

*REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE*  
*MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE*  
*UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU*  
*FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET*  
*DES SCIENCES AGRONOMIQUES*  
*Département biochimie-microbiologie*



# Mémoire de fin d'études

*Présenté en vue de l'obtention du diplôme de master*  
*Option : Alimentation humaine et qualité des produits*

## *Thème*

Analyse physico-chimiques de  
quelques denrées alimentaire

**Présenté par :**

*M<sup>elle</sup> ACHAB Nadia*  
*M<sup>elle</sup> FAREZ Ouiza*

**Devant le jury :**

*Président: M<sup>r</sup> MATI. A ; Professeur à UMMTO*

*Promotrice: M<sup>elle</sup> ISSALNANE .S ; Doctorat*

**Examineurs (trices) :**

*M<sup>r</sup> Bouazza .B ; Maitre assistant classe A à UMMTO*

*M<sup>me</sup> GHEZALI-SENOUSSI. C. Maitre assistante classe B à UMMTO*

*Promotion 2014-2015*



# Dédicaces



Tout au début, je tiens à remercier le bon dieu de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Ma chère mère qui m'a appris d'être femme et qui m'a beaucoup aidé dans mes études, pour les sacrifices qu'elle a faits pour notre éducation et la confiance et l'amour qu'elle m'a toujours accordés.

Mon cher père que j'aime beaucoup et qui a veillé à ma réussite en déployant tous les efforts nécessaires. Que Dieux vous bénisse, vous protège et vous garde le plus longtemps avec nous.

Mes adorables frères (Mebarek, Mouloud, Amar, Samir, Nabil) et sœurs (Samia et feroudja), sincère affection que Dieux vous accorde sa grâce et vous guide dans le droit chemin. Je vous remercie éternellement

Mes belles sœurs Gala et Hamida et leurs familles.

Mes nièces : Sofia, Ouardia et Amina.

Aux anges de la famille : Samy, Lina et secourra.

Mes tentes, leurs maris et leurs enfants.

Mes cousins leurs femmes et leurs enfants

Mes très chers amis et amies qui me redonnent toujours confiance en moi.

A tous ceux qui m'ont soutenu et aidé pour la réalisation de ce modeste travail et tous ceux qui me son.



Nadia





# Dédicaces

## Dédicaces



### *A Mes Très Chers Parents*

*Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.*

### *A mes chères frères et sœurs*

*Vous m'aviez toujours aidé et ces quelques lignes sont insuffisantes pour exprimer mon profond amour et ma reconnaissance pour les honorables services soutenus. Que ce mémoire vous traduise ma profonde affection.*

### *A mon très cher fiancé*

*Qui n'a épargné aucun effort pour m'aider. Ses encouragements, son soutien, son amitié et surtout son humour me permet de vivre et de prendre tout le recul nécessaire face aux situations difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.*

### *A ma grande famille*

*En témoignage de mon respect et de mon amour.*

### *A mes amies et amis*

*En souvenir des agréables moments partagés*



*Quiza*



## Remerciements

*Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de finaliser se travail dans de meilleurs conditions.*

*Nous tenons à exprimer toute nos gratitudees et nos sincères remerciements à Monsieur MATI A., professeur en biochimie appliquée à l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi Ouzou, pour nous avoir accueillis dans son laboratoire de recherche biochimie analytique et biotechnologies(LABAB) en nous proposons ce travail et qui a mis à notre disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nos sincères remerciements vont également à notre promotrice Melle ISSALNANE Souad qu'elle nous soit permise de la remercier vivement, et lui exprimer notre profonde gratitude pour l'aide précieuse et les conseils qu'elle nous sans cesse prodigué afin de mener à terme ce travail. Tout ce travail lui doit beaucoup, elle nous avons initié à la recherche et nous avons transmis ses connaissances. Nous lui rendons hommage pour avoir lutte avec nous devant toutes les entraves afin que notre travail soit mené à de meilleurs résultats. Tous nos enseignants trouvent ici l'expression de notre profond respect.*

*Un grand merci à tous les membres du laboratoire de biochimie qui grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur, nous ont soutenu en rendant agréables les moments de travail.*

*Nous exprimons nos respectueux dévouements aux membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce travail :*

- ✓ *M<sup>r</sup> MATI Abderrahmane : Professeur à UMMTO ;*
- ✓ *M<sup>r</sup> Bouazza Belaid : Maitre assistant classe A à UMMTO ;*
- ✓ *M<sup>elle</sup> ISSALNANE Souad : Magister à UMMTO ;*
- ✓ *M<sup>me</sup> GHEZALI-SENOUSSI Chahra : Maitre assistante classe B à UMMTO*

*Nous tenons à remercier aussi très chaleureusement les personnels de la bibliothèque.*

*Enfin, nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail Qu'ils trouvent ici l'expression de toute notre reconnaissance et notre noble gratitude.*

# *Sommaire*

## SOMMAIRE

	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>I.</b>	<b>Synthèse des données bibliographiques</b>	<b>2</b>
1.1.	Aperçu sur le lait	2
1.2.	Coagulation du lait	3
1.3.	Les enzymes coagulants utilisés en technologie fromagère	4
1.3.1.	Les enzymes d'origine animale	5
1.3.1.1.	La présure	5
1.3.1.1.1.	La chymosine	5
1.3.1.1.2.	La pepsine	7
1.3.1.2.	Autres pepsine d'origine animale	8
1.3.1.3.	Activation des zymogènes	11
1.3.1.4.	Structure de la chymosine et de la pepsine	12
1.3.1.5.	Extraction et purification des enzymes coagulantes d'origine animale	13
1.3.2.	La chymosine produit par génie génétique (enzymes fermentaire)	15
1.3.2.1.	Caractéristiques de la chymosine fermentaire	15
1.3.2.2.	Avantage des enzymes fermentaire	16
1.3.2.3.	Stratégie de clonage de la chymosine	16
	<b>Conclusion</b>	<b>19</b>
	<b>Introduction</b>	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>21</b>
2.1.	Matériels	21
2.2.	Méthodes	21
2.2.1.	Dosage de la vitamine C dans un jus	21
2.2.1.1.	Principe de la méthode	21
2.2.2.	Dosage des protéines: méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951)	22
2.2.2.1.	Principe de la méthode	22
2.2.3.	Dosage des glucides (méthode utilisant l'acide 3,5 Dinitrosalycilique (DNS))	23
2.2.3.1.	Principe de la méthode	23
2.2.4.	Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse	24

2.2.4.1.	Détermination de l'indice d'acide	24
2.2.4.2.	Détermination de l'indice d'iode	24
2.2.5.	Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne	25
2.2.5.1.	Conditions expérimentales	25
2.2.6.	Fractionnement des protéines individuelles sur chromatographie basse pression	25
2.2.6.1.	Chromatographie de perméation sur gel de séphacryl S200	26
2.2.6.1.1.	Principe de la méthode	26
2.2.7.	Méthodes électrophorétiques	26
2.2.7.1.	Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturante (PAGE native)	27
2.2.7.2.	Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de SDS et de 2-Mercapto-éthanol (PAGE SDS)	27
<b>3.</b>	<b>Résultats et discussions</b>	<b>29</b>
3.1.	Teneur en vitamine C dans un jus d'orange	29
3.2.	Dosage des protéines : méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951)	30
3.3.	Dosage des glucides (méthode utilisant l'acide 3,5 Dinitrosalicylique (DNS))	31
3.4.	Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse	32
3.4.1.	Détermination de l'indice d'acide	32
3.4.2.	Détermination de l'indice d'iode	33
3.5.	Hydrolyse enzymatique des protéines du lait et de l'œuf par la papaïne	34
3.5.1.	Le comportement électrophorétiques des hydrolysats des caséines du lait de vache	34
3.5.2.	Le comportement électrophorétiques des protéines totale de l'œuf	35
3.6.	Isolement des protéines sériques cameline et bovines par chromatographie de perméation suivie d'un contrôle électrophorétique	36
	Conclusion	40
	Références bibliographiques	
	Annexes	

## Liste des figures

<b>N° de figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	<b>Représentation du mode d'action de la chymosine sur caséine kappa.</b>	<b>04</b>
<b>02</b>	<b>Processus de formation de la chymosine active par libération des différents segments polypeptidiques.</b>	<b>11</b>
<b>03</b>	<b>Structure tridimensionnelle (a) : la pepsinogène porcin; (b) : la chymosine bovine.</b>	<b>13</b>
<b>04</b>	<b>Procédé de fabrication de la présure d'origine animale.</b>	<b>14</b>
<b>05</b>	<b>Stratégie de clonage de la chymosine.</b>	<b>18</b>
<b>06</b>	<b>Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY.</b>	<b>22</b>
<b>07</b>	<b>Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs.</b>	<b>23</b>
<b>08</b>	<b>Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du glucose comme standard.</b>	<b>23</b>
<b>09</b>	<b>Les étapes suivies pour l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne. CN: Caséines ; PS : protéines du lactosérum.</b>	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>Photographie d'une unité de chromatographie basse pression (LABAB UMMTO).</b>	<b>26</b>
<b>11</b>	<b>Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260).</b>	<b>27</b>
<b>12</b>	<b>La structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS).</b>	<b>28</b>
<b>13</b>	<b>Les teneurs en vitamine C dans les jus d'orange.</b>	<b>29</b>
<b>14</b>	<b>Concentration en protéines dans le lait de vache et le jus lacté.</b>	<b>30</b>
<b>15</b>	<b>Concentration en glucide dans différents types de jus.</b>	<b>31</b>
<b>16</b>	<b>L'indice d'acides des échantillons de matières grasses différentes.</b>	<b>32</b>
<b>17</b>	<b>Indice d'iode des échantillons de matières grasses différentes.</b>	<b>33</b>

