe, basique et reste intégré la micelle.
- ❖ le segment 106-169 ou caséinomacropeptide (CMP) est très hydrophile, acide et passe dans le lactosérum (**Fox et al, 2000 ; Mcsweeney, 2004**).

Lorsque le CMP se détache de la caséine κ , il se produit une réduction des charges négatives de la micelle ainsi que son degré d'hydratation par la perte de sa partie hydrophile. Du fait de la suppression de ces deux facteurs essentiels dans la stabilité des caséines en solution, des liaisons peuvent alors s'établir entre les micelles modifiées, permettant leur agrégation et finalement la formation d'un gel, c'est la phase de coagulation proprement dite.

I.3.3.2.Phase secondaire

A pH 6,6, lorsque 80 à 90% de la caséine κ est hydrolysée (correspondant à 60% du temps nécessaire pour observer virtuellement la coagulation), l'agrégation se met en place par des liaisons électrostatiques et hydrophobes entre les micelles modifiées (**Mahaut et al ; 2000**).

I.3.3.3.Phase tertiaire

L'agrégation démarre lorsque 85 à 90 % de la caséine κ est hydrolysée et elle atteint sa vitesse maximale lorsque la totalité de la caséine κ est hydrolysée. Des liaisons électrostatiques et des liaisons hydrophobes participent à la formation du gel. Le calcium ionique et le phosphate de calcium colloïdal jouent aussi un rôle déterminant dans le phénomène.

I.3.4. Facteurs influant la coagulation du lait

I.3.4.1. Effet de la température

La coagulation dépend de la température, la température optimale de la présure est de 40-42°C. À température inférieure de 10 c il ya pas de coagulation du lait. La coagulation est Lente à des températures supérieures à 20. De 20 à 42 la vitesse de formation de coagulant Augmente progressivement, mais à des températures plus élevé le processus de coagulation ralentie et au dessus de 6,5 cil ya pas de coagulation l'enzyme est inactivé (**Brule, 2006**)

I.3.4.2. Effet du pH du lait

L'influence de pH joue un rôle très important sur le temps de coagulation (**Najera et al, 2003**). En passant de pH 6.7 à 5.6 la vitesse de coagulation se multiplie par 30 résulte l'élévation de la vitesse d'hydrolyse nécessaire pour l'agrégation. À pH supérieur à 7, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme étant rapidement inactivée (**Lenoir et al, 2006**).

I.3.4.3. Effet de la teneur en ions calcium (CaCl_2)

D'après **Roupas, (2001)** l'ajout de CaCl_2 est très important dans la fabrication fromagère implique la diminution de temps de coagulation et la fermenté d'un gel est plus élevés (**Mahaut et al ,2000**).

L'addition de CaCl_2 permet également de réduire le pH du lait résultant une augmentation de taux d'agréat des protéines.

I.3.4.4. Effet de la concentration en d'enzyme

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme utilisé (**Mahaut et al, 2005**). La formule suivante permet d'obtenir ce temps de coagulation :

$$T_C = K/ E + T_a$$

T_C : temps de coagulation

K : inverse de la constante de vitesse

E : concentration en enzyme

T_a : temps écoulé entre la fin de la réaction enzymatique et le moment de coagulation

I.4Chapitre IV : Fromage

I.4.1.Fromage

✓ Définition

Selon **le codex alimentarius** Le fromage est définie comme étant un produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi dure, ou extra dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum/ caséines ne dépasse pas celui du lait. Il est obtenu par :

- ❖ coagulation complète ou partielle des matières premières suivantes : lait et/ou produits obtenus à partir du lait, grâce à la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partielle du lactosérum résultant de cette coagulation.
- ❖ Par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou produits provenant du lait.

Fromage affiné

C'est un fromage qui n'est pas prêt à la consommation peu après sa fabrication, mais qui doit être maintenu pendant un certain temps à la température et dans les conditions nécessaires pour que s'opèrent les changements biochimiques et physiques caractéristiques du fromage.

Fromage affiné aux moisissures

C'est un fromage affiné où l'affinage est provoqué essentiellement par la prolifération de moisissures caractéristiques dans la masse et/ ou sur la surface du fromage.

Fromage non affiné

C'est le fromage frais est un fromage prêt à la consommation peu de temps après sa fabrication.

I.4.2.Etapes de fabrication du fromage

La fabrication du fromage comporte trois phases principales :

- ❖ La coagulation.
- ❖ L'égouttage,
- ❖ L'affinage.

I.4.2.1.Coagulation

La coagulation du lait est une étape importante dans le processus de fabrication du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé, résulte des modifications physico-chimiques intervenant au niveau des micelles de caséines.

I.4.2.2.Egouttage

L'égouttage c'est l'étape de séparation du caillé et du lactosérum, la nature du fromage fabriqué dépend de la méthode d'égouttage appliquée.

L'égouttage est le résultat de deux phénomènes physiques différents :

- ❖ Un phénomène actif, la synérèse.
- ❖ Un phénomène passif, L'exsudation spontanée du sérum, liée à la perméabilité du coagulum, est une des caractéristiques des gels lactiques **(Alais, 1984)**.

I.4.2.3. Salage

Le salage peut s'effectuer selon deux techniques :

- ❖ salage à sec par saupoudrage superficiel, par frotage ou par incorporation dans la masse du caillé (cantal, cheddar).
- ❖ salage en saumure par immersion dans une solution saturée en NaCl.

L'incorporation du chlorure de sodium dans le fromage a pour objectifs :

- ❖ d'assurer un complément d'égouttage;
- ❖ de contribuer éventuellement à la formation de la croûte;
- ❖ de régler l'activité de l'eau (a_w) du fromage qui oriente et freinte les développements microbiens et les actions enzymatiques au cours de l'affinage;
- ❖ d'accroître le potentiel organoleptique fromage **(Mahaut et al, 2003)**.

I.4.2.4.Affinage

L'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé, c'est un processus biochimique complexe pour plusieurs raisons:

- ❖ d'une part, la matrice issue de la coagulation et de l'égouttage du lait présente une très grande hétérogénéité physicochimique.
- ❖ d'autre part, les enzymes intervenant dans l'affinage ont plusieurs origines.

Partie I : Synthèse bibliographique

Ces transformations confèrent à la pâte fromagère des caractères nouveaux ; elles la modifient dans son aspect, dans sa consistance. Simultanément, saveur, arôme et texture se développent (**Jeantet, 2007**).

Matériel et méthodes

Partie II : Matériel et méthodes

II Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau des laboratoires pédagogiques du département de technologie alimentaire de la faculté des sciences de l'ingénieur.

La partie expérimentale se partage en deux volets, à savoir :

- ❖ Volet biochimique : inclue l'extraction de l'extrait enzymatique coagulant le lait à partir de la caillette de bovin adulte, l'estimation de son activité coagulante, et sa caractérisation par l'étude de l'influence de certains paramètres chimiques et la détermination de son poids moléculaire.
- ❖ Volet technologique : qui concerne l'essai de fabrication du fromage à pâte pressée à partir du lait de vache utilisant l'agent coagulant caractérisé.

II.1 Matériel biologique

II.1.1 Caillette de bovin

Notre étude est basée sur la caillette de bovin, qui est la matière première d'extraction d'enzyme coagulante. La caillette provient de bovin adulte âgé de 2 ans après abattage au niveau de l'abattoir de Thenia Wilaya de Boumerdes.



Figure N°5 : Caillette de bovin (photo réelle)

II.2 Obtention de l'extrait coagulant

Après abattage des bovins sélectionnés, la quatrième poche de leurs estomacs est prélevée. Les caillettes sont lavées à l'eau de robinet, dégraissées, hachées en petits morceaux, et mises dans des boîtes en plastique puis congelées à -18°C .



Figure N°6 : Caillette de bovin découpé avant congélation (**photo réelle**)

II.3 Extraction de l'enzyme brut

L'extraction de l'enzyme est réalisée selon la méthode de **Valles et Furet (1977)** utilisée pour l'obtention de la pepsine.

Des échantillons de poids P (en g) chacun, sont macérés à 42°C dans un volume ($V = 1,25 \times P$) d'une solution d'acide chlorhydrique $0,2\text{M}$ pendant 60 minutes. Après filtration de chaque mélange, des extraits enzymatiques bruts sont obtenus. Ces derniers subissent alors une clarification par addition de 1% (V/V) d'une solution de sulfate d'aluminium (AlSO_4) 1M et de 5% (V/V) d'une solution de sulfate de sodium (Na_2SO_4) 1M chauffée à 42°C . Après un repos d'une heure suivie d'une centrifugation à $7000 \times g$ /20 min, nous obtenons un précipité humide que l'on fait dissoudre dans un minimum d'eau distillée. Le pH de ces extraits enzymatiques gastriques clarifiés est ajusté 5.5 par une solution de phosphate dissodique 1M . La conservation des échantillons est réalisée à 4°C jusqu'à utilisation.

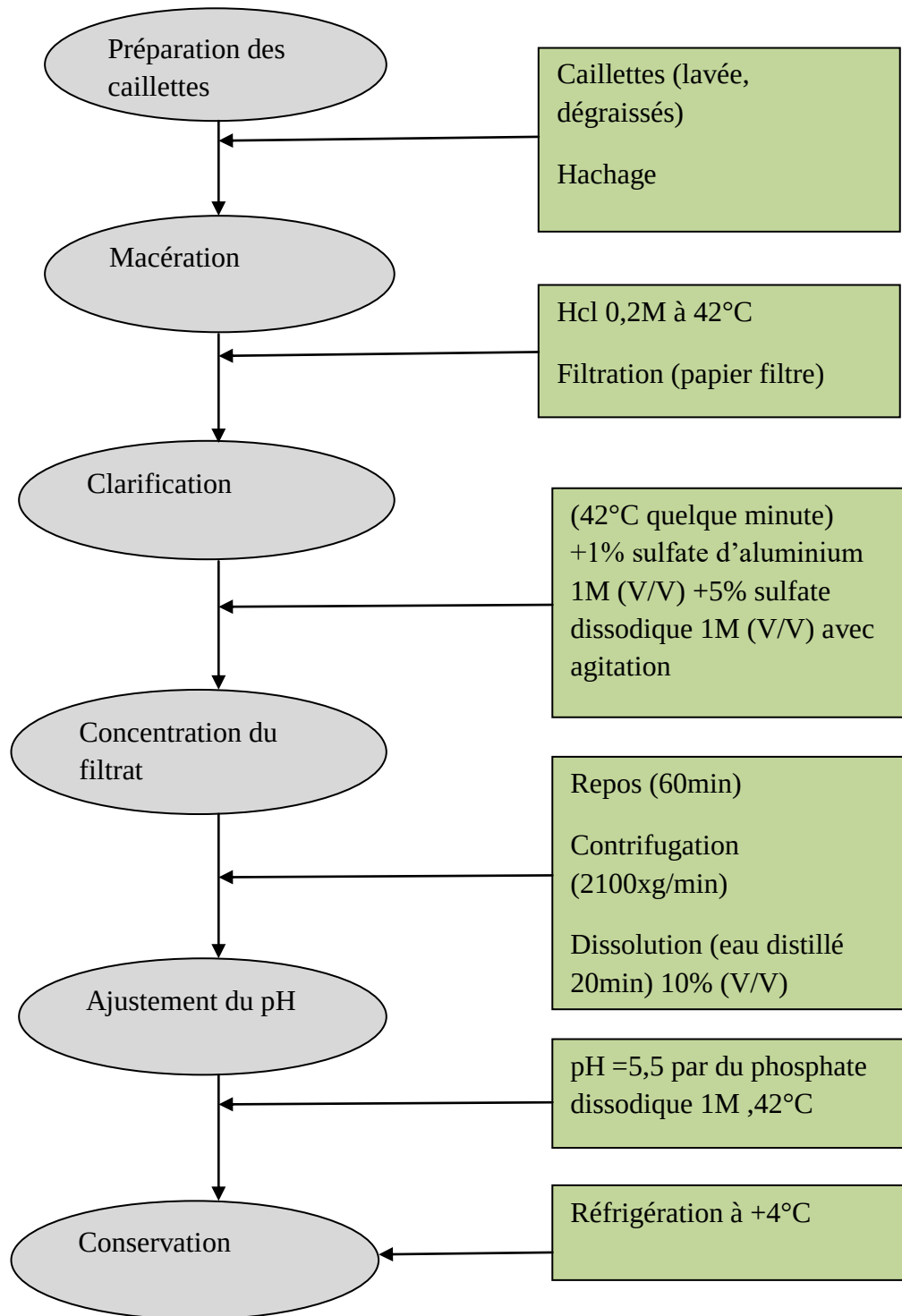


Figure N°7 : Diagramme d'extraction des enzymes à partir de caillette de bovin par la méthode de **Valles et Furet (1977)**.

II.4 Etude de l'extrait brut

II.4.1 Activité coagulante

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut **EEB** est déterminée selon la méthode rapportée par **Shieh et al (2009)**. Cette activité exprimée en force coagulante correspond au volume du lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique, en 40 minutes, à 35°C et à pH= 6,4. Une unité Soxhlet (US) est définie comme la quantité d'enzyme qui coagule 1ml d'une solution de substrat de Berridge à 35°C pendant 40mn

La formule de calcul de la force coagulante est la suivante :

$$F = \frac{2400.V}{T.v} Fd$$

Où :

F : force coagulante.

V : volume du lait à coaguler (10ml).

T : temps de coagulation du lait en secondes.

v : volume de l'extrait enzymatique (1ml) ; Le nombre '2400' représente le temps standard du test (40 minutes) en secondes.

Fd : Facteur de dilution

Remarque : le lait utilisé pour déterminer la force coagulante correspond au substrat de Berridge (**Berridge,1945**) Préparation en (**Annexe 1**)

II.1.2 Activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée par la méthode rapportée par **Silva et al (2014)** et **Shieh et al (2009)**

Le mélange réactionnel est composé de 0,4 ml de caséine à 0,5% (Sigma) (p / v) dans de l'eau distillée, 0,4 ml de tampon acétate à 0,2 mol / L à pH 5,5 et 0,2 ml de l'enzyme brute. La réaction s'est déclenchée dans un bain à 35 ° C et pendant de 30 minutes, et ensuite arrêtée en ajoutant 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10%.dans 2 ml du filtrat on additionne 5 ml de solution de NaOH (0,28 N) et 1,5 ml de réactif phénol (solution de phénol Folin-Ciocalteu: eau = 1: 2). Après avoir maintenu le mélange à 35 ° C pendant 15 minutes, la densité optique (DO) sera mesurée à 660 nm. L'activité protéolytique est exprimée en unités (PA) correspondant à DO 660nm.