18	<b>Electrophorègramme des caséines du lait de vache en PAGE-SDS (Gel de séparation : T = 17 % ; C = 2.7 % ; gel de concentration : T = 4 % ; C = 2.7 % ; Temps d'incubation en minute : T'0, T'15, T'30, T'60, T'120.</b>	35
19	<b>Electrophorègramme en PAGE-SDS des hydrolysats protéiques libérés après l'action de la papaine sur les protéines totale de l'œuf. Temps d'incubation en minute. T'0, T'15, T'30, T'60, T'120.</b>	36
20	<b>Chromatogramme d'isolement des protéines sérique du lait de chamelle sur gel de sephacryl S200 ; Colonne (20 x 1 cm) ; tampon Tris HCL 0,02 M ; pH 8.4, débit : 1,5ml/mn, fractions éluées : F1, F2, F3, F4, F5.</b>	37
21	<b>Profil électrophorétiques en PAGE-Native des fractions de protéine sérique cameline éluées en chromatographie de perméation T= 12% ; protéines sériques bovines.F1, F2, F3 et F4</b>	38
22	<b>Chromatogramme des protéines sériques camelines obtenu sur colonne (1 x 20 cm) de Sephacryl S200 en milieu Tris-HCl 0.02 M, pH 8.4 et débit : 1,5 ml/mn, F1 ; F2, F3 et F4 : fractions éluées.</b>	39
23	<b>Profil électrophorétiques en PAGE-Native des fractions des protéines sériques bovines en chromatographie de perméation T=12% ; A : le témoin (le marqueur) du lait bovin. F1, F2, F3 et F4 : les fractions éluées.</b>	39

## Liste des tableaux

<b>N° du tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	<b>La composition des divers types de lait utilisés en fromagerie dans le bassin méditerranéen.</b>	<b>02</b>
<b>II</b>	<b>Caractéristiques physico-chimiques de la chymosine de diverses espèces animales.</b>	<b>06</b>
<b>III</b>	<b>Caractéristiques physico-chimiques de la pepsine de diverses espèces animales.</b>	<b>07</b>
<b>IV</b>	<b>Caractéristiques physico-chimiques de la chymosine fermentaire</b>	<b>16</b>
<b>V</b>	<b>Indice d'iode et nombre d'insaturations de différents échantillons étudiés.</b>	<b>33</b>

### Liste des abréviations

<b>Abréviations</b>	<b>Désignation</b>
<b>Aa</b>	Acide aminée
<b>APS</b>	Persulfate d'ammonium ; « Ammonium Persulfat »
<b>DCPIP</b>	Dichlorophénol indophénol
<b>DNS</b>	3,5-dinitrosalicylique
<b><math>\alpha</math>-La</b>	$\alpha$ -Lactalbumine
<b><math>\alpha</math>S-CN</b>	Caséine $\alpha$ S
<b><math>\beta</math>-CN</b>	Caséine $\beta$
<b>k-CN</b>	Caséine k
<b>BBP</b>	Bleu de bromophénol
<b>BSA</b>	Albumine sérique bovine ; « Bovin SerumAlbumin »
<b>CMP</b>	Caséinomacropéptide
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramme
<b>2-ME</b>	2-mercaptoéthanol
<b>DO</b>	Densité optique
<b>FAO</b>	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture ; « Food and Agriculture Organization »
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>kDa</b>	Kilo dalton
<b>LABAB</b>	Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies
<b>M</b>	Molaire
<b>MM</b>	Masse molaire
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>PAGE</b>	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ; « PolyAcrylamid Gel Electrophoresis »
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>pHi</b>	pH isoélectrique
<b>PM</b>	Poids moléculaire



### Liste des annexes

<b>Annexes</b>	<b>Titre</b>
<b>Annexe 01</b>	<b>Expression de la chymosine de différentes espèces animales dans différents hôtes microbiens.</b>
<b>Annexe 02</b>	<b>Détermination de la teneur en vitamine C par la méthode utilisant le DCPIP</b>
<b>Annexe 03</b>	<b>Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse</b>
<b>Annexe 04</b>	<b>Dosage des glucides, méthode utilisant l'acide DNS</b>
<b>Annexe 05</b>	<b>Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY</b>
<b>Annexe 06</b>	<b>Hydrolyse enzymatique des caséines de lait de vache et des protéines totale de l'œuf par la papaine.</b>
<b>Annexe 07</b>	<b>Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)</b>
<b>Annexe 08</b>	<b>Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)</b>

## **Résumé**

La chymosine, est une enzyme utilisée dans l'industrie fromagère pour coaguler le lait, elle est traditionnellement extraite à partir du quatrième estomac de veaux non sevrés. La préparation ainsi obtenue dénommée présure a été depuis un certain nombre d'années substituée par divers coagulants d'origine microbienne et de plantes car la production de cette enzyme seule n'était plus capable de répondre à la demande mondiale du fait notamment de l'augmentation de la production fromagère.

La chymosine est cependant toujours considérée comme étant la meilleure enzyme pour coaguler le lait dans l'industrie fromagère. Ainsi, les techniques d'ingénierie génétique ont été utilisées pour produire de la chymosine bovine recombinante qui permettent l'innovation technologique et contribuent au maintien et au développement d'entreprises agro-alimentaires et des pays du Marché Economique.

## **Abstract:**

Chymosin, an enzyme used in cheese manufactures as a milk-clotting agent, is traditionally prepared from the fourth stomach of enweaved calves. This crude preparation called rennet has been substituted by microbial and plant coagulants for years since chymosine production was unable to satisfy the world demand especially due to the increase of cheese production.

However, chymosin still remains the better milk-clotting enzyme. Thus, genetic engineering techniques are used to produce recombinant bovine chymosin. Using these techniques, we propose to establish the conditions for production of recombinant bovine chymosin, allowing technological innovation and contributing to the development of food industry.

*Etude  
bibliographique*

# *Introduction*

## **Introduction**

Le lait occupe une place stratégique dans l'alimentation quotidienne de l'homme, de par sa composition équilibrée en nutriments de base (protéines, glucides et lipides) et sa richesse en vitamines et en minéraux, notamment en calcium alimentaire. De nos jours, les besoins en lait sont de plus en plus importants vu que ce produit peut être consommé à l'état frais, mais aussi sous forme pasteurisé, stérilisé ou transformé en produits dérivés (fromage).

L'Algérie connaît un développement notable du secteur laitier où la consommation du lait et produits laitiers a augmenté de 2.7 million de tonne en 1990 à 3.4 million de tonne en 2004.

La production fromagère a atteint 1540 tonne en l'an 2000 avec une consommation moyenne de 0.7 kg/personne/an (FAO).

L'étape clé de la réussite d'un fromage quel que soit son type est la coagulation. Elle consiste à la formation d'un gel suite à des modifications physico-chimique intervenant sur les micelles de caséines du lait. L'agent coagulant le plus anciennement utilisé en fromagerie est la présure. Cette enzyme est extraite à partir de la caillette de veau non sevré.

L'augmentation de la production et de la consommation du fromage d'une part, et l'impossibilité d'augmenter, en parallèle, la production de présure d'autre part, ont causé une pénurie mondiale en approvisionnement en cet agent coagulant ce qui a engendré des fluctuations très importantes dans son prix.

Plusieurs succédanés de différentes origines (animale, végétale, microbienne, ou élaborés par génie génétique) ont été proposés pour substituer cette présure. De nombreux travaux ont montré que l'activité protéolytique de la plupart de ces succédanés induit des modalités de coagulation, d'égouttage et d'affinage différentes, ce qui implique une adaptation des procédés classiques utilisés dans la fabrication du fromage.

Dans cette optique, nous nous sommes proposé, de voir quelles sont les enzymes coagulante d'origine animale et fermentaire utilisées dans la fabrication de fromage.

## **Introduction**

Le lait occupe une place stratégique dans l'alimentation quotidienne de l'homme, de par sa composition équilibrée en nutriments de base (protéines, glucides et lipides) et sa richesse en vitamines et en minéraux, notamment en calcium alimentaire. De nos jours, les besoins en lait sont de plus en plus importants vu que ce produit peut être consommé à l'état frais, mais aussi sous forme pasteurisé, stérilisé ou transformé en produits dérivés (fromage).

L'Algérie connaît un développement notable du secteur laitier où la consommation de lait et produits laitiers a augmenté de 2.7 million de tonnes en 1990 à 3.4 million de tonnes en 2004. La production fromagère a atteint 1540 tonnes en l'an 2000 avec une consommation moyenne de 0.7 kg/personne/an (FAO).

L'étape clé de la réussite d'un fromage quel que soit son type est la coagulation. Elle consiste à la formation d'un gel suite à des modifications physico-chimiques intervenant sur les micelles de caséines du lait. L'agent coagulant le plus anciennement utilisé en fromagerie est la présure. Cette enzyme est extraite à partir de la caillette de veau non sevré.

L'augmentation de la production et de la consommation du fromage d'une part, et l'impossibilité d'augmenter, en parallèle, la production de présure d'autre part, ont causé une pénurie mondiale en approvisionnement en cet agent coagulant ce qui a engendré des fluctuations très importantes dans son prix.

Plusieurs succédanés de différentes origines (animale, végétale, microbienne, ou élaborés par génie génétique) ont été proposés pour substituer cette présure. De nombreux travaux ont montré que l'activité protéolytique de la plupart de ces succédanés induit des modalités de coagulation, d'égouttage et d'affinage différentes, ce qui implique une adaptation des procédés classiques utilisés dans la fabrication du fromage.

Dans cette optique, nous nous sommes proposé, de voir quelles sont les enzymes coagulantes d'origines animale et fermentaire utilisées dans la fabrication de fromage.

## I. Synthèse des données bibliographiques

### 1.1. Aperçu sur le lait

La composition du lait est caractérisée par une grande complexité dans la nature et la forme de ses composants ces derniers sont aussi variés selon la race, l'âge, l'alimentation, la saison et le moment de la traite (MARTIN *et al*, 1995 ; KREVZET *et al*, 1996), ceux-ci sont particulièrement adaptés aux besoins nutritionnels et aux possibilités digestives du jeune animal qui y trouve tous les éléments nécessaires à sa croissance. Quatre composants sont dominants du point de vue quantitatif: l'eau, les matières grasses, les protéines et le lactose; les composés mineurs sont représentés par les matières minérales, les enzymes, les vitamines et les gaz dissous.