II.4.3 Détermination de l'indice AC/AP

Selon **Abel-Fattah et El-Hawwary (1974)**, le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique (AC/AP) pour les préparations enzymatiques représente l'indice d'appréciation de la qualité de ces présures par rapport à la présure de référence.

Sa mesure permet de déterminer l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait au même titre que la présure. C'est dans cet esprit que nous avons déterminé ce rapport qui correspond à la mesure des deux activités décrites précédemment.

II.4.4 Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est réalisé selon la méthode de **Lowry et al (1951)**. Le principe de cette méthode est basé sur la coloration bleue développée par les protéines suite à une réaction entre le réactif de folin et les acides aminés, principalement la tyrosine et le tryptophane et à un degré moins de cystéines et l'histidine. L'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration protéiques contenue dans les extraits. Cette concentration est déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie utilisant le sérum d'albumine bovin (B.S.A à 200 µg/ml).

II.5 Prepurification et concentration des extraits enzymatiques

La prepurification des protéines dont les enzymes utilisent généralement le relargage par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. C'est une technique qui a ses propres limites telles les pertes de protéines lors du fractionnement. A cet effet et dans le but d'améliorer la force coagulante de nos extraits enzymes tout en évitant les pertes en enzymes actives et en augmentant leur concentration, nous avons appliqué la technique de l'ultrafiltration.

II.5.1 Ultrafiltration des extraits enzymatiques

L'ultrafiltration est définie comme un procédé de séparation en phase liquide, par perméation à travers une membrane perméselective sous l'effet d'un gradient de pression. La séparation est principalement en fonction de la taille des particules dispersées dans la solution (quelques dizaines à quelques centaines d'angströms) et de leur masse moléculaire. L'ultrafiltration concerne donc les colloïdes, les macromolécules synthétiques et naturelles, les

Partie II : Matériel et méthodes

virus. La taille des pores des membranes est comprise entre 1 et 100 nm (**Maure ,1989 ; Renner ; Abd El-Salam, 1991**).

- **Procédure**

L'ultrafiltration est réalisée au niveau du laboratoire pédagogique du département à partir d'un dispositif de l'ultrafiltration, type « *oméga* » de seuil de coupure (ou cut of) de 10 KDa. L'extrait enzymatique clarifié circule, à partir d'un réservoir de 500ml contenant Y ml d'extrait enzymatique brut à l'aide d'une pompe péristaltique. Le liquide est homogénéisé à l'aide d'une spatule. Au cours de la circulation de l'extrait enzymatique, le perméat est collecté dans un cylindre gradué tandis que le retentât est retourné vers le réservoir **Figure N°8**. À la fin de l'opération, la membrane est raclée avec un volume connu d'eau distillée afin de récupérer les protéines collées à la surface de la membrane tout en évitant son colmatage



. **Figure N° 8 : Dispositif d'ultrafiltration de laboratoire (photo réelle, Département de technologie alimentaire, UMBB)**

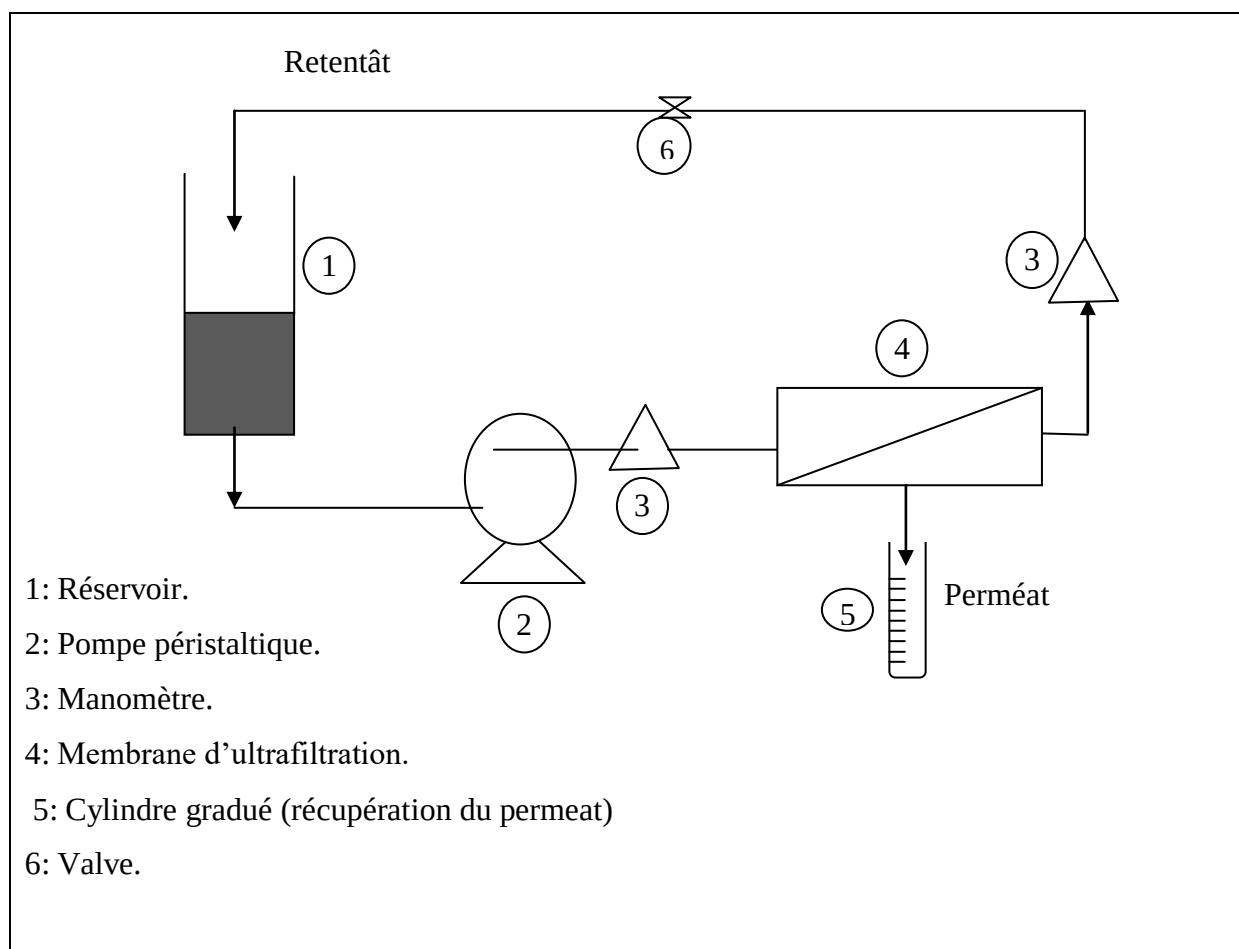


Figure N°9: Schéma du dispositif d'ultrafiltration (réalisé à partir de la photo ci-dessus)

Dans cet extrait, l'activité coagulante, l'activité protéolytique, l'indice AC/AP et le taux de protéines ont été mesurés (*Cf II.4*)

II.5.2 Caractérisation de l'extrait pré-purifié

La caractérisation de l'extrait enzymatique passe par la détermination des conditions optimales de l'activité coagulante, ce dernier est susceptible d'être modifiée par plusieurs facteurs en particulier le pH, la concentration en CaCl_2 et la température et concentration d'enzyme.

II.5.2.1 Effet du pH

L'influence de pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été déterminée en faisant varier le pH du lait de 5,5 à 8.

II.5.2.2 Effet de la température

La température optimale de coagulation du lait a été déterminée en portant le lait à différentes températures de 30°C à 80°C avec un incrément de 5° C

II.5.2.3 Effet de la concentration en CaCl_2

L'influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante a été déterminée en faisant varier la concentration du lait en ions CaCl_2 de 0,01 M à 0,05 M.

II.5.2.4 Effet de la concentration en enzyme

La concentration optimale est évaluée en mesurant le temps de coagulation du lait le plus court à des concentrations en enzyme Avec des dilutions de 1/2 à 1/10. Elle est exprimée en mg/ml.

II.5.2.5 Effet de quelque effecteur de protéases sur l'activité de l'extrait enzymatique

L'effet des effecteurs sur l'activité coagulante des extraits prépurifiés est rapporté par la méthode décrite par **He et al (2010)** ; **Majember et al (2015)**. Différents inhibiteurs de protéases, principalement l'inhibiteur des métalloprotéase (**EDTA à 5mM**), l'inhibiteur des aspartyl protéases (**Pesptatine A à 20 μM**) et le (**2-Mercaptoethanol à 5 mM**) sont ajoutés séparément dans l'extrait enzymatique. L'effet de l'inhibiteur sur l'activité enzymatique représente l'activité résiduelle relative rapportée à l'activité initiale de l'enzyme exprimée en %. L'activité témoin de l'enzyme sans effet de l'inhibiteur représente 100% d'activité.

II.5.2.6 Etude de la stabilité d'extrait enzymatique ultrafiltre :

II.5.2.6.1 Stabilité thermique

Les activités coagulantes résiduelles de l'EEUF sont mesurées après 30mn d'incubation de l'extrait à des températures allant de 40°C à 80°C avec un intervalle de 10°C.

II.5.2.6.2 Stabilité par la conservation

Évaluée en mesurant l'activité coagulante résiduelle au cours de la conservation de l'EEUF à +4°C, -18°C et à la température ambiante.

Cette activité coagulante est mesurée chaque 5 jour pendant 20 jours.

II.6 Purification de l'extrait prépurifié par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75

Les extraits enzymatiques bruts sont soumis à une chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Séphadex G 75

- **Principe**

Le gel de filtration est une technique chromatographie qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise des granules de gel poreux tel que le Sephadex, le diamètre des pores étant une caractéristique de chaque type de gel.

Cette méthode fréquemment utilisée dans la purification et la séparation des protéines sont éluées dans un ordre décroissant, les protéines de poids moléculaire élevée sont éluées les premières, les autres protéines de masse moléculaire plus faible sont éluées tardivement (**Durang et Monsan,1974**).

- **Procédure**

Notre extrait enzymatique prépurifié par ultrafiltration est soumis à une chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de filtration Sephadex G-75. L'élution est réalisé a l'aide d'un tampon phosphate 0,1M, pH 5,3 et les fractions de 1,4ml et un débit de 0,56ml/mn sont récupérées après une lecture de l'absorbance à 280nm à l'aide d'un spectrophotomètre *JASCO V 530* (Japon).

- **Appareillage employé**

- ❖ Colonne analytique type *SpectraChrom*, de dimension 30 cm × 1cm.
- ❖ Pompe péristaltique STA-Multipurpose model DESAGA.
- ❖ Collecteur de fraction *SpectraChromCF-2*.
- ❖ Appareille de gradient.
- ❖ Spectrophotomètre UV Visible-*Jasco V 530* réglé à 280 nm.

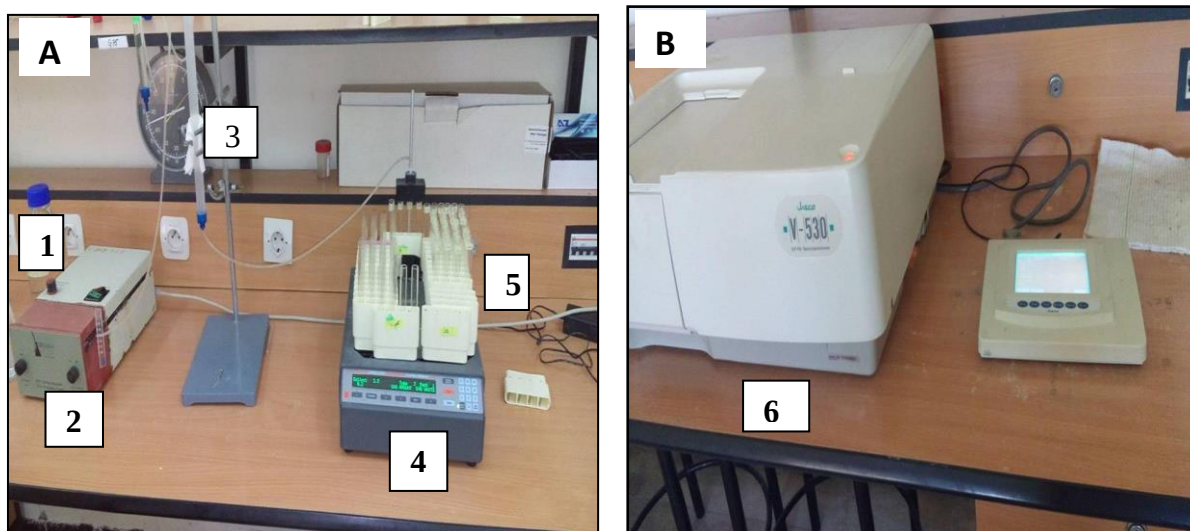


Figure N°10: Dispositif du Système de chromatographie basse pression sur colonne G75 (A) et spectrophotomètre UV-Vis pour la lecture à 280nm des fractions éluées (B)

1-réservoir de tampon d'élution, 2-pompe péristaltique, 3-colonne analytique, collecteur de fraction ,5-fraction, 6-spectrophotomètre

II.6.1 Détermination du poids moléculaire

Le poids moléculaire de la protéase obtenu après purification des extraits enzymatiques purifiés a été déterminé à partir du profil d'un mélange de protéines standards par passage sur colonne Sephadex G-75. Il s'agit **1- de l'albumine d'œuf de poulet, grade VI) (43,3 kDa), 2- pepsine porcine Sigma (35 kDa), 3- trypsine de pancreas bovin Merck (23,3 kDa) et 4- lactoglobuline de lait bovin (18,36 kDa)**. La droite de régression est représentée par la valeur du logarithme de la masse moléculaire de la protéine étalon (logPM) en fonction de son volume d'élutions (V_e) **Figure N°11**. Cette méthode de mesure est la technique classique de mesure du PM d'une protéine en biochimie (**Kamoun ,1991**).