La matière azotée du lait est divisée en deux parties : la matière azotée protéique soit 95% de l'azote total et 5 % de la matière azotée non protéique (NPN).

En fonction du pH, les protéines du lait peuvent être réparties en deux catégories ; les caséines (insolubles à pH 4,6) et les protéines du lactosérum (solubles à pH 4,6) (GUILLOU *et al*, 1986). La caséine entière représente 80% des protéines du lait de vache et se présente sous une forme micellaire. La micelle est formée par l'association des caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  et de composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphate. Toutes les micelles n'ont pas les mêmes dimensions, ni la même composition. Les grosses micelles ont une charge minérale plus élevée et des proportions relatives de caséines  $\beta$  et  $\kappa$  plus faibles que les petites (BRULE *et al*, 1997). La caséine  $\kappa$ , bien que non majoritaire dans la micelle est de loin la protéine laitière la plus étudiée car elle détient le rôle clef dans la coagulation du lait par la présure (CREAMER, 2002).

En pratique le lait a pour fonction d'être non seulement un aliment exclusif des jeunes mais est présent dans l'alimentation humaine et la transformation industrielle (ALAIS, 1984) cas des industries fromagères. Le tableau 1 représente la composition des divers types de lait utilisés en fromagerie dans le bassin méditerranéen.

**Tableau I: la composition des divers types de lait utilisés en fromagerie dans le bassin méditerranéen (RAMET, 2011).**

%	EAU	Matière sèche totale	Matière grasses	Matière azotées	lactose	minéraux	Caséine% matières azotées
vache	87,3	12,7	3,8	3,3	4,7	0,9	78
chèvre	87,1	12,9	4,1	3,5	4,5	0,8	75
brebis	81,0	19,0	7,5	6,0	4,6	0,9	77
chamelle	87,4	12,6	3,6	3,6	4,7	0,7	72
bufflesse	84,5	15,5	6,7	3,9	4,1	0,8	80

## 1.2. Coagulation du lait

La coagulation du lait constitue une étape déterminante dans le processus de fabrication d'un fromage. Il s'agit de transformation du lait liquide en un gel appelé aussi coagulum ou caillé. Elle peut être obtenue par action de la présure, abaissement du pH ou par action mixte.

### 1.2.1. La coagulation du lait par la présure

La présure est une enzyme protéolytique utilisée pour la fabrication des fromages affinés (types Cheddar, Emmenthal, etc.). Son substrat spécifique est la caséine  $\kappa$ , qui coupe la liaison Phénylalanine-Méthionine entre les résidus 105 et 106. Cette protéolyse conduit à une déstabilisation de la caséine micellaire et libère deux molécules ; la paracaseine  $\kappa$  et un macropeptide ou caséinoglycopeptide soluble, renfermant 20 à 30% de glucide et une séquence de 64 acides aminés (CHEESMAN, 1981 ; LENOIR, 1985).

Cette action spécifique accentuée par la présence de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et du phosphore (P) est dite réaction primaire. Elle est très rapide et constitue avec la réaction tertiaire, non spécifique, le premier stade enzymatique de la coagulation du lait (WIGLEY, 1996 ; SOUSA et MALCATA, 1997 ; VIERLING, 2003).

#### 1.2.1.1. Mécanisme de la coagulation

La coagulation du lait par la présure se déroule en trois étapes désignées communément par :

- Phase primaire ou enzymatique ;
- Phase secondaire ou d'agrégation des micelles déstabilisées ;
- Phase tertiaire ou phase de réticulation (MAHAUT *et al*, 2003).

Une phase primaire, enzymatique, au cours de laquelle la présure hydrolyse la caséine  $\kappa$  au niveau de la liaison peptidique Phe105-Met106. Cette action coupe la molécule de la caséine  $\kappa$  en deux fragments peptidiques ; le caséinomacropeptide (CMP) (hydrophile) ou s'il est fortement glycosylé est dénommé glycomacropeptide (GMP) et la paracaseine  $\kappa$  (PCK) (hydrophobe). Cette hydrolyse entraîne une réduction de la charge négative et des répulsions stérique de telle sorte que les micelles de caséines deviennent susceptibles à l'agrégation (LUCY, 2002).

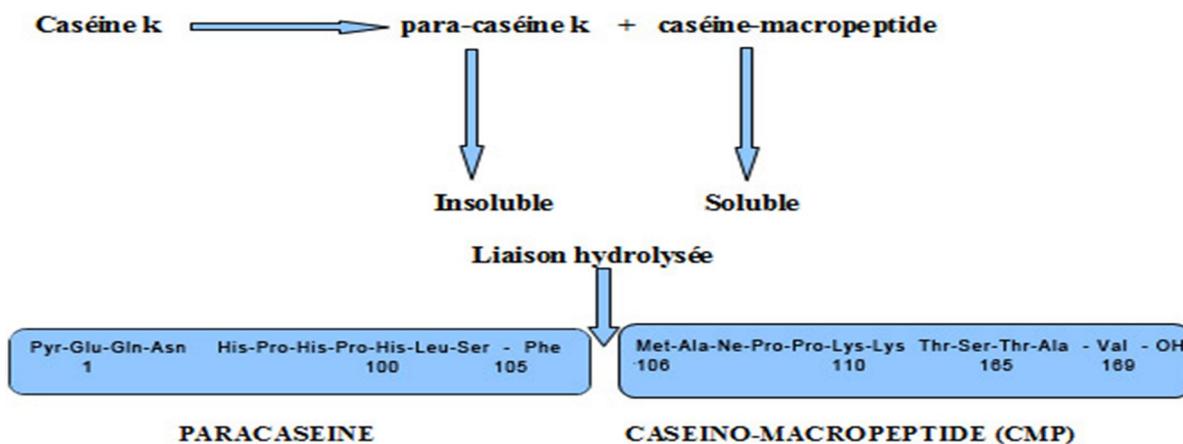


Figure 1 : Représentation du mode d'action de la chymosine sur la caséine kappa.

Une phase secondaire, agrégation, durant laquelle la libération du macropeptide de la caséine  $\kappa$  sous l'action de la protéase employée entraîne la réduction des répulsions électrostatiques entre les micelles de caséine hydrolysées. L'élimination de ces macropeptides entraîne également une réduction de diamètre hydrodynamique (d'environ 5 nm) et une perte de la stabilité stérique (WALSTRA *et al*, 1981).

La nature des interactions intervenant durant la phase d'agrégation n'est pas encore bien connue, toutefois les pores calciques et les forces de Van der Waals ainsi que les interactions hydrophobes semblent impliqués (SCHMIDT, 1982). Les micelles déstabilisées s'agrègent en présence des ions calcium libre ( $Ca^{2+}$ ) et la coagulation se produit seulement en présence d'une quantité suffisante de phosphate de calcium colloïdale (LUCEY et FOX, 1993). Au début, il y a formation de chaîne linéaire de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas. Ces derniers font constituer le gel protéique qui se sépare nettement de la phase liquide ou lactosérum (LUCEY, 2002).

La réaction tertiaire consiste en une protéolyse générale, elle n'intervient pas directement dans le phénomène de la coagulation proprement dit. C'est une réaction lente et non spécifique car elle concerne toutes les caséines. Elle débute lentement avec la réaction primaire et se poursuit durant l'affinage (ALAIS et BLANK, 1975).

Durant le phénomène de coagulation, les trois réactions démarrent en même temps mais, à chaque étape une réaction prédomine par rapport aux deux autres.

### **1.2.2. La coagulation du lait par abaissement du pH**

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ( $pH_i=4,6$ ) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par acidification chimique (injection de  $CO_2$ ) ou encore par ajout de protéines sériques à pH acide.

L'acidification entraîne une diminution des charges négatives des micelles et donc une diminution de la couche d'hydratation et des répulsions électrostatiques, ainsi qu'une solubilisation du calcium et du phosphore minéral, entraînant une destruction des micelles de caséine avec réorganisation protéique pour former un réseau puis un gel à pH 4,6 (MAHAUT *et al*, 2003).

### **1.2.3. La coagulation mixte**

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. Cette méthode est utilisée pour l'obtention de fromages frais (petit-suisse, demi-sel) et de fromages à pâte molle (camembert) (GREEN, 1984 ; CHEFTEL, 1980 ; WIGLEY, 1996 ; MAHAUT *et al*, 2003).

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

## **1.3. Les enzymes coagulants utilisés en technologie fromagère**

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire. Traditionnellement, l'enzyme protéolytique utilisée

est la présure. L'utilisation de succédanés d'origine animale, végétale et microbienne s'est développée au courant des trente dernières années et cela pour des raisons économiques, religieuses ou culturelles (DALGLEISH, 1997).

### **1.3.1. Les enzymes d'origine animale**

Les enzymes coagulants d'origine animale sont des protéases gastriques. Ils appartiennent à la catégorie des endopeptidases actives à pH acide appelés protéases à aspartame ou encore protéases acides (PELMONT, 1993).

Les plus employés sont la présure, constituée principalement de chymosine (EC 3.4.23.4) et de pepsine (EC 3.4.23.1), d'origine bovine. Ces protéases sont formées à partir d'un précurseur (zymogène), forme inactive, secrété par la muqueuse gastrique (RICHTER *et al*, 1998).

#### **1.3.1.1. La présure**

La dénomination présure est réservée à l'extrait coagulant provenant de la caillette du veau nourris exclusivement au lait (avant sevrage) (ECK et GILLIS, 1997). Elle contient deux fractions actives, l'une majeure, constituée par la chymosine, l'autre mineure, par la pepsine avec un rapport de masse chymosine/pepsine  $\geq 1,38$ . Au pH du lait (6,2-6,6), la chymosine représente plus de 80% de l'activité coagulante (ANDREN, 2002).