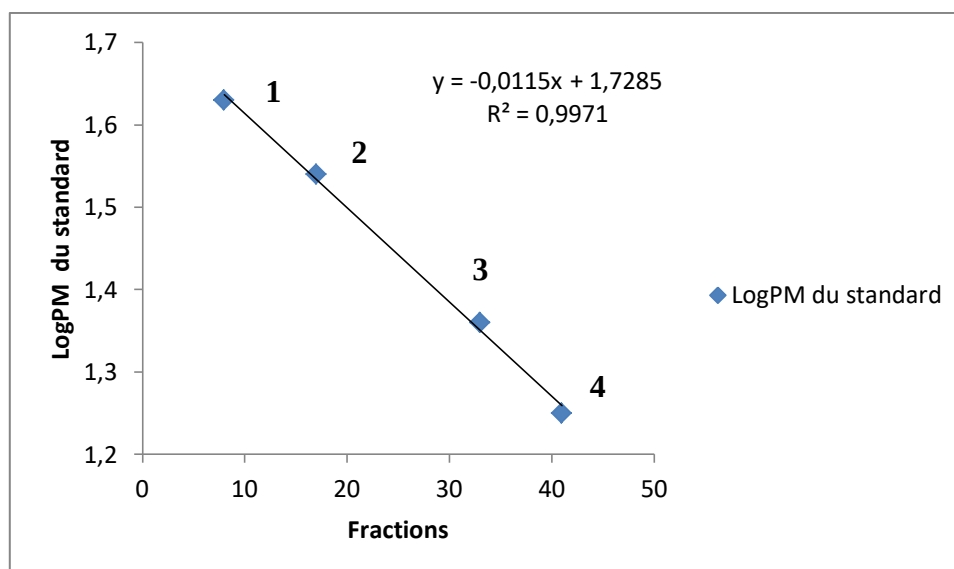


Figure N°11 : Droite d'étalonnage du log PM des standards protéiques

**1- Albumine d'œuf de poulet grade (VI) (43,3 k Da) 2- Pepsine porcine sigma(35 k Da),
3 -Trypsine de pancréas bovin (23,3 k Da),4-Lactoglobuline du lait bovine(18,36
kDa).**

II.7 Aptitudes technologiques : Essai de fabrication d'une pate de fromage pressée

Dans cet essai notre but est d'étudier les aptitudes à la coagulation du lait de l'enzyme extraite de la caillotte bovine, on la comparant avec la présure de référence (*Présure LFB*)

II.7.1 Procédé de fabrication :

L'essai de fabrication comprend en réalité deux essais : le premier est réalisé avec l'extrait enzymatique coagulant brut issu de la caillotte bovine et le deuxième avec la présure commerciale provenant de la laiterie LFB de Boudouaou.

Ces essais ont été réalisés au niveau du laboratoire de l'entreprise **fromagerie Faiz** sis à Corso (W. Boumerdes).

II.7.2 Etapes de la fabrication sont les suivantes :

➤ **Traitement du lait**

La quantité de lait utilisée pour la fabrication est de 2 litres de lait provenant de la ferme de Corso). Les conditions sont les suivantes :

Le lait de vache cru : Ajouter du CaCl_2 à raison de 1g/l

- ❖ La pasteurisation est réalisée dans *un thermomix de l'entreprise* à 75°C pendant 20 secondes.

Cette pasteurisation va permettre de réduire la flore banale et d'éliminer la flore pathogène.

- ❖ Le lait est ensuite refroidi à 38°C.

➤ **Ensemencement du lait traité**

La maturation du lait est réalisée par ajout de ferments lactiques mésophiles. Les ferments ou levains lactiques sont des cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques qui se multiplient dans le lait et dans les fromages, assurent deux fonctions essentielles :

- ❖ Abaisser le pH du milieu en transformant le lactose en acide lactique.
- ❖ Contribuer aux caractères organoleptiques des fromages en libérant les systèmes enzymatiques.

Les ferments proviennent de l'unité LFB de Boudouaou. Ils sont ajoutés par ensemencement direct à raison de 30mg/4l de lait, avec agitation jusqu'à dissolution complète des ferments.

➤ **Emprésurage:**

Deux petites cuves ou casserole ou autre servant à l'essai sont remplies avec du laitensemencé à raison de 10ml.

Les cuves sont emprésurées séparément, l'une avec l'extrait enzymatique coagulant brut de *caillette bovine* et l'autre avec la présure commerciale. On ajoute l'enzyme coagulante dans le lait à 38°C, et on laisse coaguler pendant 40 mn environ. La concentration des extraits enzymatiques est préparée de façon à donner un temps de coagulation égal ou le plus proche l'un de l'autre, et cela en se basant sur la force coagulante de chaque enzyme:

➤ Formation et récupération du caillé

Après la coagulation complète du lait (40 mn), le caillé est mis à égoutter dans une gaze afin d'éliminer le lactosérum puis soumis à un pressage. Une fois égoutté, le caillé est conservé au réfrigérateur pour une analyse ultérieure.

II.3 Méthode analytiques

II.3.1 Analyse physicochimique

L'analyse physicochimique des caillés pressés a porté sur la détermination de l'acidité, et l'extrait sec selon la norme (AFNOR 1986, norme NF-V04-210) (Annexe 4)

II.3.2 Rendement fromager

Le rendement fromager ou le rendement de la transformation du lait en fromage est l'expression mathématique de la quantité de fromage obtenu à partir d'une quantité donnée de lait, est calculé selon l'équation suivante

$$\text{Le rendement} = \frac{\text{le poids de caillé}}{\text{le poids du lait}} \times 100$$

II.4 Aptitudes technologiques

II.4.1 Evaluation de la texture de la pâte

Cette analyse a pour but d'estimer et d'évaluer les quantités organoleptiques du fromage, la méthode est basée sur les appréciations d'un jury d'évaluation des propriétés sensorielles ;

Selon ECK (1990), l'analyse sensorielle regroupe l'ensemble des informations recueillies par les organes des sens. En effet, elle détermine l'attrait qu'exercent les caractères organoleptiques sur le consommateur qui provoquent des réactions plus ou moins vives de désir ou de rejet.

Le test sensoriel est mené sur deux (02) échantillons de pâte de fromage pressée (Témoin et expérimentale) réalisé exclusivement sur l'aspect et la texture de la pâte au toucher, et après le tranchage de la pâte. Cet aspect est évalué par 8 panélistes (non professionnels) et les

Partie II : Matériel et méthodes

résultats sont estimés par le **Quick rank test de Kramer (Kramer, 1961)** au seuil de probabilité de 5%. Le score attribué par le paneliste (échelle hédonique) est donné d'une manière arbitraire :

1 : Pâte ferme, très bon aspect et texture, **2** : pâte ferme, et bon aspect, **3** : fermeté moyenne, texture moyenne début de friabilité, **4** : Pâte friable au tranchage, mauvaise texture.

L'intervalle de la somme des rangs pour 8 panelistes selon **Kramer** est de **8-13** au seuil de probabilité. Les échantillons dont la somme des rangs se trouve à l'intérieur de l'intervalle ne diffèrent pas significativement pas sur le plan statistique (**Annexe 7**)

Résultats et discussion

III. Résultat et discussion

III.1 Obtention de la condition d'extraction d'enzyme coagulante :

L'extraction a été menée en utilisant le protocole proposée par **Valles et Furet (1977)** pour l'isolement d'extrait.

III.2 Caractérisation de l'extrait brut :

L'extrait brut de pepsine de bovin adulte de 2 ans obtenu après extraction est caractérisée par :

La force coagulante, Indice AC/AP, Taux de protéines, Activité protéolytique

Tableau N°5 : Caractéristique d'extrait brut

Caractéristique	Extraits brut pepsine de bovin (moyenne±ET)
La force coagulante (US)	1697±197
Indice AC/AP	2495
Taux de protéinées (mg/ml)	23,68
Activité protéolytique	0,68±0,07

III.2.1 Activité coagulante :

L'extrait enzymatique clarifié obtenu à partir du caillotte du bovin a permis l'obtention d'un temps de floculation de **14 (S)** Avec ce temps nous a permis de calculer la force coagulante exprimé en US égale à 1697 **tableau N°5**.

Cette valeur est bien comparé à la présure commerciale donc la force 1 /10000. Cependant cette comparaison n'est pas très significative étant donné que les préparations commerciales sont à l'état pur contrairement à l'extrait coagulant de la pepsine bovine qui se trouve à l'état brut.

Comparaison de l'activité coagulante des protéases issue des différents d'origine :

✓ Protéases d'origine animale :

Pour la pepsine bovine les travaux de **Valles et Furet (1981)** montrent que l'activité coagulante est très proche à notre valeur 1290 (US) ceci s'explique par l'utilisation d'extrait issue de bovillon (24 mois) de même âge à notre étude .par rapporte aux travaux de (**Nouani et al, 2011 ;Morsli ,1997**) ont trouvé la même valeur 1/3200 de la pepsine de proventricule de

Partie III : Résultats et discussion

poulet, cette valeur supérieur à la notre .par contre **Maachou (2004)** a trouvé une valeur proche 1/1200 d'extrait de proventricule du limon.

✓ Protéase d'origine végétale :

Pour les protéases d'origine végétale **Beka et al (2014)** ont trouvé une valeur de $2,43 \pm 0,68$ de EEB de fruit de *Banlanit aegyptiacia* .**Fernani L (2002)** a trouvé nue valeur de 1 /800 d'extrait obtenu des grains de melon (.**Gagouna et Haggas , 2015**) ont trouvé une valeur de l'activité totale de 30,84 d'extrait issue de *zingiber officinale roscoe rhizone* de la région de khanchla.Tous ces travaux montrent une activité inférieur à la notre ,cela est due à l'origine de la matière d'extraction des protéases coagulantes.

✓ Protéase d'origine microbienne :

par rapport aux protéases d'origine microbiennes **Belhamiche (2000)** a obtenu une AC de *Mucur pusillus* 1 /2400. **Donsova al (2014)** ont trouvé une valeur de 30,88 issue de *caprinus logopides basidial muhron*. **Majumder et al (2014)** ont trouvé différentes valeurs de metalloprotéase de *thermitomyce chypeatus MTcc5091* Cette différence est due au milieu de culture ou de la fermentation.

Ainsi, à ce stade expérimental, l'activité coagulante de l'extrait brut obtenue est relative puisque elle dépend de plusieurs facteurs telles que la présence de diverses substances indésirables, la nature des solvants utilisés, leurs pH, leurs forces ioniques...etc. Aussi, la concentration de l'extrait en protéines, laquelle est fonction de plusieurs facteurs : des méthodes d'extractions, des conditions de stabilité spécifiques à chaque type d'enzymes et du taux de concentration. Ainsi que les facteurs liés à la matière première la quantité de matière utilisée dans l'extraction et l'origine de la matière utilisée.

III.2.2 Indice AC/AP :

L'indice AC/AP de l'extrait enzymatique à l'état brut de pepsine bovine **2495**.Les enzymes microbiennes et végétales manifestent une forte activité protéolytique par comparaison aux protéases d'origine animale. En effet, selon certains auteurs **Krause et al (1998)**, les enzymes fongiques manifestent une activité plus grande que celle de la présure et de la pepsine. Dans nos conditions expérimentales, une forte activité protéolytique est observée dans nos échantillons comparés au tableau ci-dessus.

III.2.3 Activité protéolytique

Dans notre étude, nous avons observé une très forte activité protéolytique d'EEB est de l'ordre de **0,68**. Ainsi, l'action de rupture de la liaison *Phe*₁₀₅-*Met*₁₀₆ de la caséine κ par les aspartyl protéases comme l'EEB est semblable à celle de la chymosine et les autres protéases d'origine fongique et bactériennes (**Sidrach et al, 2005**)

Ce phénomène est généralement indésirable en technologie laitière car il est à l'origine du développement d'amertume retrouvé dans les produits fromagers.

III.2.4 Détermination de taux de protéines de l'extrait enzymatique brut :

La teneur des fractions protéique isolées est estimée par dosage spectrométrique en utilisant la méthode de (**Lowry ,1951**)

D'après (**l'annexe 3**), nous pouvons constater une corrélation ($R=0,924$) avec une équation $\text{concentration} = \text{DO} \cdot 80 / 0,001 = 23680 \text{ug/ml}$ soit 23,68mg/ml

Cette équation nous a permis de calculer la concentration en protéine de nos EEB dilués 80 fois qui est de 23,68mg/ml.

Partie III : Résultats et discussion

III.3 Prépuration et concentration de l'extrait clarifié par ultrafiltration avec un cut of de 10 KDA :

Le principe de ce procédé est de fractionner, par passage à travers d'une membrane poreuse sous l'action d'un gradient de pression, les constituants d'un liquide en fonction de leurs caractéristiques de taille et/ou de charge.

A partir d'un liquide(EEB) donné, on obtient trois fractions :

- le retentât retenu dans le circuit d'alimentation/recyclage,
- le perméat ou filtrat qui est le liquide ayant traversé la membrane
- le récupère

D'après les tests de coagulation sur les trois fractions . Les résultats obtenus montrent que le retentât et le récupère sont proches et sont mélangés, La détermination de l'activité coagulante, l'activité protéolytique, l'indice AC/AP, et le taux de protéines de ce mélange est exprimé dans le **Table N°6**

Tableau N°6 : Caractéristique de l'extrait ultrafiltré de la l'extrait enzymatique

Caractéristique	Extrait ultrafiltré de pepsine bovine (moyenne±ET)
La force coagulante (US)	1086±28
Indice AC/AP	2049
Taux de protéinées (mg/ml)	40
Activité protéolytique	0,53±0,03

III.3.1 Caractérisation de l'extrait enzymatique ultrafiltré

III.3.1.1 Effet du pH du lait sur l'activité coagulante

L'influence du pH du lait sur l'activité coagulante relative d'EEUF est illustrée dans la **figure N°12**. Les résultats obtenus indiquent une activité coagulante optimale au **pH 6** et au pH 7 l'activité coagulante n'est pas inhibée. **Richerdson (1975)** montre que la pepsine bovine est capable de coaguler le lait à pH 6,9. Par contre la pepsine porcine est très sensible à l'augmentation de pH et son activité diminue considérablement à partir du pH 6,5 comparée à celle de la présure (**Richerdson ,1975 ; Ernstrom et Wongt ,1983**) et c'est la raison pour laquelle la pepsine porcine est employée en mélange avec la présure. Selon **Morsli (1996)**, la majorité des enzymes d'origine animale ou végétale ont des pH acides se situent dans l'intervalle acide. **Roposo et al ,(2008)** ont trouvé une activité coagulante optimale à pH 5,5 de protéase de *centaurea calceptrapa* **Kumar et al ,(2005)** ont trouvé même valeur de protéase de *Rhizopus oryzae*

L'influence de l'acidification sur le temps de floculation résulte par une part d'un effet sur l'activité de l'enzyme et d'autre part sur la réaction d'agrégation par suite de la diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges négatives et la libération d'ions de calcium à partir de complexes dissous et colloïdaux (**Ramet ,1997**). La **figure N°12** montre une inactivation totale à pH 7,5 et 8 suite à une dénaturation de l'enzyme.