##### **1.3.1.1.1. La chymosine**

La chymosine (EC 3.4.23.4) est une enzyme néonatale possédant une forte activité coagulante. C'est une protéine globulaire constituée d'une seule chaîne polypeptidique. C'est une holoprotéine, de 35 kDa, appartenant au groupe des protéases acides. Elle comporte 323 acides aminés (SCRIBAN, 1993).

Dans la caillette, elle est secrétée sous forme inactive appelée prochymosine. Sous l'action de l'acidité gastrique, elle devient active. Elle est stable au pH acide (5,3 à 6,3) ; Elle est inactivée au pH basique vers 7,5 et dénaturé à pH 8,0. L'inactivation thermique a lieu dès 50 °C, elle est totale à 61 °C (SCRIBAN, 1999).

L'enzyme existe sous trois formes principales : A, B et C dont la B est la plus abondante. Les chymosine A et B diffèrent au niveau de leur séquence par un seul résidu amino acide à la position 244 ; le zymogène A possède un résidu d'acide aspartique, contre un résidu glycine pour le zymogène B (FOLTMANN *et al*, 1977). La prochymosine C semble être un produit de dégradation de la forme A, avec perte de trois résidus de la position Asp286 à Phe288 (DANLEY et GOEGHEGAN, 1988).

La chymosine A possède une activité coagulante 30% supérieure à celle de la chymosine B. Les deux variantes possèdent des propriétés fromagères similaires (ANDREN, 2002 ; HARBOE *et al*, 2010).

La chymosine est relativement plus stable à 2° C (FOLTMANN, 1992) et en dessous de 50° C (SHINDO et ARIMA, 1979) par rapport à la température ambiante. KAWAGUCHI *et al*, (1987) ont également observé la perte rapide d'activité de la chymosine lorsque la température a été augmentée à 45 - 55 °C. Il a été suggéré que la photo-oxydation de l'histidine et la modification du groupe amine de lysine pourraient affecter l'activité de la

chymosine dans une certaine mesure (HILL et LAING, 1965; SMITH *et al*, 1991a; 1991b). La chymosine perd la moitié de son activité après incubation dans l'urée 4,6 M à 37 °C pendant 30 minutes (SUGRUE *et al*, 1990).

ELAGAMY (2000) a signalé la résistance de la chymosine de chameau à la chaleur élevée en comparaison aux chymosine bovins et du buffle. Selon MOHANTY et COLL (2003) la chymosine des bisons est stable jusqu'à 50 °C et son rapport d'activité coagulante du lait est du 50% à 60° C, alors que la chymosine de chèvre reste stable jusqu'à 55 °C (KUMAR *et al*, 2006).

La chymosine est plus stable à des valeurs de pH comprise entre 5,3 - 6.3 et relativement à pH 2 (FOLTMANN, 1992). Dans des conditions acides (pH 3 ± 4) l'enzyme perd son activité rapidement, cela probablement causée par l'auto-dégradation, tandis que pour des valeurs de pH alcalin (ci-dessus 9.8), la perte est due à un changement de conformation irréversible (CHEESEMAN, 1981). La perte d'activité de la chymosine A est plus élevé que la chymosine B (FOLTMANN, 1966). La chymosine dans une forme cristalline, semble être très stable (FOLTMANN, 1992).

La prochymosine est plus stable que la chymosine au pH neutre (FOLTMANN, 1966). A des valeurs de pH inférieures à 5,0 la prochymosine est convertie en chymosine tandis qu'à des valeurs de pH en dessus de 11,0 la stabilité de la prochymosine est perdue en raison d'un changement de conformation (FOLTMANN, 1992).

La pseudo-chymosine est stable à pH acide pendant des jours mais se convertie rapidement en chymosine si le pH est augmenté au-dessus de 4,5 (CHEESEMAN, 1981).

Le tableau II résume les principales caractéristiques physico-chimiques de la chymosine de diverses espèces animales.

**Tableau II. Caractéristiques physico-chimiques de la chymosine de diverses espèces animales.**

coagulant	espèces	MM (kDa)	Nombre d'isoformes	pH optimum	Température optimum °C	pHi	références
<b>chymosine</b>	bovin	36	3	5,5- 6	20-50	4,5-5,0	BAUDYS <i>et al</i> , 1988 ; FOLTMAN, 1993
	Camelin	52- 39	-	5,8- 6	50	-	ELAGAMY <i>et al</i> , 2000
	Caprin	36	2 à 3	5,5- 6	56 à pH 5,5 46 à pH 6,6	4,6-6,1	KUMAR <i>et al</i> , 2006 ; MOSCH OPOULOU <i>et al</i> , 2006
	Ovin	36±1	-	-	-	4,8	BAUDYS <i>et al</i> , 1988
	buffle	35, 6	3	5,5	55 à pH 5,5	-	MOHANTY <i>et al</i> , 2003

### 1.3.1.1.2. La pepsine

La pepsine est le constituant mineur de la présure (RAMET, 1997). C'est une protéase acide présente dans le suc gastrique de tous les mammifères et les oiseaux. L'une de ses remarquables caractéristiques est sa grande activité dans cet environnement acide.

Elle est relativement stable à des valeurs de pH comprise entre 5,0 et 5,5 et instable à pH 2. Son activité enzymatique est plus élevée entre pH 1 et pH 4 avec un maximum vers pH 1,8 et varie selon la nature du substrat (ALAIS, 1984). C'est une enzyme thermosensible en solution après 55°C. Elle est dénaturée à des températures supérieures à 70°C (GRAIDAY, 1978). A l'opposé de la chymosine, la pepsine possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante (ABDELLAOUI, 2007). Le tableau III résume les principales caractéristiques physico-chimiques de la pepsine de diverses espèces animales.

Elle hydrolyse la plupart des protéines naturelles telles que la caséine, la globuline, et certaines enzymes telles que la trypsine, la papaïne et les amylases. Elle coupe préférentiellement après la L Phénylalanine ou la L-Tyrosine (YAMAMOTO, 1975).

La pepsine A (327 acides aminés (aa) ; poids moléculaire (PM) 33 370 Da) est produite par le suc gastrique à l'état de pepsinogène inactive de PM 42000 Da et de pHi 3,7 et comporte 371 acides aminés. Elle peut s'activer de façon auto catalytique en pepsine par perte de 44 aa de côté N-terminal (PELMONT, 1993).

La pepsine B (EC 3.4.23.2) est produite par la muqueuse gastrique du porc (NIELSEN et FOLTMANN, 1995) et du chien (NARITA *et al*, 2002). Elle n'a jamais été retrouvée chez les autres espèces telles que le bovin (KAGEYAMA, 2006).

La pepsine C (EC 3.4.23.3) ou gastricine est composée de 374 résidus d'acides aminés avec un PM de 40 kDa (HASSAN *et al*, 2010). Après clivage du peptide signal (43 acides aminés), l'enzyme mature de 331 résidus a une masse moléculaire de 32,8 kDa chez le bovin (MARTIN *et al*, 1982). Elle est synthétisée en faible quantité, chez les mammifères on la trouve associée à la chymosine à la pepsine A (FOLTMANN, 1995).

**Tableau III. Caractéristiques physico-chimique de la pepsine de diverses espèces animales.**

coagulant	espèces	MM (kDa)	Nombre d'isoformes	pH optimum	Température optimum °C	pHi	références
<b>pepsine</b>	bovin	33	4	1,5- 2,2	40	3,0	MARTIN, 1984 ; RAMPILLI <i>et al</i> , 2005
	Camelin	34, 5- 35,5	2	1,8	-	-	ABOUHAEFEEL et ABUERESH, 1984 ; AL-MAZAIEN, 2007
	Caprin	39- 41	A : 3 C : 2	-	-	3,0	SUZUKI <i>et al</i> , 1999 ; MOSCHOPOULOU <i>et al</i> , 2006
	Ovin	34-37	-	-	-	-	FOX <i>et al</i> , 1977 ; BAUDYS <i>et al</i> , 1988
	porcine	34,5	A, B, C, D	1,5- 2,2	-	-	TANG <i>et al</i> , 1973 ; CUVELLIER, 1993

### **1.3.1.2. Autres pepsines d'origine animale**

Des substituts de présure sont produits par plusieurs mammifères comme le dromadaire (ELAGAMY, 2000 ; SIBOUKEUR, 2005), le buffle (MOHANTY *et al*, 2003), le porc (FOX, 1969 ; MATHIEU, 1981), de poulet (GREEN *et al*, 1977), et même par les viscères de poissons (GUERARD, 1987). L'étude comparative des activités coagulantes et protéolytiques de ces enzymes a révélée qu'elles présentent des caractéristiques proches de celles de la présure (POLAINA et MACCABE, 2007).

De nombreuses protéases d'origine animale ont fait l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en fromagerie. Cependant toutes ne sont pas pour autant aptes à la fabrication fromagère ; seules les pepsines porcines et bovines présentent un intérêt industriel (ECK et GILLIS, 1997).

#### **1.3.1.2.1. La pepsine bovine**

C'est un des constituants mineurs normaux de la présure, (ALAIS, 1974 ; FOX, 1989 ; cité par ERNSTROM, 1983). La pepsine bovine est extraite à partir des caillottes d'animaux adultes et de veaux sevrés. L'extrait brut contient un pepsinogène majoritaire et plusieurs pepsinogènes mineurs qui donnent après activation à pH 2,0 la série de pepsines correspondant (HASSAN *et al*, 2010). ANTONINI et RIBADEAU-DUMAS (1971) ont pu révéler la présence d'une pepsine I et d'une pepsine II dans l'extrait activé de caillotte de bœuf, issus de deux zymogènes différents. La pepsine I est un constituant mineur. Les propriétés protéolytiques de la pepsine bovine sur les caséines sont plus semblables à celles de la chymosine (ERNSTROM et WONG, 1983 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992). En outre, son activité coagulante est moins dépendante du pH, contrairement à la pepsine porcine et elle provoque la coagulation du lait à pH 6,9 (ERNSTROM et WONG, 1983). L'activité protéolytique de la pepsine bovine est proche de celle de la présure. Elle est utilisée en fromagerie en mélange 50:50 avec la présure (RAMET, 1997).

#### **1.3.1.2.2. La pepsine porcine**

L'extraction et l'utilisation de la pepsine porcine ont débuté durant la première guerre mondiale pour pallier une pénurie de la présure, mais n'a été réellement utilisée à l'échelle industrielle qu'à partir des années 60.

La pepsine porcine est extraite de la muqueuse gastrique de porcs sous forme inactive, puis activée par acidification à pH 2 (ERNSTROM, 1983). L'extrait brut contient dans la majorité de la pepsine A et des composés mineurs correspondants aux pepsines B, C, D et à la gastricine (CUVELLIER, 1993). Les pepsines sont produites à partir de zymogènes différents.

La pepsine B et C provoquent la coagulation du lait mais beaucoup moins rapidement que la pepsine A majoritaire. Cependant, contrairement à la pepsine porcine A, elles sont relativement stables au pH 6,9. La pepsine D est très instable aux pH supérieurs à 6,0 et elle est deux fois plus active que la pepsine majoritaire dans la coagulation du lait (ERNSTROM et WONG, 1983).

L'activité catalytique de la pepsine porcine est élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat (ANTONINI et RIBADEAU-DUMAS, 1971).

Le principal inconvénient de la pepsine porcine comme agent coagulant du lait est le fait que son activité coagulante est fortement dépendante du pH. Aux valeurs de pH voisin de 6,5 et de température voisine de 30°C, utilisées en fromagerie, la pepsine porcine est partiellement dénaturée et après 1 heure, seulement 50% de son activité coagulante est maintenue (ANDREN, 2002). De plus l'emploi de la pepsine porcine présente pour la coagulation du lait des difficultés, à cause d'une activité protéolytique supérieure à celle de la présure, avec présence d'arrière-goût et d'amertume pour certains fromages (BRULE et LENOIR, 1997).

#### **1.3.1.2.3. La pepsine du poulet**

La pepsine du poulet est extraite du proventricule ou ventricule succenturié qui est un renflement fusiforme de 3 cm de long en moyenne, situé au-dessus du gésier (ALAMAREOT, 1982). Le pepsinogène de poulet et la pepsine correspondante ont été partiellement purifiés par HERRIOT, BARTZ et NORTHOP (1938). Il est composé de 387 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 43000 Da.

La pepsine est composée de 308 résidus d'acides aminés et un poids moléculaire de 35000 Da (BOHAK, 1969). Elle contient 39 groupements carboxyles libres et 16 groupements basiques alors que la pepsine porcine contient 40 groupements carboxyles libres et seulement 6 groupements basiques (BOHAK, 1969). Cette composition en acides aminés montre que la pepsine de poulet est moins acide que les autres pepsines étudiées. Le pepsinogène de poulet est stable à 24°C au-dessous de pH 10,5 alors que la pepsine de poulet est stable au-dessous de pH 8,0. A pH 8,5 et au-delà la pepsine de poulet est rapidement dénaturée.

Selon BOHAK(1969), l'activité catalytique de la pepsine de poulet est la plus élevée entre pH 1,5 et 4,5 avec un optimum à 2,8 en utilisant l'hémoglobine comme substrat. A pH 1,5, l'activité maximale atteint les 90% alors qu'à pH 4.5, elle est de 35%.

Plusieurs études ont été réalisées afin d'introduire la pepsine de poulet comme succédané de la présure. Des travaux de GREEN (1972) cité par MICHAEL ESKIN(1990), ont conduit à la fabrication de fromage de type cheddar à l'aide de la pepsine du poulet, mais le produit obtenu était de qualité inférieure, il présentait un corps mou, peu d'arômes et un arrière-goût assez prononcé due à une protéolyse excessive. D'autres travaux de GREEN *et al* (1984), ont montré que le cheddar préparé par un mélange de pepsine de poulet et de pepsine porcine était similaire à celui préparé par de la présure. GORDIN et ROSENTHAL (1978) ont utilisé la pepsine de poulet pour la fabrication de l'emmental et un autre fromage traditionnel de type KASHKAVAL, qui sont des fromages à pâte molle ; ils ont obtenu de meilleurs résultats et des fromages de qualité comparable à celles obtenues par la présure. Ils ont attribué cette différence aux conditions de production et spécialement à la température de 85°C nécessaire pour l'emmental contre 52°C lors de la cheddarisation; ce qui implique une inactivation de la pepsine et par conséquent une diminution de la protéolyse.

#### 1.3.1.2.4. La pepsine de poisson

Récemment, de nombreux auteurs se sont intéressés à l'extraction de l'enzyme coagulante à partir de l'estomac d'autres animaux, en l'occurrence l'extrait de la pepsine obtenue à partir de la paroi interne de l'estomac de la morue de l'Atlantique (BREWER *et al*, 1984), sardine (NODA et MURAKAMI, 1981), requin (NUNGARAY et LEGOFFIC, 1996), ainsi que celui de la muqueuse gastrique du phoque (SHAMSUZZAMAN, 1985 ; HAARD, 1985).

Selon GUÉRARD (1987), les enzymes protéolytiques extraites des viscères de poisson et en particulier les pepsines de roussette possèdent des activités intéressantes au plan de l'hydrolyse des caséines, notamment de la caséine  $\kappa$ . Cette hydrolyse constitue la phase primaire du processus de coagulation du lait.

Cependant, le caractère protéolytique plus marqué de la pepsine de roussette comparé à celui de la chymosine conduit également à une apparition renforcée de produits de dégradation des autres fractions de caséine notamment la caséine  $\alpha_1$  et  $\beta$  (GUÉRARD et LEGAL, 1986). Ce phénomène est susceptible d'engendrer, au cours des phases ultérieures de maturation du caillé, l'apparition de défauts de texture (par perte de matière protéique) et de flaveur ainsi qu'une diminution de rendement (GUÉRARD, 1987). Toutefois, la faible résistance thermique de cette pepsine, comparativement à la chymosine d'une part et à certaines protéases fongiques d'autre part, peut permettre d'envisager une inactivation thermique des enzymes après formation du coagulum et prévenir ainsi les défauts précédemment signalés (DESMAZEAUD, 1981). Ces propriétés permettent donc d'envisager, sous certaines conditions, une utilisation de cette enzyme en industrie fromagère (GRIPON *et al*, 1975).

#### 1.3.1.2.5. Propriétés des succédanés de la présure

D'après SCOTT (1973) ; REPS *et al*, (1982), toute enzyme de remplacement de la présure doit présenter certaines propriétés pour être utilisée à l'échelle industrielle, entre autre :

- ✓ L'activité coagulante doit être bonne dans les conditions physico-chimiques des laits habituellement transformés en fromagerie ;
- ✓ Les propriétés rhéologiques des coagulums doivent évoluer après la floculation de façon à permettre le travail mécanique du gel dans les délais habituels ;
- ✓ La synérèse du coagulum au cours de la phase d'égouttage doit permettre d'obtenir un fromage d'extrait sec et de composition chimique caractéristiques, dans un délai au plus égal à celui observé avec la présure ;
- ✓ Les modalités de l'affinage doivent permettre d'obtenir un produit fini présentant les normes organoleptiques habituelles après une durée de maturation voisine de celle des fromages fabriqués avec la présure ;
- ✓ Les rendements fromagers, exprimés en poids sec de fromage, doivent être au moins égaux à ceux relevés lors de l'emploi de la présure.

### 1.3.1.3. Activation des zymogènes

Les protéases aspartiques, sont sécrétées dans la caillette des ruminants sous forme de zymogènes (forme inactive) (MOSCHOPOULOU, 2011). La prochymosine et le pepsinogène sont les précurseurs de la chymosine et de la pepsine respectivement (ANDREN et BJORCK, 1986; ANDREN, 1992).

Les zymogènes sont convertis en enzymes actives en raison de protéolyse limitée à pH acide. Dans ces conditions, une partie de l'extrémité N-terminale du zymogène dite partie pro est clivée (MOSCHOPOULOU, 2011). Le prosegment ou segment N-terminal des zymogènes s'étend sur 45 résidus d'acide aminé pour le pepsinogène (HARBOE *et al*, 1974) et 42 résidus pour la prochymosine (FOLTMANN *et al*, 1977).

La prochymosine est capable de s'activer par deux mécanismes différents: un mécanisme « intramoléculaire » et un mécanisme « autocatalytique » (AL-JANABI, 1972). L'activation intramoléculaire, où la molécule se digère elle-même, est accentuée par la présence d'un pH acide (pH < 3) et d'une concentration protéique inférieure à 1 mg/ml, le prosegment est partiellement clivé ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire actif appelé pseudoenzyme (pseudochymosine) (HARTSUCK *et al*, 1977), alors que l'activation autocatalytique où les molécules enzymatiques se digèrent les unes les autres, devient dominante à de plus fortes concentrations en protéine. Si le clivage de propeptide est complet, la chymosine devient active. L'exemple de processus de formation de la chymosine active par libération des différents segments polypeptidiques est représenté dans la figure 2 (SIDIKOU *et al*, 2005).