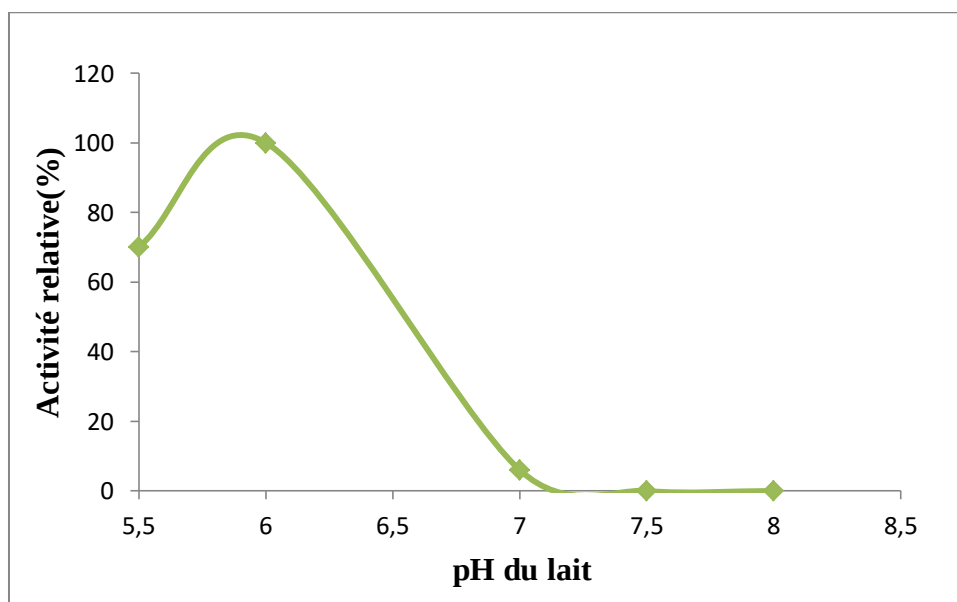


Figure N°12 : Influence du pH du lait sur activité coagulante d'extrait enzymatique ultrafiltré.

III.3.1.2 Effet de la température du lait

L'influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'enzyme a été étudiée dans l'intervalle de température de 35°C à 70°C.

Les résultats rapportés dans la figure N°13 indique que l'activité coagulante diminue avec l'élévation de la température avec un optimum à 35°C. Les travaux de (Guerad 1987 ; Guerad et Legal 1997 ; Amiza et al, 2000) montrent que les températures optimum entre 30°C et 40°C pour les pepsine animal d'origine aquatique (.Nouani et al, (2011) ; (yegin et al, 2012) ont trouvé une température optimum à 40°C pour la pepsine de poulet et de *Mucor muedo* DSM 809. La pepsine bovine et porcine montrent également une sensibilité à l'augmentation de la température entre 30 et 50°C (Haard et al, 1982). Toutefois, il faut noter que l'effet de la température résulte de la conjugaison de deux effets, l'un sur la réaction enzymatique, l'autre sur la phase secondaire de la coagulation et qui correspond à l'étape d'agrégation. Par contre les protéases d'origine végétale ont un pouvoir thermorésistant (Kumar et al, 2005) ont trouvé de 60°C de *Rhizopus oryzae* (Reposo et al, 2008) une température de 52 °C de *centaurea calcaptrapa*. la figure N° 13 montre une inactivation d'EEUF à 50°C du à l'inhibition total de l'enzyme.

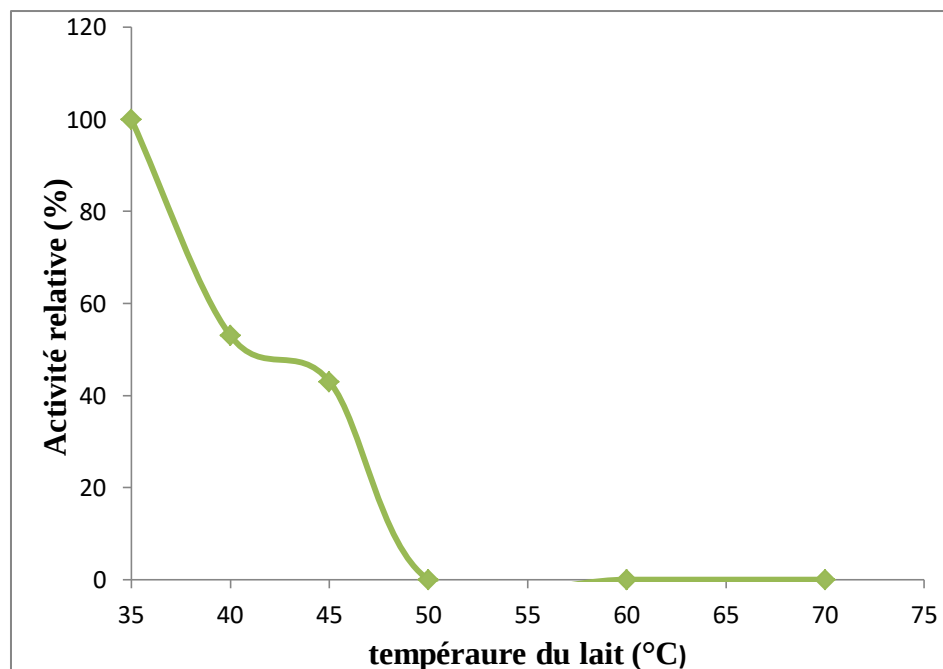


Figure N°13 : Effet de température du lait sur activité coagulante d'extrait enzymatique ultrafiltré.

III.3.1.3 Effet de la concentration de CaCl_2 du lait

L'influence de calcium a été réalisée en modifiant sa concentration dans le lait de 0,01 à 0,05M. Les résultats obtenus dans la **Figure N°14** montrent que l'activité coagulante relative augmente avec l'augmentation de la concentration de CaCl_2 , l'activité optimal est obtenue pour une concentration de 0,03 M, Pour les concentrations supérieures, l'activité baisse par un effet inhibiteur de l'ion. En effet, plusieurs auteurs ont rapportés que les fortes concentrations en Calcium peuvent être un facteur inhibiteur de la coagulation pour certaines enzymes très sensibles à ce facteur (**Iwasaki et al , 1979 ; Anstrup, 1980 ; Belhamiche ,2005**). L'addition du calcium soluble entraîne une augmentation de la teneur en phosphate de calcium colloïdal lequel semble être le facteur déterminant de l'aptitude du lait à la coagulation par la présure Brule et Lenoir (1990). En effet, Cette addition provoque, selon (**Najera et al, 2003**), une diminution du temps de coagulation. Cependant, pour une concentration élevée en CaCl_2 , le temps de coagulation tend à augmenter.

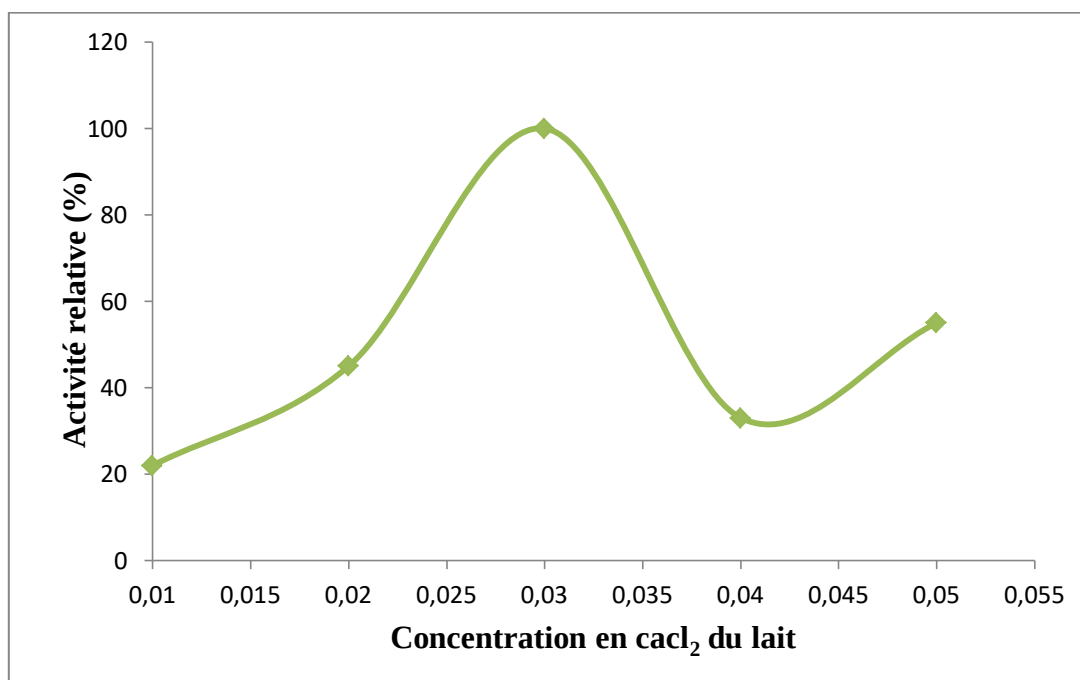


Figure N°14: Effet de concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante.

III.3.1.4 Effet de la concentration en enzyme

L'influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante a été déterminé en variant la teneur en protéine de l'extrait de 0,1 à 1 mg/ml, **la figure N°15** .indique que l'activité coagulante relative augmente avec l'augmentation de la quantité d'extrait cependant dans l'intervalle Testé

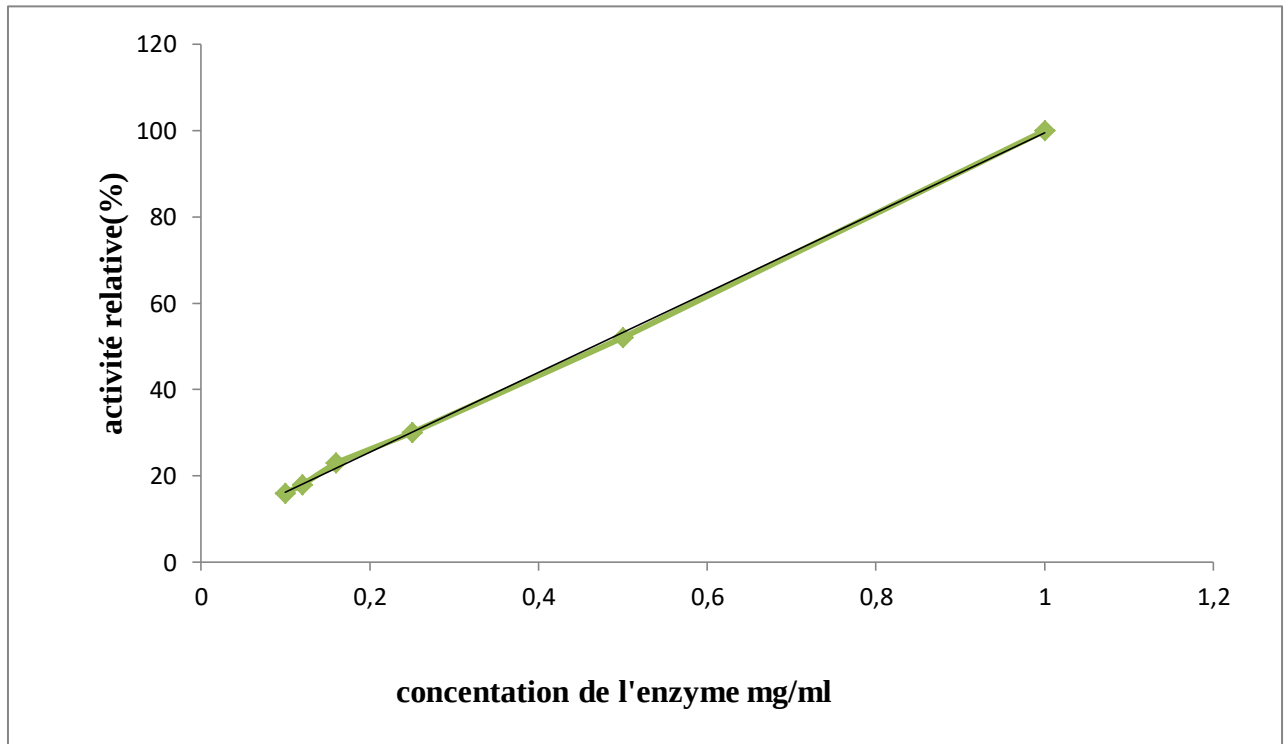


Figure N°15 : Effet de concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante d'extrait enzymatique ultrafiltré (mg/ml)

III.3.1.5 Effet de quelques effecteurs sur l'activité de l'extrait enzymatique ultrafiltre :

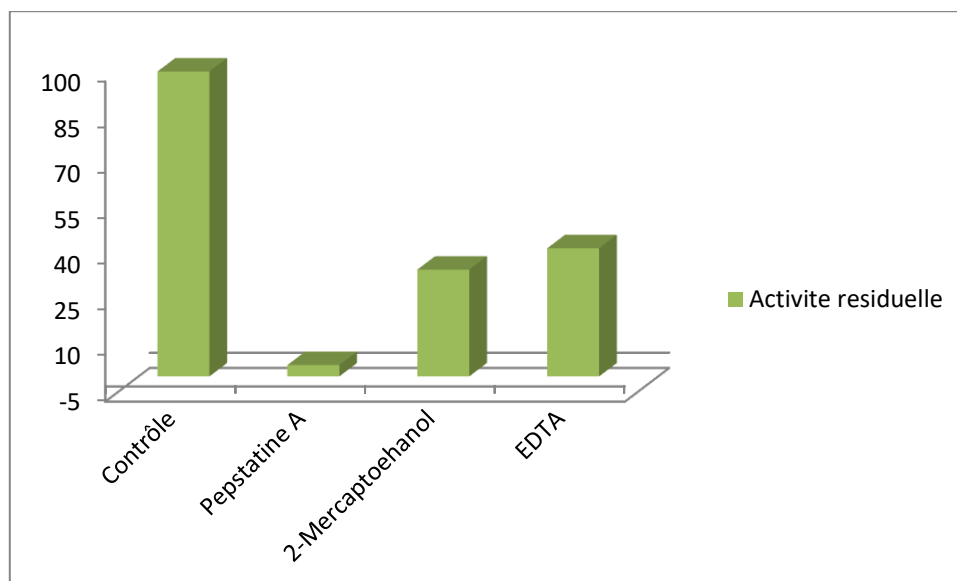


Figure N°16 : Effet de quelque effecteur sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques de la caillette des jeunes bovines.