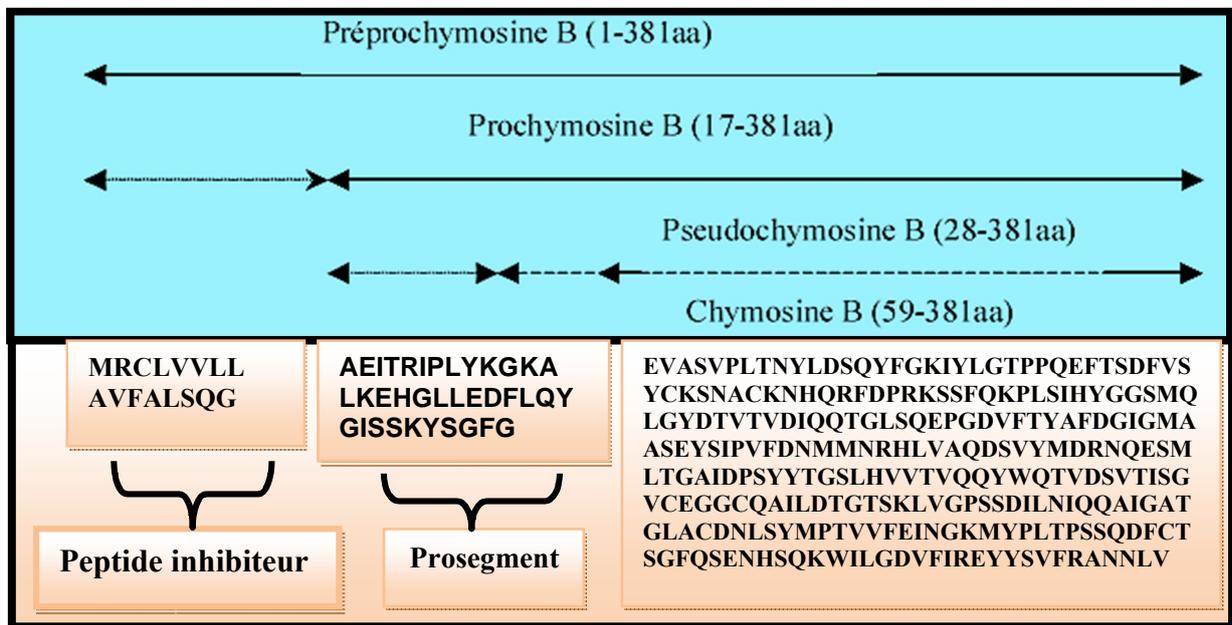


Figure 2 : Processus de formation de la chymosine active par libération des différents segments polypeptidiques (SIDIKOU *et al*, 2005).

### 1.3.1.4. Structure de la chymosine et de la pepsine

#### 1.3.1.4.1. Structure primaire

La chymosine et la pepsine se caractérisent par une teneur élevée en acides aminés acide et  $\beta$  hydroxylés et par la présence d'un petit nombre de résidus basiques (FOLTMANN *et al*, 1993 ; MOIR *et al*, 1985; HIDAKA *et al*, 1986).

Le pepsinogène A bovin possède un peu plus de résidus acides ( $n = 39$ ) que la prochymosine B ( $n = 36$ ); et inversement, la composition du pepsinogène en résidus basiques est de moitié inférieure à celle de la prochymosine (16 contre 30). Le pepsinogène A porcine semble contenir le plus de résidus acides ( $n = 45$ ). Cependant, le pepsinogène F du lapin et la prochymosine B bovine, avec respectivement 32 et 30 résidus basiques, possèdent les rapports résidus acides/résidus basiques les plus faibles (1,3 et 1,2 respectivement)(SIDIKOU *et al*, 2005).

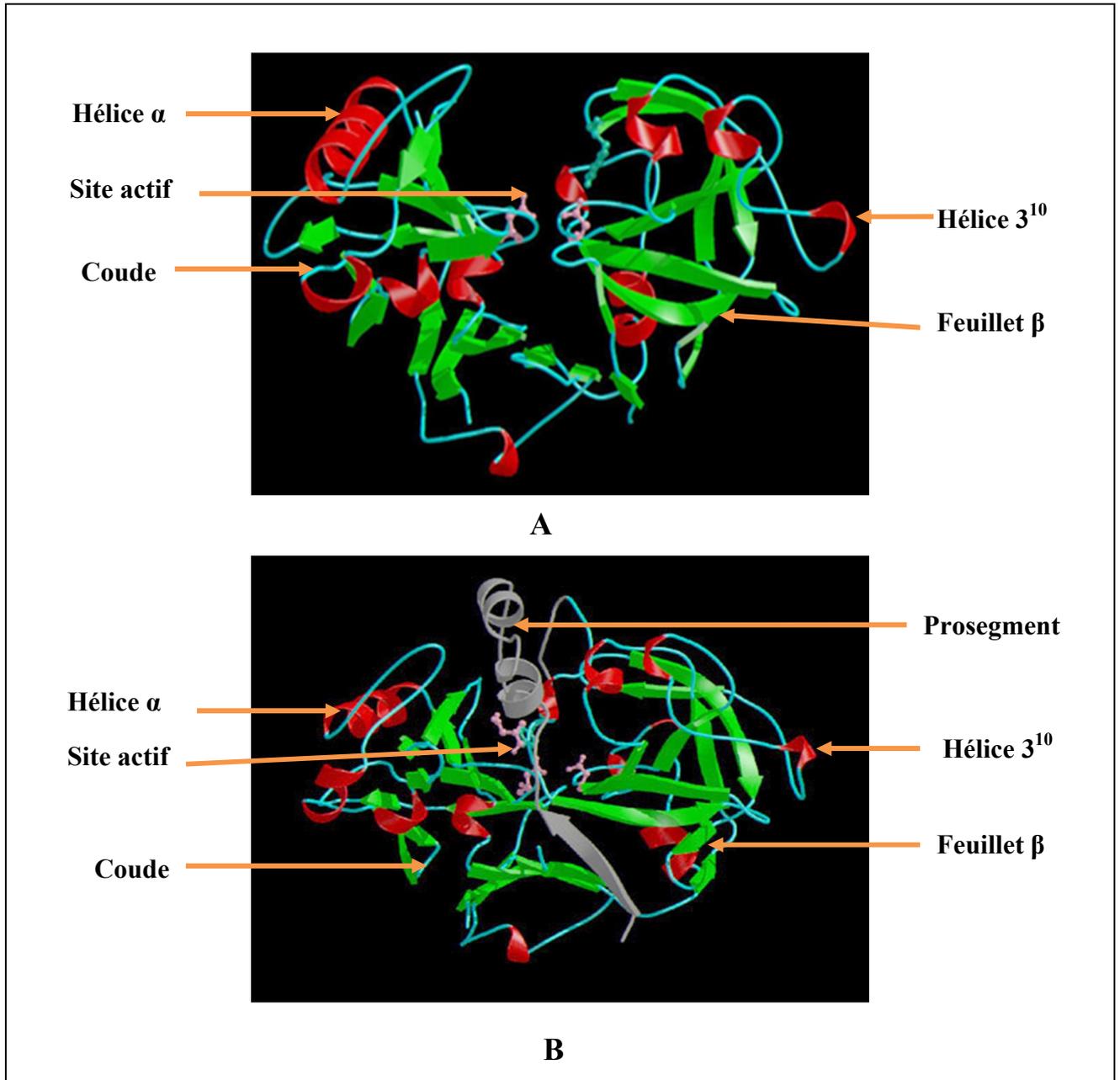
Les pepsinogènes A de l'homme et du porc sont plus proches du pepsinogène A bovin (82 et 83 % d'identité respectivement) que la prochymosine B bovine (55 % d'identité). D'autre part, y a une très forte identité entre la prochymosine B bovine et la prochymosine B du mouton (94 %), Il apparaît donc clairement que les protéases d'une même espèce peuvent être très différentes du point de vue de leur séquence en acide aminé (SIDIKOU *et al*, 2005).

#### 1.3.1.4.2. Structure secondaire et tertiaire

La cristallographie aux rayons X a montré que la structure secondaire de la chymosine se compose essentiellement de feuillets  $\beta$  avec quelques petits segments des hélices alpha ( $\alpha$ ) (NEWMAN *et al*, 1991).

La chymosine a une forme bilobée, avec les domaines N- et C-terminal ayant neuf pour cent de séquence d'acides aminés identiques (NEWMAN *et al*, 1991). Ces domaines sont maintenus à travers un réseau de liaisons hydrogène, contenant des résidus catalytiques d'acide aspartique 32 et 215.

Une comparaison de la structure tridimensionnelle de la chymosine avec d'autres protéinases aspartiques révèle un haut degré d'homologie (SIDIKOU *et al*, 2005). La structure de la chymosine bovine (figure 3) est plus proche de la pepsine porcine (CHITPINITYOL et CRABBE, 1997). Ainsi que la comparaison structurale de la chymosine bovine et de chameau n'a révélé aucune différence de conformation (MOSCHOPOULOU, 2011).



2005) ; (b) : la pepsinogène porcine(HARTSUCK *et al*,1992).

### 1.3.1.5. Extraction et purification des enzymes coagulantes d'origine animale

La figure 4 résume le procédé de fabrication de la présure d'origine animale. Les matières premières (caillettes de veaux ou de chevreaux ou d'agneaux) sont reçues pour l'essentiel sous forme congelée (à  $-20^{\circ}\text{C}$ ) jusqu'à leur utilisation. Après découpe des pains de caillettes, celles-ci sont mises à macérer entre 10 et 15 jours dans une saumure. Le jus qui en résulte est ensuite stocké à température ambiante pendant une huitaine de jours afin d'activer les pro-enzymes en enzymes actives (Pro-chymosine en chymosine - pepsinogène en pepsine).

La purification consiste à séparer la masse biologique (boues) résultant de la macération de la présure (liquide) à proprement parler. A ce stade deux étapes essentielles sont réalisées :

- La floculation
- La filtration sur filtres à plateaux

La standardisation conduit à adapter le taux de chymosine de la présure à la valeur commerciale recherchée, soit par dilution, soit par une légère ultrafiltration. Il n'y a ni rajout de chymosine, ni de pepsine bovine. Cette étape est suivie d'une filtration bactériologique qui assure une propreté microbienne exemplaire à la présure. L'étape ultime consiste à conditionner la présure dans le contenant souhaité par le client (1/4 litre - 1/2 litre - 1 litre - 2 litres - 5 litres - 10 litres...) (Anonyme 1).

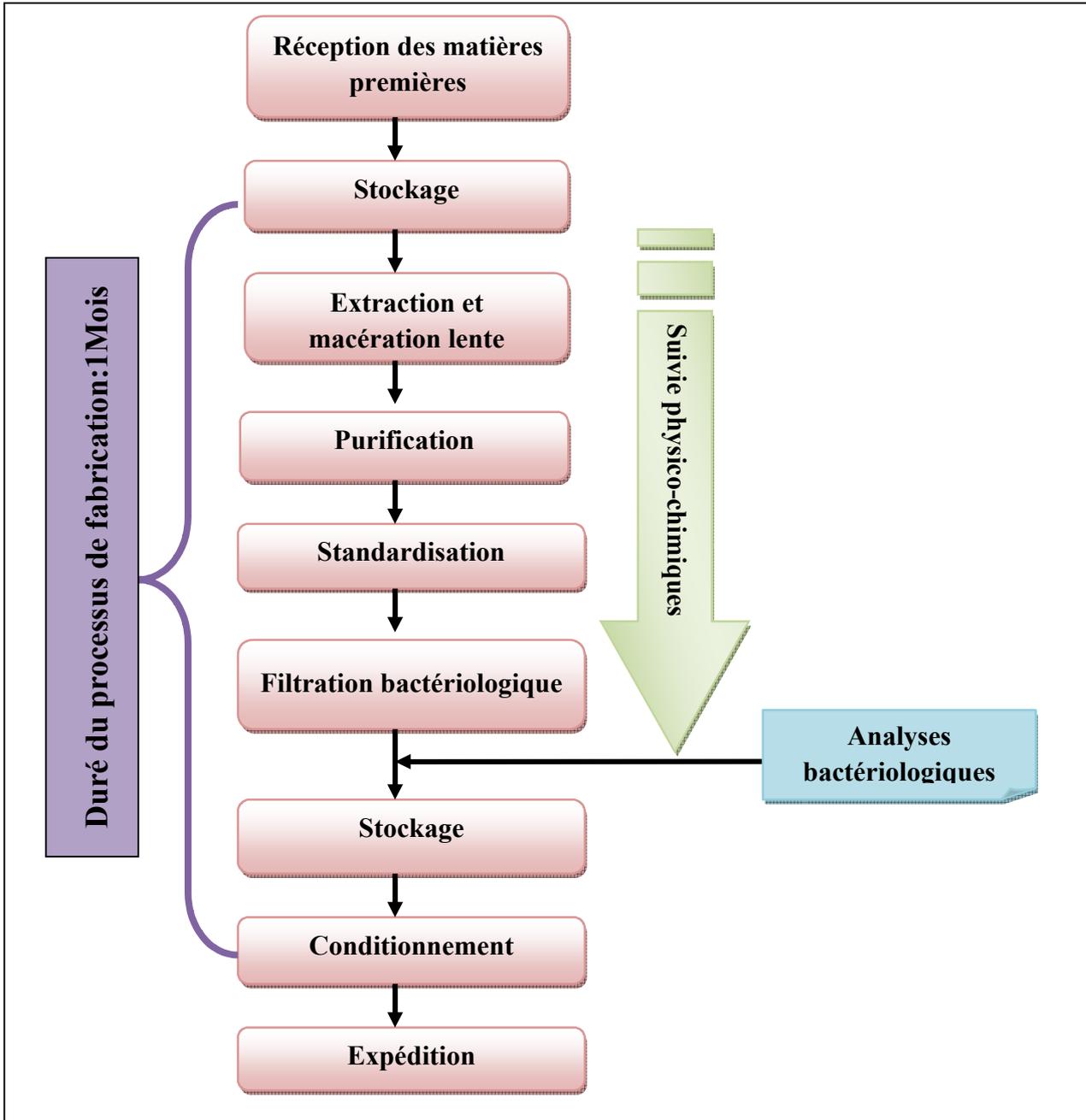


Figure 4: Procédé de production de la présure d'origine animale (Anonyme 1).

### 1.3.2. La chymosine produit par génie génétique (enzymes fermentaires)

La chymosine pure, soluble et active est constamment en demande pour l'industrie laitière. Cependant, des sources naturelles ne font pas souvent répondre aux exigences souhaitables pour la qualité et la quantité. Par conséquent, pour répondre à cette pénurie, l'ingénierie génétique a permis la production de chymosine à un niveau supérieur dans sa forme naturelle exacte à partir de bactéries (*Escherichia coli* (*E. coli*)), Levure (*Kluyveromyces lactis*), et les moisissures (*Aspergillus Niger* var. *awamori*) comme hôtes microbiens différents.

La Food and Drug Administration (FDA) a conclu que le gène de la chymosine de veau cloné dans *E. coli* K-12 a été exprimé, le gène produit ne se distinguait pas des homologues naturels (KUMAR *et al*, 2010).

Plusieurs organisations commerciales dont Pfizer actuellement Chr. Hansen Milwaukee (Chy-max du *Escherichia coli* K-12), DSM Food Specialties (Maxiren du *Kluyveromyces lactis*) et Genencor International Inc. (Chymostard<sup>®</sup> *Aspergillus awamori*) ont également commencé entreprendre des efforts pour produire la chymosine recombinant ou fermentaire (RAMET, 1997 ; MISTRY, 2012).

L'isolement de l'ARNm de la prochymosine a été rapporté pour la première fois par le groupe de BEPPU en 1980 (UCHIYAMA *et al*, 1980). De ce laboratoire proviennent les premières publications sur la production de la chymosine recombinante chez *E. coli* (NISHIMORI *et al*, 1982 ; 1984), technique par la suite adoptée par d'autres groupes utilisant *E. coli* (EMTAGE *et al*, 1983; MARSTON *et al*, 1984), mais aussi divers micro-organismes dont *Saccharomyces cerevisiae* (GOFF *et al*, 1984), *Aspergillus spp* (CULLEN *et al*, 1987 ; TSUCHIYA *et al*, 1993), *Yarrowia lipolytica* (FRANKE *et al*, 1988), *Proteus mirabilis* (KLESSEN *et al*, 1989), *Kluyveromyces lactis* (VAN DEN BERG *et al*, 1990), *Trichoderma reesei* (UUSITALO *et al*, 1991), *Bacillus subtilis* (PARENTE *et al*, 1991) et chez des cellules de mammifères (KOLMER *et al*, 1991).

Par ailleurs, la protéase recombinante d'agneau a été produite par ROGELJ *et al*. (2001) en utilisant *E. coli*. La chymosine de dromadaire (KAPPEL *et al*, 2006), du buffle (VALLEJO *et al*, 2008) et de chèvre (KUMAR *et al*, 2007) ont été produites par fermentation.

### 1.3.2.1. Caractéristiques de la chymosine fermentaire

La chymosine produite par les micro-organismes est identique en poids moléculaire, séquence d'acides aminés, propriétés immunologiques et profil chromatographique à la chymosine naturelle (TEUBER, 1990).

L'analyse biochimique fine montre une identité absolue entre les isomères de la chymosine naturelle et celles produites par les micro-organismes recombinés. L'activité protéolytique mesurée sur les différentes fractions de la caséine est également rigoureusement la même (KUMAR *et al*, 2010).

Sur le plan technologique, de nombreux essais ont montré que dans la fabrication fromagère, aucune différence majeure ne peut être détectée entre les produits obtenus avec la chymosine de fermentation et la présure traditionnelle en ce qui concerne les modalités de la coagulation, de l'égouttage, de l'affinage, et les caractéristiques organoleptiques (Ramet, 1997).

Plusieurs études ont montré que dans la production fromagère, le rendement et la qualité du produit fini est le même quelle que soit la chymosine utilisée (BARBANO et RASMUSSEN, 1992).

Pour contrôler l'origine de la chymosine, LILLA *et al* (2005) ont introduit une méthode de spectrométrie de masse. Ils ont démontré que certains composants peptidiques mineurs, génèrent lors de la digestion trypsique permettant la différenciation entre la chymosine naturelle et celle fermentaire.

Récemment, différentes études comparatives ont été réalisées pour montrer les différences entre la chymosine recombinante de chèvre et du buffle exprimé dans *Pichiapastoris* et la chymosine bovine et de dromadaire dont leurs formes recombinantes sont exprimées dans *Aspergillus niger*. Ils ont souligné que la chymosine recombinante de chèvre présentait la meilleure efficacité catalytique par rapport aux trois autres enzymes. Il a été proposé que la chymosine recombinante de chèvre comparée à la chymosine bovine recombinante, représente une très bonne alternative pour une utilisation dans la fabrication de fromage (VALLEJO *et al*, 2012). Le tableau IV résume les principales caractéristiques physico-chimiques de la chymosine fermentaire.

**Tableau IV : caractéristiques physico-chimiques de la chymosine fermentaire**

Chymosine fermentaire	espèces	MM (KDa)	pHi	pH optimum	Température optimum °C	Références
	Bovin	36 et 40	4,8	4,5	37	VALLEJO <i>et al</i> , 2008
	Camelin	40	5,5	5,8	40	KAPPELER <i>et al</i> , 2006
	caprin	46 et 49	-	-	-	VEGAHERLANDEZ <i>et al</i> , 2004
	ovin	40	4,8	6,6-6,8	40	ROGEL <i>et al</i> , 2001
	<i>Rhizomucor pusillus</i>	44	-	3	-	BELDARRAIN <i>et al</i> , 2000

### 1.3.2.2. Avantage des enzymes fermentaire

Selon KUMAR *et al* (2010), la Chymosine recombinante a de nombreux avantages par rapport aux autres homologues tels que :

- Elle a une faible activité protéolytique en raison de l'absence de la pepsine ;
- Elle a une activité coagulante plus prévisible ;
- Elle est adaptée aux régimes végétariens ;
- Elle a acquis l'appui de certaines autorités religieuses (certifiée halal et autres).