L'effet inhibiteur de la pepstatine A s sites actifs pepsines animales est confirmé dans ce présent travail. En effet avec une activité résiduelle de moins de 10% comparativement au témoin ou aux autres inhibiteurs, la pepsine extraite de la caillette de bovin adulte appartient bien au groupe des aspartyl protéases. Avec des résidus d'acide aspartique sur le site actif la pepsine est une protéase acide.

III.3.1.6 Etude de la stabilité d'extrait enzymatique ultrafiltre :

III.3.1.6.1 Stabilité thermique :

L'influence de la température sur la stabilité d'EEUF a été étudiée en maintenant notre extrait à des températures variant dans l'intervalle de 40 à 80 °C le temps d'exposition et de 30 min.

Les résultats illustrés dans **la figure N°17**, montre une activité coagulante stable dans l'intervalle 40 °C à 50 °C et une inhibition totale est observée à 60 °C cette inhibition résulte de la dénaturation des protéines enzymatique. **Alais ,(1984)** a noté que lorsque la température s'élève au dessus de 50 °C, la dénaturation de la présure devient sensible. A titre de

Partie III : Résultats et discussion

comparaison (Mouzali, 2001) indique une activité coagulante relativement stable dans l'intervalle de température compris entre 35 °C et 50 °C pour l'extrait brut de fleurs de cardon après 5 minutes d'exposition. (Fernani, 2003) en étudiant l'extrait coagulant des graines de melon a noté une stabilité thermique entre 30 °C et 55°C après 30 minutes d'exposition. Matoub (2000) et Belhamiche (2005) ont indiqué une stabilité thermique dans l'intervalle de température compris entre 30 °C et 50 °C, respectivement, pour la coagulase produite par une souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33) et la coagulase produite à partir de la souche de *Mucor pusillus*.

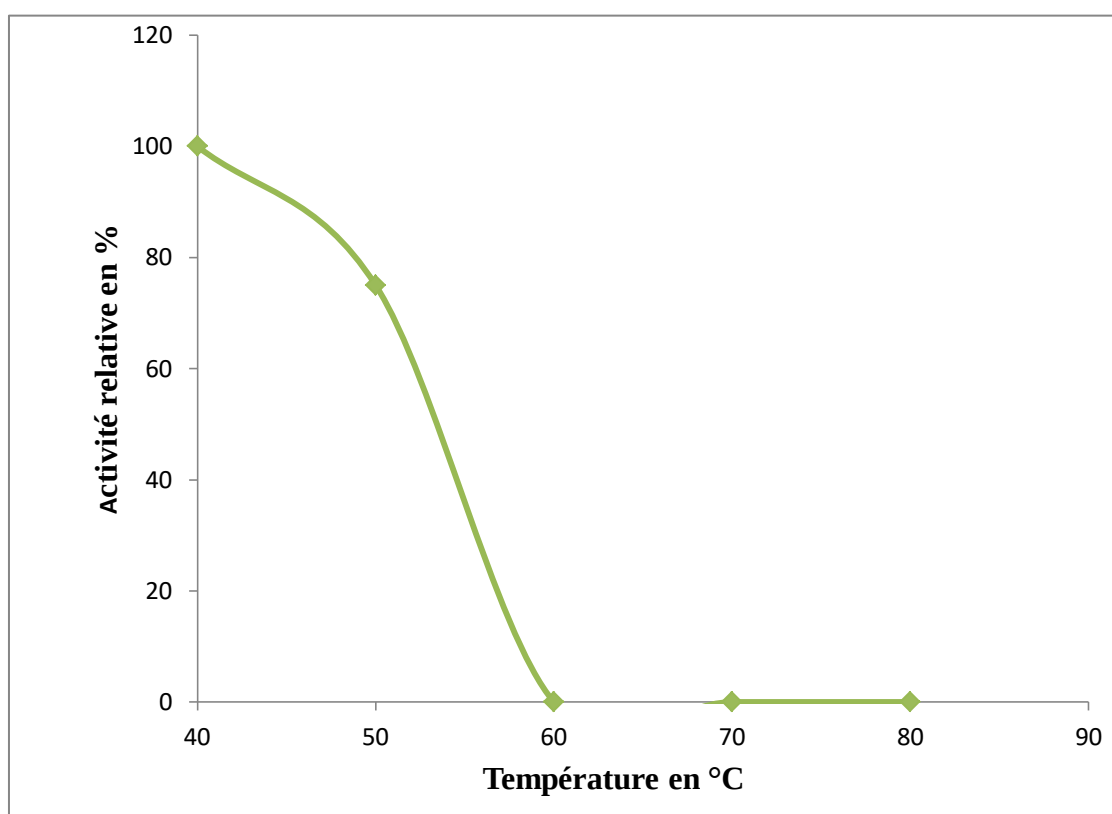


Figure N°17 : Influence de la température sur la stabilité d'extrait enzymatique ultrafiltré

Stabilité

III.3.1.6.2 Stabilité à la conservation :

L'estimation de la stabilité au cours de la conservation a été déterminé par l'entreposage de EEUF à la température ambiante et à +4 °C et à -18 °C pendant 20 jours, l'activité relative a été évalué périodiquement (chaque 5 jour).

Partie III : Résultats et discussion

Les résultats indiqués par **figure N°18** montrent une baisse de l'activité coagulante à partir de 5 jours, pour une conservation à la température ambiante au bout de 20 jours , l'enzyme présente une activité résiduelle de 21% .

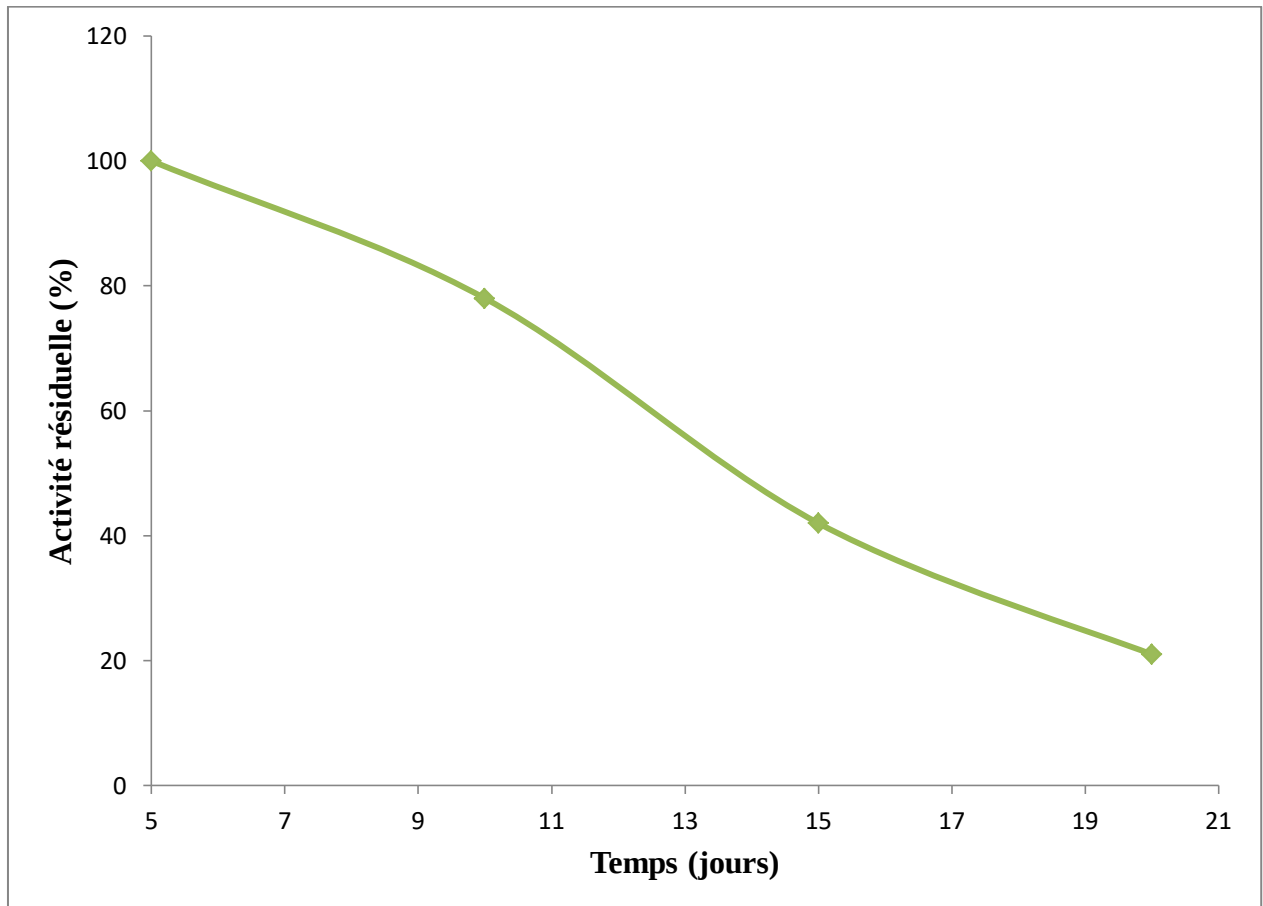


Figure N°18 : Stabilité de l'extrait enzymatique ultrafiltre de la pepsine bovine au cours de sa conservation à température ambiante dans la solution tampon de phosphate 0,1M, PH 5,3.

Partie III : Résultats et discussion

Les résultats indiqués par **figure N°19** montrent une baisse de l'activité coagulante à partir de 5 jours, pour une conservation à +4 °C au bout de 20 jours, l'enzyme présente une activité résiduelle de 65%

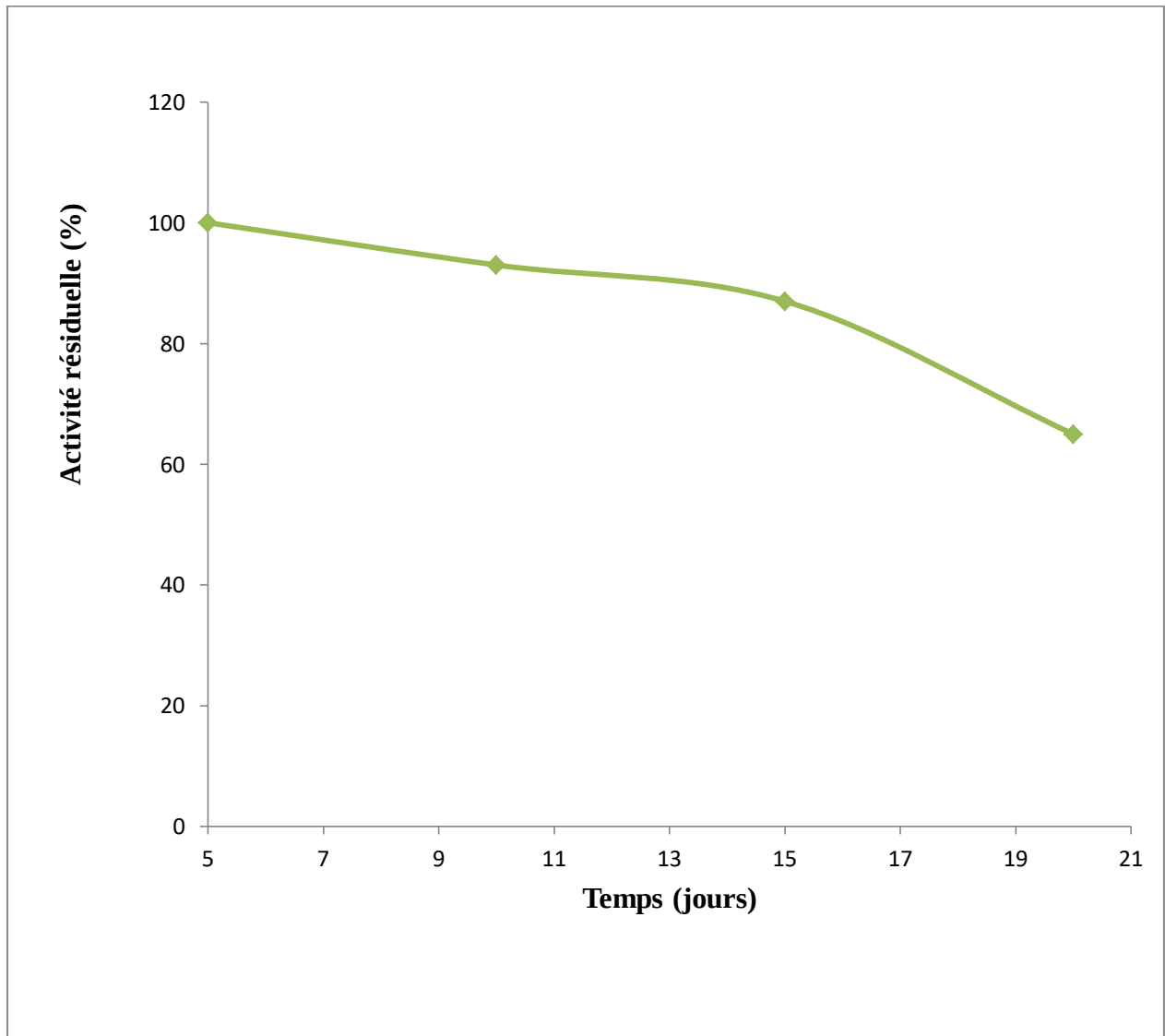


Figure N°19 : Stabilité de l'extrait enzymatique ultrafiltre de la pepsine bovine au cours de sa conservation à + 4 C° dans la solution tampon de phosphate 0,1M, PH 5,3.

Partie III : Résultats et discussion

Les résultats indiqués par **figure N°20** montrent une baisse de l'activité coagulante à partir de 5 jours, pour une conservation à -18 °C au bout de 20 jours, l'enzyme présente une activité résiduelle de 52 %

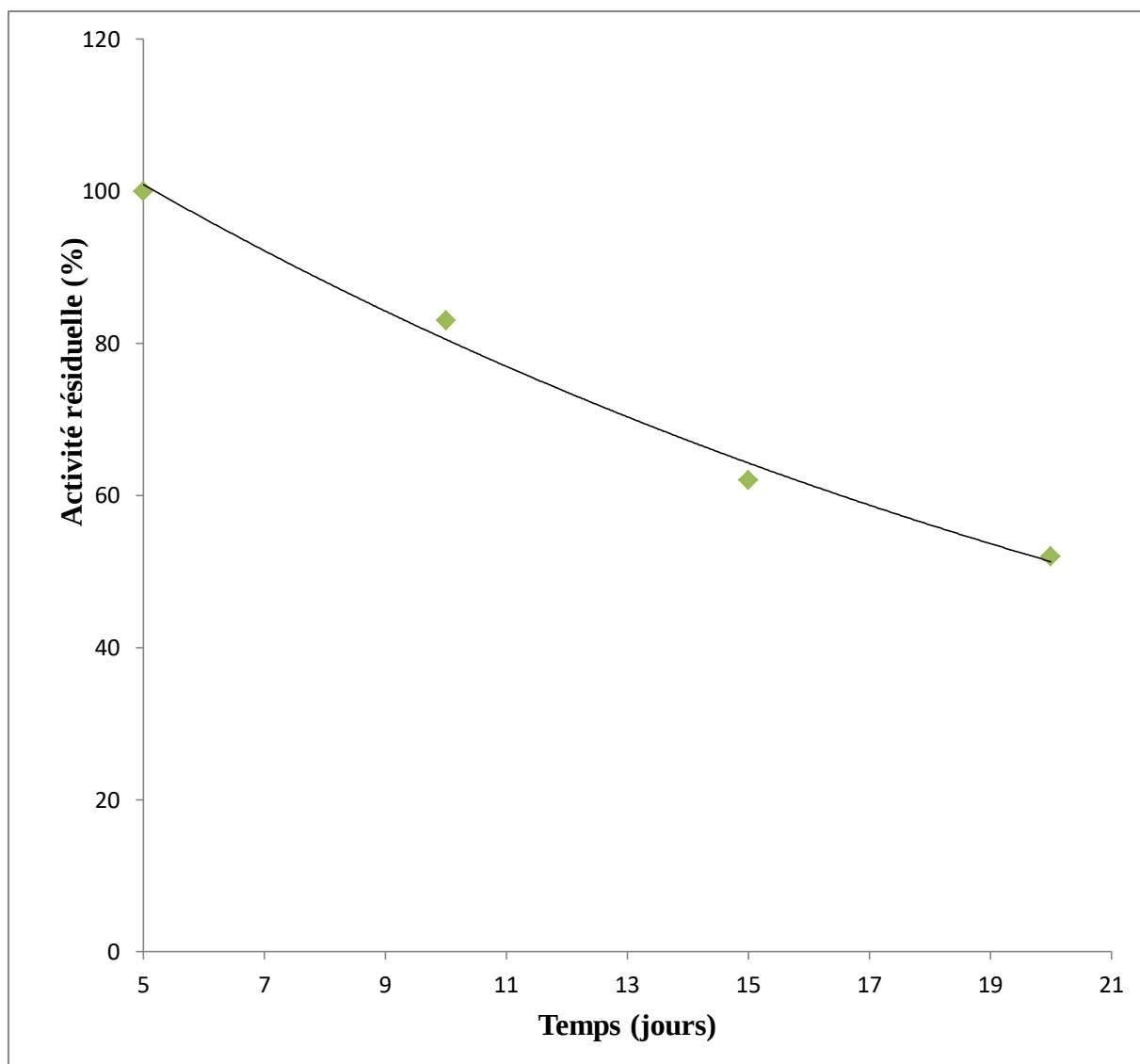


Figure N°20 : Stabilité de l'extrait enzymatique ultrafiltre de la pepsine bovine au cours de sa conservation à -18 C °dans la solution tampon de phosphate 0,1M, PH 5,3.

III.4 Purification d'extrait enzymatique ultrafiltre de pepsine bovine :

Les fractions actives des tubes **15, 16, 17, 18, 19** montrent qu'un seul pic est doué d'activité coagulante. Le volume totale obtenu est **5,5 ml**, avec une force de **126±8 (US)**, un taux de protéines de **0,4 mg/ml**, un indice **AC/AP d 1680** et une Activité protéolytique **0,075±0,004**.

Le profil chromatographique d'EEUF montre 3 pic d'adsorption bien distincts **figure N°21** l'activité coagulante a été retrouvée des fractions actifs qui se situe entre le premier et le deuxième pic.

Les trois pics sont inactifs correspondent aux protéines contaminantes mais l'activité est observée est entre le premier et le second pic ce qui confirme que la gel filtration employée seule est une technique de purification partielle. Ceci, n'exclue pas que d'autre protéines de masse moléculaire rapprochées peut être incluse dans cette même fraction .

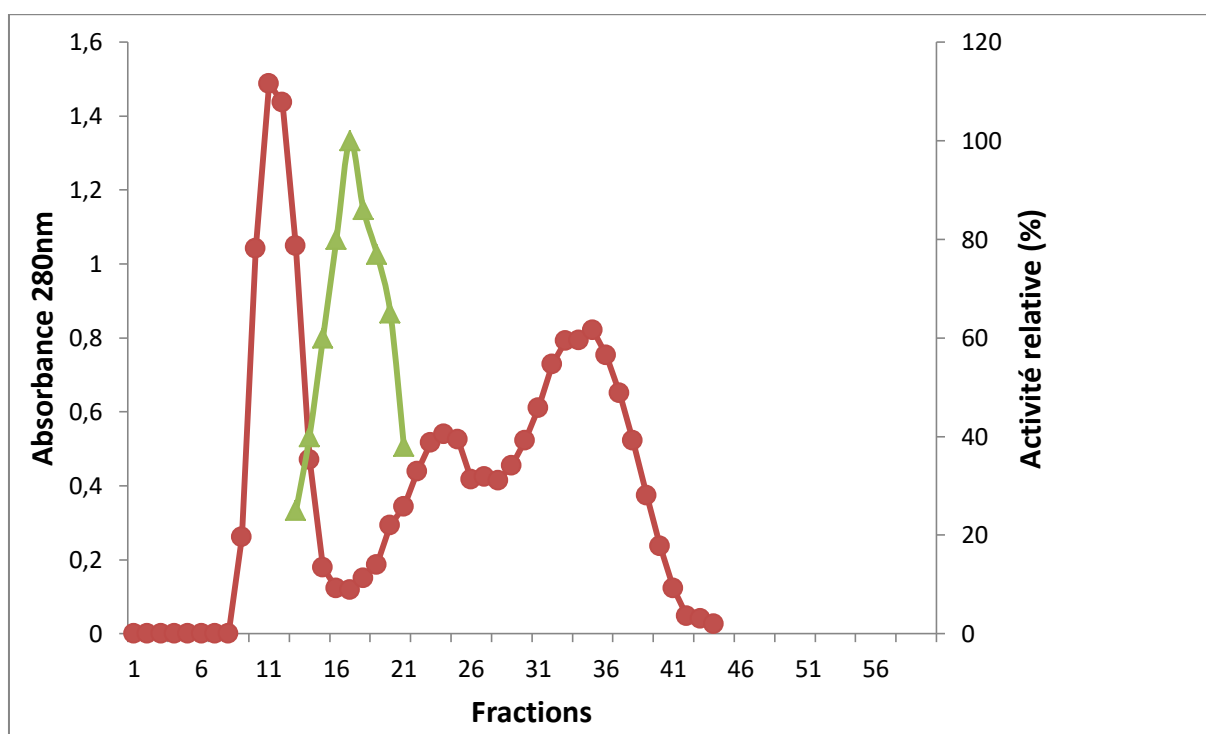


Figure N°21 : Profil chromatographique d'EEUF sur gel séphadex G-75 de l'extrait enzymatique brut issue de caillette du bovin adulte, (tampon de phosphate 0,1M, PH 5,3 Débit 0,56ml/min, fraction 1,4ml).

Partie III : Résultats et discussion

III.4.1 Bilan de purification d'extrait coagulant de la pepsine bovine :

Tableau N°7 : Bilan de purification d'extrait coagulant de la pepsine bovine :

	Activité coagulante total (US)	Protéines total (mg)	Activité spécifique (US/mg)	Rendement (100%)	Facteur de purification
EEB	220610	3026,4	72,9	100	1
Ultrafiltration d'EEB	65160	2400	27,1	79,3	0,38
Gel de filtration d'EEUF	693	2,2	315	0,07	4,37

La filtration sur gel a permis d'obtenir , d'après **tableau N°7** , un facteur de purification élevé de l'ordre de 4,37 , une activité spécifique également élevée (315 US/mg prot.) et un faible rendement en activité (0,07)

L'obtention d'un faible rendement en activité peut s'expliquer soit par une perte en activité, soit par une dilution de l'enzyme au cours de la purification.

III.4.2 Détermination du poids moléculaire de la pepsine bovine :

Le poids moléculaire de la protéine active a été estimée à partir de droit étalon des protéines standards Albumine d'œuf de poulet grade (VI) (43,3 k Da), Pepsine porcine sigma (35kDa), Trypsine de pancréas bovin (23,3 k Da), Lacolobulline de lait bovine(18,36 kDa).

Et dont profils chromatographique ont été obtenue par gel filtration sur séphadex G- 75 comme illustre **la figure N°22**.

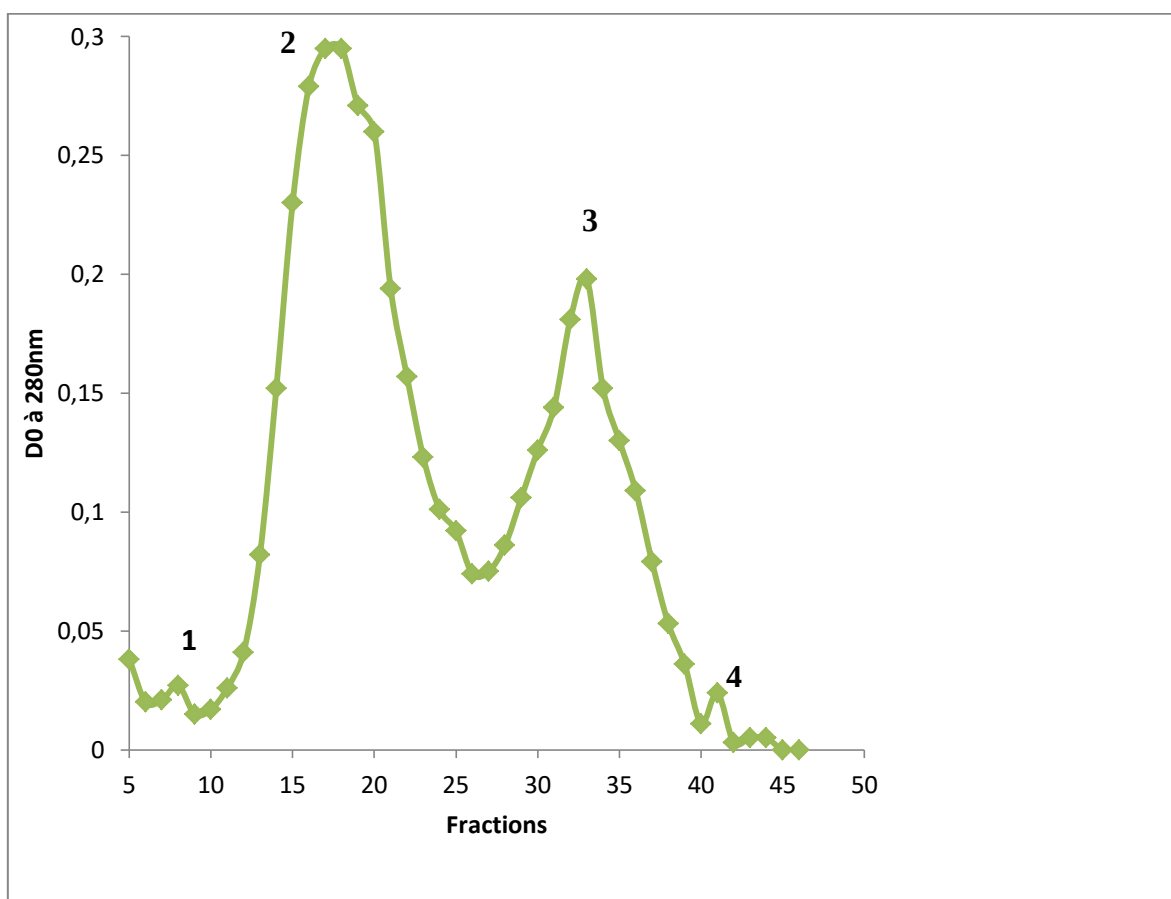


Figure N°22: Profil d'élution sur Sephadex G-75 des protéines standards. (Tampon d'élution Phosphate (0,01 M; pH 5,3), débit : (0,56ml /mn, Fraction de 1,4 ml). Proteine Standards:1- Albumine d'œuf de poulet grade (VI) (43,3 k Da), 2- Pepsine porcine sigma(35 k Da), 3 –Trypsine de pancréas bovin (23,3 k Da),4-Lacolobulline de lait bovine(18,36 kDa).

Partie III : Résultats et discussion

Il existe une relation linéaire entre le volume d'élution d'une substance et le logarithme de masse moléculaire (*Cf. Matériels et méthodes*). Le **tableau N8** résume les résultats obtenus.

Tableau N°8 : Détermination du poids moléculaire des protéines standards.

Protéines	Poids moléculaire (K Da)	Fraction (ml)	Log PM
Albumine d'œuf de poulet grade (VI)	43,3	8	1,63
Pepsine porcine sigma	35	17	1,54
Trypsine de pancréas bovin	23,3	33	1,36
Lacoglobuline de lait bovine	18,36	41	1,25
PM de l'extrait purifié (notre échantillon)	35	17	1,54

Le tableau rapporte le poids moléculaire de l'extrait purifié de bovin adulte, soit 35 kDa calculé à partir de la droite de régression des poids moléculaires des protéines standards élués sur colonne de G-75.

Ces résultats sont en concordance avec ceux rapportés par des travaux menés sur les pepsines animales. En effet, selon **Garnot et Martin (1980)**, la chymosine et la pepsine sont caractérisés par une masse de **30 000 Da** et de **35 000 Da** respectivement.

Des différences de PM sont observées sur les pepsines de différentes espèces de mammifères et poissons. Ainsi, **Moschopoulou (2011)** a montré que cette caractéristique dépend de l'origine de la protéase et que les travaux portés sur les coagulases animales ont indiqué des poids moléculaires compris entre 31 000 et 40 000 Da.

III.5 Application fromagère : Essai de fabrication d'une pate de fromage pressée à partir de lait de vache

III.5.1 Analyse physico-chimique de fromage :

Tableau N°9 : Analyse physico-chimique de fromage

caractéristique	Pate de fromage issu de la coagulation par l'extrait de bovin	Pate de fromage témoin issu de la coagulation par l'enzyme commerciale
Acidité (°D)	40	50
Extrait sec (%)	35	41

Les résultats du tableau ci-dessus rapportent les observations suivantes :

Une acidité assez poussée du caillé des 2 pâtes de fromage

La teneur en extrait sec total du lactosérum est un indicateur du rendement potentiel du fromage, qui pourrait être influencé par le type de coagulant utilisé lors de la fabrication. L'action protéolytique du coagulant peut affecter les propriétés du réseau de la caséine du caillé, affectant de ce fait la quantité de matière sèche exsudée dans le lactosérum. (SHAOJIANG et al, 2003). Cette hypothèse semble se vérifier avec la pepsine (35% d'extrait sec) protéolyse élevée par rapport à la présure commerciale (41%)

III.5.2. Rendement fromager

Le rendement fromager présente un grand intérêt en industrie fromagère car il reflète globalement la répartition quantitative des constituants du lait lors de l'égouttage. Il permet donc de juger pour un type de fromage donné si la fabrication a été menée dans de bonnes conditions. Les rendements fromagers obtenus lors de la réalisation des essais sont de **9%** et **10%** respectivement pour le fromage issu de la coagulation par l'extrait de bovin et le fromage témoin. Ce sont des rendements jugés faibles, probablement dus à des nombreuses pertes lors de l'essai de préparation. Toutefois un essai réalisé dans de meilleures conditions a donné un caillé ferme pour les deux échantillons de pâte de fromage (*Cf Aptitudes technologiques*) Figure N°23



Pate de fromage Témoin



pate de fromage expérimentale

Figure N°23 : Aspect et texture ferme des pate de fromage témoin et expérimentale

III.3 Aptitudes technologiques

III.3.1 Aspect et texture de la pate de fromage

Le tableau suivant rapporte le résultat récapitulatif du test sensoriel basé sur l'aspect et la texture de la pate après tranchage **Tableau N°10**

Tableau N°10 : Résultats des analyses sensoriel de fromage apr2s tranchage

	Pate de fromage présure (Témoin)		Pate de fromage extrait bovin (expérimental)	
Score moyen	1,5		1,6	
Somme des rangs		11,5		12,5

L'évaluation de ce paramètre montre que les deux échantillons de pate de fromage possèdent un aspect et une texture ferme identique. En effet, sur le plan statistique, aucune différence n'est observée au seuil de $p : 0,05\%$ (somme des rangs compris entre 11,5 et 12,5). Par ailleurs, l'ensemble des panelistes ont évalué positivement la texture des deux échantillons de pate caractérisés par un score compris entre 1,5 et 1,6 soit bonne à très bonne texture après tranchage de la pate de fromage. L'histogramme de la **Figure N°23** illustre parfaitement ces résultats.

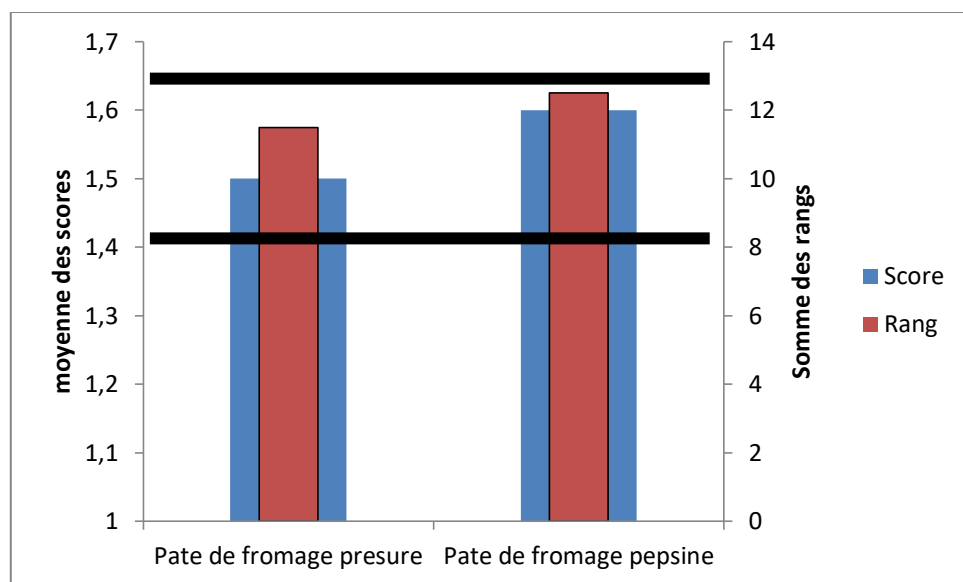


Figure N°24 : Histogramme d'analyse statistique des paramètres sensoriels (aspect et Texture de la pâte) au seuil de probabilité de 5%. L'intervalle entre les traits pleins (Somme des rangs compris entre 8 et 13) indique une différence non significative.

Conclusion générale

Conclusion et perspectives

L'étude menée sur la recherche des succédanées de la présure traditionnelle nous a permis à travers les résultats enregistrés de situer les avantages et les inconvénients des caractéristiques biochimiques de L'extrait coagulant obtenu. Cet extrait a travers la pepsine enzyme de base sont issus des caillettes de bovins adultes généralement destinées à l'abattage. Il faut rappeler que la pepsine, enzyme protéolytique peut être un bon coagulant de remplacement pour certains fromages. Elle fait l'objet de nombreux travaux et est employée en synergie avec d'autres protéases. Pendant les deux dernières décades, la pepsine a l'objet de critiques notamment avec l'apparition de la pathologie spongiforme bovine et l'avènement du génie microbien.

L'étude menée sur cet extrait nous a permis d'évaluer les principales caractéristiques de l'enzyme à savoir une purification par gel filtration, son activité coagulante, sa composition en protéine et la caractérisation son activité en fonction de divers paramètres. Une meilleure connaissance des propriétés de la protéase extraite a été établie pour une meilleure future application en fromagerie locale.

Les résultats enregistrent et pour ne pas faire une répétition rejoignent les propriétés d'une pepsine animale à travers soit la littérature soit les travaux antérieurs déjà réalisés au niveau du département de technologie alimentaire.

L'extrait se caractérise par une activité coagulante élevée d'environ 1400 US sur le substrat de Berridge et une activité protéolytique moyenne de 0,68 exprimé en densité optique sur le substrat caseinique. La détermination de l'indice AC/AP place l'extrait avec les protéases qui peuvent être un bon substitut de la présure traditionnelle.

Par ailleurs, comme toutes les pepsines animales, l'extrait enzymatique de bovin a été identifié comme une protéase acide et fait partie du groupe des aspartyle protéases.

Les aptitudes technologiques des extraits obtenus manifestent un intérêt en fromagerie comme il a été démontré depuis plusieurs années. Ainsi, l'essai de fabrication d'une pâte de fromage pressée présentait beaucoup de similitudes sur le plan sensoriel avec la présure commerciale. Le test de statistique appliqué à l'évaluation seulement de l'aspect et de la texture après tranchage de la pâte a montré qu'aucune différence n'est observée au seuil de probabilité de 5%. Par ailleurs le score attribué par les panelistes indique que la pâte possède une bonne à très bonne texture pour les deux échantillons, témoin et expérimental.

Conclusion et perspectives

En perspectives de ce présent travail, il faut juste rappeler que la pepsine animale en fromagerie a montré ses preuves et de nombreux travaux ont été réalisés. L'enzyme est actuellement fabriquée à grande échelle et employée seule ou en synergie avec d'autres pepsines, particulièrement celle d'origine porcine. En Algérie, sa production passe nécessairement par la valorisation des systèmes gastriques des bovins adultes destinés à l'abattage et son emploi dans la fabrication de certains fromages est intéressante. Cependant, grâce à son caractère acide, les pepsines peuvent avoir d'autres applications dans les industries alimentaires et non alimentaires.

Références bibliographique

Abd El-Fattah A F ; El-Hawwary;N M (1974).Studies on the production of milk clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi. *J. Gen. Microbiol.* 84, 327–331.

Alais C ; 1984 : Sciences du lait. Principe des techniques laitières. Ed. Sepaic, Paris, 4^{ème} Ed., 68.

Alais C ; Linden G (1987) ; Abrégé de biochimie alimentaire. Paris, Masson, 224 p.

Amiot J ; Fournier F ; Lebeuf Y ; Paquin P ; Simpson R ;(2002). Composition, Propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique . du lait Dans : Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses Polytechnique, Montréal, p.1-73.

Beka R G ; Krier F ; Botquin M ; Guiana V D ; Donn P ; Libouya D G ; Mbofung C M ; Dimitrov K ; Slomianny M ; Cuillochon D ; Vercaigne-Marko D ; (2014) ; Characterisation of a milk-clotting extract from *balanites aegyptiaca* fruit pulp International Dairy Journal.34 : 24-31;

Bengana M ;(2001) ; Caractérisation des enzymes protéolytiques (Pepsine/chymosine) isolées à partir des caillettes de bovins adultes. Thèse Magister, Sciences alimentaires, I.N.A., El- Harrach.

Berridge N J ;(1945) ; The purification and crystallization of rennin. *Biochem Journal*,39, 179-186.

Chazarra S; Sidrach L; Lopez-Molina D; Rodriguez-Lopez J N (2007) Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*,L.) Flowers. *International Dairy Journal*, (17) 1393–1400.

Cheftel J C ; Chafel, H ;(1980) ; Introduction à la technologie des aliments.tome 2.Ed. Lavoisier, Tech et Doc. Paris.P54-60.

Chitpintyol S ; Crebbe M C ; (1998); Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem.*, 61 (4), 395-418. .

Dalgleish D G ; (1992);The Enzymatic Coagulation of Milk. In P. F. Fox (Ed.), advanced dairy chemistry Proteins, 1, 579–619. London: Elsevier Applied Science Publishers.

Debry G ;(2001) ; Le lait Caractéristiques physicochimiques. In«le lait, nutrition et santé». Paris, Lavoisier, 566p.

Durand G ; Monsan P ; (1974) ; Les enzymes immobilisées. Serie de synthese bibliographique Ed.Tech et Doc., A. P .R.I.A.France,5

Eck ; Gillis ; (1997) ; Le fromage de la science à l'assurance qualité. 3 emé Ed

Egito A S ; Girardet J M; Laguna L E ; Poirson C; Molle D ; Miclo L ; Humbert G Gaillard J. L. (2007). - Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. International Dairy Journal 17, 816–825.

Ernstrom C A; Wongt N P; (1983); Milk clotting enzymes and cheese chemistry. ed the Avi publshing Company Inc. 662-771; 929

Fernani L ; (2002) ; Obtention et caractérisation d'une protease coagulant le lait à partir de gain de melon *cucumis melon* .Thèse magister .univ.Boumerdes (Algérie).

Fox P; (1969); Milk clotting and protéolytique activité of bovine, pepsine and porcine. J. Dairy. Research. Vol : 36. P 427-433.

Fox P F; Kelly A L; (2004);The Caseins; In Proteins in Food Processing, YADA R.Y, ed. Boca Raton, FL: CRC Press., 29–71.

Gagaoua M ; Huggas N; Hafid K ;(2015); Three phase partitioning of zingibain , a milk-clotting enzyme from *zingiber officiale roscoe rhizomes* .Internationl Journal of Biological Macromolecules .73 :245-252

Garnier J., Mocquoi G., Ribadeau-Dumas E., MauboisJ. L (1968) - Coagulation du lait par la présure : Aspects scientifiques et technologiques. *Ann. Nutr. Alim.*, , 22, B 495 – B 552.

Germonville A ; (2003) ; Agents coagulants. Éditions Techniques de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire. Paris, France.

Green L M; (1977); Review of the progresse of dairy science: Milk coagulation. J. Dairy. Research. Vol : 44. P159-168.

He X, Ren F, Guo H, Zhang W, Song X, Gan B (2010). Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4. Korean J. Chem. Eng. 28:203-208

Jeantet R ; (2007) ; Science des aliments : biochimie, microbiologie, procédés, produits.Paris, Lavoisier, 456 p.

Kamoun P; (1991); Appareils et méthodes en biochimie. 4e édition. *Flammarion Médecine Sciences*. Parie. P. 80-84.

Kayagama, T., and Takahachi, K. (1976) Pipsinogène and pepsin from gastric mucosa of japenese monkey J.Biochem.,79: 455-468.

Kumar A; Grover S; Sharma J ; Batish V K; (2010); Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. Crit. Rev. Biotechnol., 30(4), 243-58.

Lowry O H Rosenbrough N.J.; Farr A.I. et Randall R.J., 1951: Protein measurement with the Follin phenol reagent. J. Biol. Chem., N°193 : 265- 275.

Lenoir J., Remeuf, et Schneid N., 1985 : Le lait de fromagerie. In : Eck A. et Gillis J.C. Le fromage de la science à l'assurance- qualité. 3^e ed. Tec. Et Doc. Lavoisier.

Lenoir J., Remeuf F., Schneid N., 2006. Le lait de fromagerie in : « le fromage ». Paris, Ed. Tech. et Doc. Lavoisier (3^e edition), p.p. 229- 253.

Lilla S., Mogna G. and Addeo F. (2005). Validation of recombinant and bovine chymosin by mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 53, 5230–5238.

Maachou D ; (2004) ; Extraction et purification de protéase coagulant le lait en vue de leur substitution à la présure traditionnelle : Essai d'obtention d'une protéase issue d'estomac de poisson *seriola dumerli* .Thèse magister .Univ .Boumerdes (Algérie).

Mahaut., Jeanter. et Brule G. (2003). Initiation a la technologie fromagère. Tec & Doc, Paris, France.

Mahaut M., Jeanter R. et Brule G. (2005). Initiation a la technologie fromagère. Tec & Doc, Paris, France. 1-21.

Majumber R ; Banik S P ; Khowala S ; (2015) ; Purification and characterisation pf K-casein specific milk-clotting metalloprotéase from *termitomyce clymestry* MTCC 5001 . Food Chemistry. 173 : 441-448.

Mathieu, U;(1981). Présure, pepsine bovine et protéase acide en fromagerie. Circulation du 28 janvier 1981, technique laitière. Vol : 954. P 51-52.

Maurel A, 1989. Osmose inverse et ultrafiltration ; II - Technologie et applications Techniques de l'ingénieur, J 2796 - J 2798,

Miettonet al, (1994) industriels laitiers. Tec and Doc, Paris, France, p 41

Morsli A ; (1997) ; Recherche sur les activité protéiniques des extraits de cynara scolymus , du latex de *figus carica* et du proventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère .Thèse magister .I.N.A. El harrach :Alger (Algérie).

Mazorra-Manzano M A ; Perea-Gutiérrez T C ; Lugo-Sánchez M.E ; Merheb C W Hamilton C; Eleni G ; Da-Silva R ; (2013) ; Partial characterization of protease from a *thermophilic fungus*, *Thermoascus aurantiacus* and its hydrolytic activity on bovine casein. Food Chemistry 104-127.

Nadhour S., Belloul A., 2003. Extraction et caractérisation d'un agent coagulant des graines de citrouille (*Cucurbita pepo L*) et son utilisation comme succédané de présure dans la fabrication d'un fromage à pâte pressée non cuite type EDAM. Mémoire d'ingénieur, Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 92p.

Nouani, A., Belhamiche, N., Slamani, R., Belbraouer, S., Bellal, Mm., (2009).

Extracellular protease from *Mucor pusillus*: Purification and characterization.

International Journal of Dairy Technology y, vol. 62, p. 112-117.

Nouani A ;Hamrani L ;Bella M M ;(2011) ;Purification et caractérisation de protéases coagulant le lait extraite à partir du proventricule de poulet (*Gallus Gallus*).Neuvièmes journée de la recherche avicole.

Perdersen V.B., Christenser KA. And Foltmann B. (1979). Investigations on the activation of bovine prochymosin. Eur. J. Biochem., 94, 573-580.

Pereira C.L.I, Gomes E.O, Gomes A.M.P & Malcata F. X (2008).Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. Food Chemistry, Volume 108, Issue3, 862-868.

Ramet J.P., (1990): Les agents de transformation du lait. In: Fromage. Coord. Eck A. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris: 101 – 105

Ramet J.P., (1991). La transformation en fromages de lait de dromadaire. Revue Mondiale de zootechnique, n°67, 20-28.

Rampilli M., Larsen R. and Harboe M. (2005).Natural heterogeneity of chymosine and pepsin in extracts of bovine stomachs. Int. Dairy J., 15, 1130-1137.

Richter C; Tanaka T. and Yada R. Y. (1998). Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases : pepsinogen, progastricsin and prochymosin. Biochem. J., 335, 481-490.

Roposo S; Domingos A ;(2008); Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *centaurea calcitrapacel* suspension cultures .Process Biochemistry.43:139-144.

Sepulvida, P., Marciniszum, J., Ianelui, J.R., TANG, DJ. (1975) Primary structure of porcine pepsine III-Amino acid sequence of a cyanogen bromide fragment, CB2A and the complete structure of porcine pepsine .The journal of biological ChemistryVol.250, N°13:5082-5088

Sousa, M.J., Ardo, Y., and Mcsweeney, P.L.H. (2001) Advences in the study of proteolysis during cheese ripening International Dairy Journal11:327-345

Tejada L, Abellan A, Cayeula J, Martinez-Cacha A, & Fernandez- Salguoro J. (2008) - Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet andplant coagulant. International Dairy Journal, Volume 18, Issue 2,139-146

Tsouli J.(1974). Etude comparée de l'activité de trois variétés d'artichauts du genre *Cynara scolymus* sur la coagulation du lait. Le lait, vol. 537, 415-421

Tsouli J, (1979). Etude d'une protéase coagulante extraite de *Cynara scolymus* et de *Cynara cardunculu*, adaptation à la méthode conductimétrique pour la détermination du temps de coagulation du lait et le contrôle de fabrication. Thèse de doctorat, C. Bernard. Lyon, 62p

Valles E. et Furet J.P, (1977). Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine ; méthodes d'extraction. Lait, 61, 601 -617

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

Wigley R C; (1996); Cheese and whey in industrial enzymology. Secend Ed. Chap 27. Ed. Godfrey ant Wiest. P135-142.

Yegin S; Goksungur Y; Fernandez-Lahore M ;(2012); Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from *submerged culture of mucedo* DSM 809 .Food Chemistry, 133:1312-1319

Annexes

Les annexes

Annexe 1

➤ Préparation du substrat de Berridge

Le substrat de Berridge est préparé par addition de 12 g de lait écrémé à 100 ml de solution de CaCl_2 à 0,01M. Après 30 mn d'agitation lente, le pH est ajusté à 6,4.

La température du lait est ramenée à 35°C afin de mesurer le temps de coagulation qui correspond à l'apparition des premiers flocons sur la paroi interne du tube dans les conditions de réaction.

Annexe 2

Préparation de la solution Tampon Phosphate pH= 5.5 / 0.1 M

Solution A= KH_2PO_4 (0.1 M)

Solution B= $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1M)

➤ Formule du Tampon = **X ml de A + (100-X)ml de B**

X=84,5 ml

Annexes 3

Dosage des protéines (Lowry et al, 1951)

1. Solution

Solution A :

Na₂CO₃5g

Eau distillée.....100 ml

Solution B :

Cu SO₄, 5 H₂O0.5 g

Tartrate double de Na et K1 g

Eau distillée.....100 ml

Solution C :

50 ml de la solution A + 2 ml de la solution B à préparer immédiatement.

Solution D :

NaOH (1 N)4 g

Eau distillée1000 ml

Solution E :

Réactif de folin ciocalteau0.5 g

Solution F :

BSA200 mg

Eau distillée100 ml

Gamme étalon :

A partir de la solution mère de BSA des dilutions sont préparé selon le tableau ci- dessous :

Concentration en BSA µg/ml	0	25	50	75	100	150	200
Solution mère BSA (ml)	0	0.125	0.25	0.375	0.5	0.75	1
Eau distillée (ml)	1	0.875	0.750	0.625	0.5	0.25	0

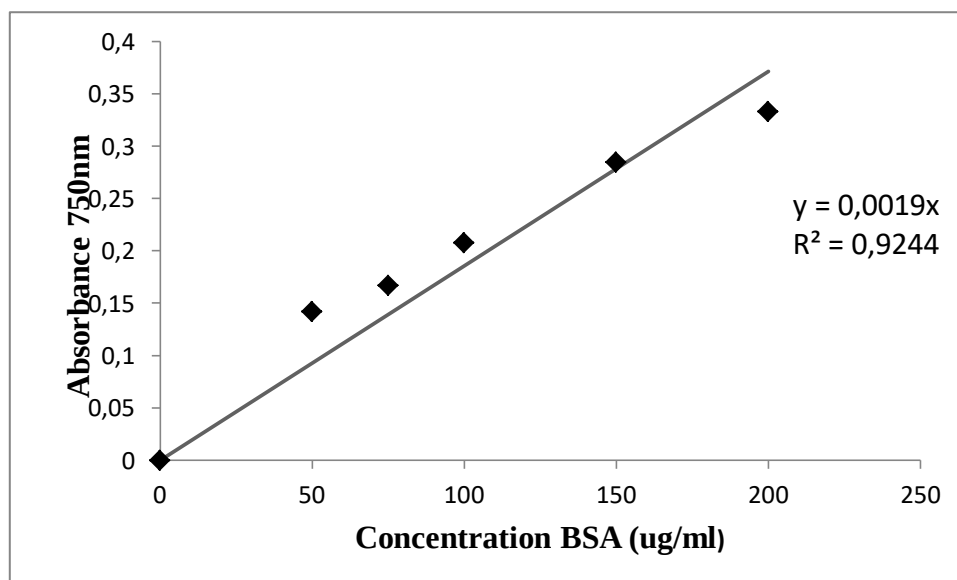
2. Méthodes

- 1 ml d'échantillon.
- Ajouter 3 ml de la solution C ET mélanger.
- 1 ml de la solution D.
- Laisser 10 mn à température ambiante.
- 0.5 ml de folin coicalteau.
- Lire la DO 0 750 nm.

3. Expression des résultats :

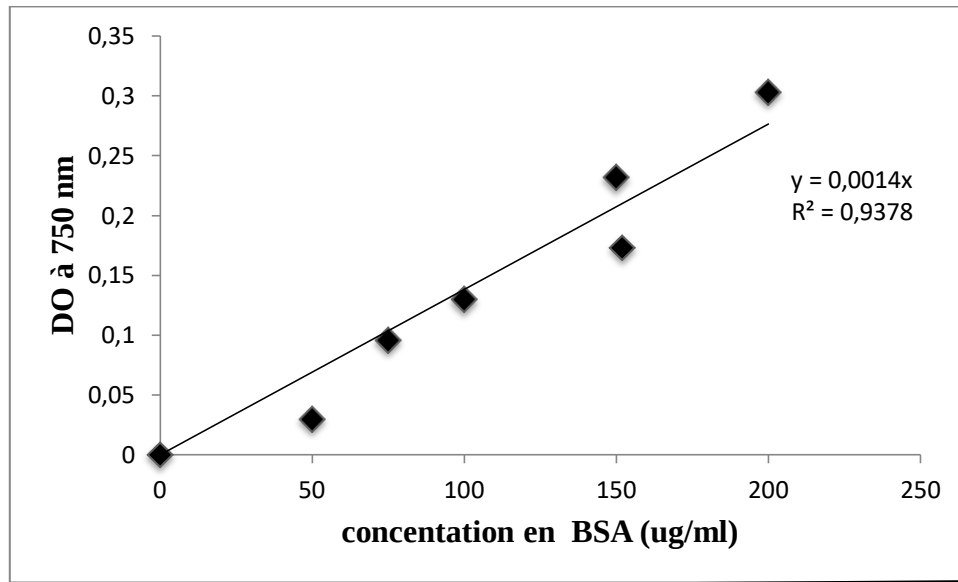
Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses les concentrations en BSA des dilutions préalables préparées et sur l'axe des ordonnées les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration en protéines inconnue X, est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est en suite projetées sur l'axe des abscisses.



FigureN°1 : Courbe étalon de protéines exprime en BSA (µg/ml) pour l'extrait enzymatique brut.

Les annexes



FigureN°2 : Courbe étalon de protéines exprime en BSA (ug/ml) pour l'extrait prépurifié.

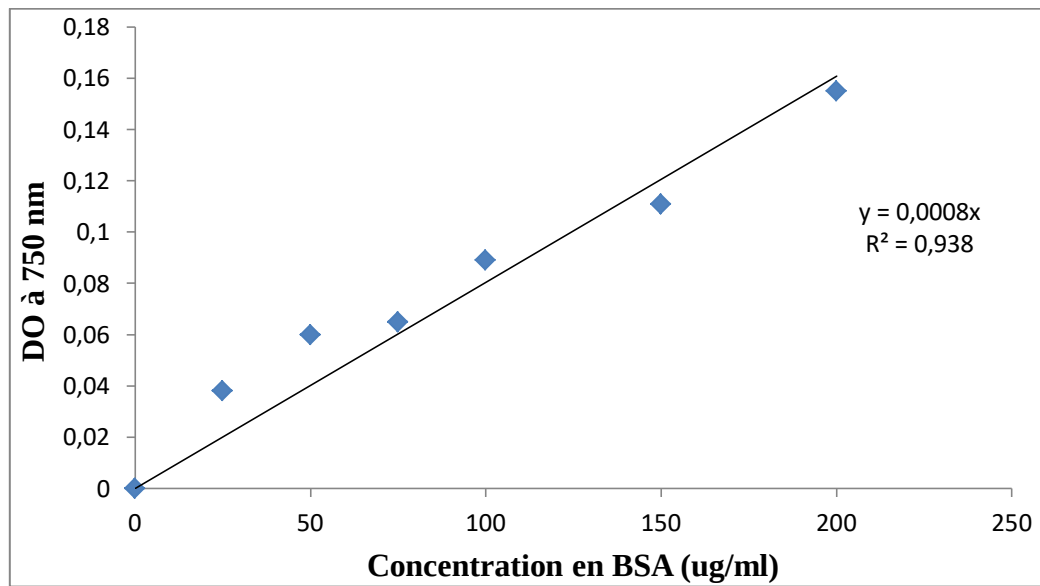


Figure N°3 : Courbe étalon de protéines exprime en BSA (ug/ml) pour l'extrait purifié.

Annexe 4

Analyses physico-chimiques de la pate de fromage

1) Détermination de l'acidité

- **Mode opératoire**

- Introduire dans un bêcher 10 ml d'une solution de 10g de pate de fromage dilué dans 100ml d'eau à l'aide d'une pipette graduée, puis ajouter 3 à 4 gouttes de phénolphthaléine ;
- Titrer avec de la soude NaOH 0,11N jusqu'à premier virage au rose.

- **Expression du résultat**

- L'acidité est exprimée en degrés Dornic, donnée par une lecture directe du nombre de millilitres de soude neutralisante, sachant que $1^{\circ}\text{D} = 0,1\text{g/l}$ d'acide lactique.

2) Détermination de l'acidité

- **Mode Opératoire**

- Introduit dans un bêcher 10 ml de lait à l'aide d'une pipette graduée, puis ajouter 3 à 4 gouttes de phénolphthaléine ;
- Titrer avec de la soude NaOH 0,11N jusqu'à premier virage au rose.

III.2. Expression des résultats

L'acidité est exprimée en degrés Dornic, donnée par une lecture directe du nombre de millilitres de soude neutralisante, sachant que $1^{\circ}\text{D} = 0,1\text{g/l}$ d'acide lactique.

3) Détermination de l'extrait Sec et de l'Humidité (H%)

L'extrait sec total a été déterminé par dessiccation à l'étuve à $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ d'une masse de 5g de pate de fromage.

Les annexes

Annexe 5



Etapes de fabrication de la pate de fromage pressée a base de l'extrait enzymatique bovin et la présure commerciale (LFB)

Les annexes

Annexe 6

Table de Kramer

Nombre de dégustateurs	2	3	4	5
3				3-9
4		4-8	4-11	5-13
5		5-11	6-14	7-17
6	6-9	7-13	8-17	10-20
7	7-11	9-15	11-19	12-24
8	8-13	10-18	13-22	15-27
9	10-14	12-20	15-25	17-31
10	11-16	14-22	17-28	20-34
11	12-18	16-24	19-31	23-37
12	14-19	18-26	21-34	25-41
13	15-21	19-29	24-36	28-44
14	17-22	21-31	26-39	31-47
15	18-24	23-35	28-42	33-51
16	19-26	25-35	30-45	36-54
17	21-27	27-37	33-47	39-57
18	22-29	28-40	35-50	41-61

Annexe 7

Résultats du test sensoriel appliqué à l'évaluation de l'aspect et la texture de la pate de fromage fabriqué à base de présure commerciale et d'extrait enzymatique de bovin adulte

Panelistes	Pate de fromage présure (Temoin)		Pate de fromage extrait bovin (expérimental)	
	Score	Rang	Score	Rang
1	1	1,5	1	1,5
2	1	*-+1	2	2
3	2	2	1	1
4	1	1,5	1	1,5
5	2	1,5	2	1,5
6	1	1	2	2
7	2	1	3	2
8	2	2	1	1
Score moyen	1,5		1,6	
Somme des rangs		11,5		12,5