Mais ces produits restent cependant commercialisés à un prix élevé, qui rend difficile leur utilisation par des petites et moyennes entreprises surtout dans les pays en voie de développement (TEUBER, 1990).

### 1.3.2.3. Stratégie de clonage de la chymosine

La stratégie commune utilisée pour l'expression d'un gène eucaryote dans un procaryote implique l'isolement de l'ARN total et de l'ARNm qui code pour la protéine d'intérêt, où l'ARNm est transcrit inversement en ADNc à partir des introns, ensuite cloné et exprimé dans un hôte approprié (KUMAR *et al*, 2010).

Le choix d'un Système d'expression pour la surproduction de la protéine recombinante dépend des caractéristiques de la croissance des cellules, de niveau d'expression intra et extracellulaire, de la modification post-traductionnelle et de l'activité biologique de la protéine (DEMAIN et VAISHNAV, 2009).

Parmi les nombreux systèmes disponibles pour la production des protéines hétérologues, la bactérie *E. coli* de Gram négatif qu'est l'une des hôtes largement utilisé vu sa capacité de croissance rapide sous haute densité sur un substrat peu coûteux, sa bonne caractérisation de la génétique ainsi que la disponibilité d'un grand nombre de vecteurs de clonage et des souches hôtes mutantes (DAI *et al*, 2005). Mais aussi plusieurs eucaryotes, y compris les levures, les champignons, les insectes et les cellules de mammifères ont été employés pour la production de la prochymosine et de la chymosine. L'annexe 01 résume les différents hôtes microbiens utilisés pour l'expression de la chymosine de différentes espèces animales.

La chymosine est produite dans l'*Aspergillus niger* par la fusion du gène de la prochymosine B avec celui de la glucoamylase qui possède les éléments de contrôle de la transcription, de la translation et de la sécrétion chez *Aspergillus niger* et expression d'une protéine chimérique possédant les deux activités (figure 05). Pour réaliser ce travail, il est nécessaire de :

- ✓ définir une souche hôte avec marqueur de transformation *Aspergillus niger* ;
- ✓ muter la souche hôte une première fois par traitement aux rayons ultraviolet. La mutation porte sur le gène *pyrG* qui rend le micro-organisme auxotrophe vis-à-vis de l'uridine ;
- ✓ muter à nouveau cette souche par traitement chimique au niveau du gène *ArgB* ce qui la rend doublement auxotrophe vis-à-vis de l'uridine et de l'arginine ;
- ✓ traiter les souches uridine- et arginine de telle manière que le micro-organisme ne puisse plus exprimer son activité d'aspergillopepsine qui dégrade la chymosine ou qui produit des peptides amers ;
- ✓ remplacer la séquence d'ADN encodant pour l'aspergillopepsine par le gène *ArgB* provenant d'*Aspergillus nidulans* ;
- ✓ récupérer des transformants qui n'expriment plus l'aspergillopepsine mais qui ont récupéré la faculté de pouvoir croître sur un milieu sans arginine ;
- ✓ construire un vecteur *pGAMpR* ;
- ✓ insérer l'ADNc de la prochymosine B dans le plasmide au niveau des derniers codons du gène de la glucoamylase d'*Aspergillus niger*. Le marqueur de sélection sera l'introduction du gène *pyr 4* de *Neurospora crassa* qui lève l'auxotrophie à l'uridine ;
- ✓ rechercher les clones capables de se développer sans présence d'uridine et d'arginine et exprimant une activité chymosine. Il y a possibilité d'amplifier la réponse et d'augmenter le nombre de copies.

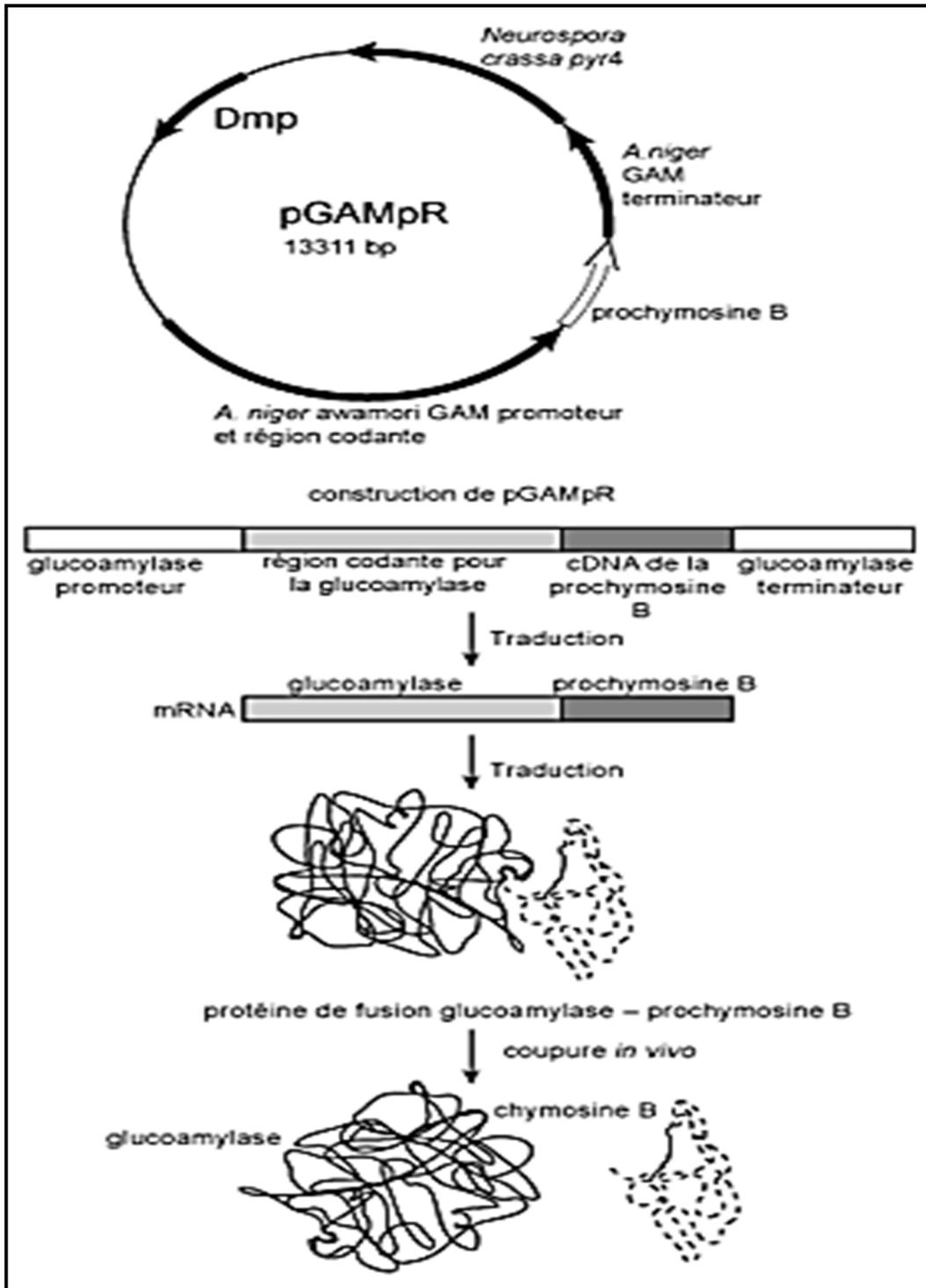


Figure 5: Stratégie de clonage de la chymosine (VAN DEN BRINK *et al*, 2006).

# *Conclusion*

## **Conclusion**

La chymosine est toujours considérée comme étant la meilleure enzyme pour coaguler le lait pour la production fromagère. Comme nous l'avons déjà mentionné, les substituts de la présure qui sont utilisés dans l'industrie ont une activité protéolytique souvent marquée qui conduit alors à l'amertume et de mauvaises saveurs dans les fromages avec diminution du rendement. Celles-ci sont provoquées par l'hydrolyse de la caséine  $\alpha_1$  et de la caséine  $\beta$  par l'action de ces enzymes entraînant l'apparition de peptides amers.

Ainsi, depuis les années 80, les techniques d'ingénierie génétique ont été utilisées pour produire de la chymosine bovine recombinante. De nos jours, le rendement et la qualité du produit fini est le même que la chymosine naturelle, mais ces produits restent cependant commercialisés à un prix élevé, qui rend difficile leur utilisation par des petites et moyennes entreprises

*Partie*  
*Expérimentale*

# *Introduction*

## **Introduction**

Une bonne sante débute par une bonne nutrition elle-même synonyme d'une alimentation équilibrée et saine. Cette alimentation ne doit pas seulement être une source d'énergie mais doit couvrir un apport en éléments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme dont les vitamines, les protéines, les glucides et les lipides.

Au cours de notre stage pratique, nous avons effectué une évaluation physicochimique de quelques produits alimentaires commercialisés (jus de fruits, lait et les matières grasses) afin de s'assurer de sa qualité et cela par le dosage de différents paramètres physicochimiques, à savoir, la vitamine C, dosage des sucres réducteurs, l'indice d'iode, l'indice d'acidité et des protéines, ainsi par l'application des méthodes chromatographiques et électrophorétiques.

## 2. Matériels et méthodes

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche de biochimie analytique et biotechnologies (LABAB) de l'université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU. Elle a été sous tendue par le matériel et les méthodes énumérés ci- dessous.

### 2.1. Matériels

#### 2.1.1. Matériel biologique

Jus commercialisés (jus Ramy, jus Rouïba, jus Light, jus lacté et jus Ifruit), huile d'olive, huile de soja, beurre président, smen, lait de vache, protéines sériques lyophilisées de lait de vache, protéines sériques lyophilisées de lait de chamelle, protéines lyophilisées (caséines du lait de vache, l'albumen de l'œuf), la BSA(sérum albumine bovine), ces matériaux ont été fournies gracieusement au niveau de laboratoire (LABAB) de l'université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU.

#### 2.1.2. Produits chimiques

- ✓ **Solvants** : acide ascorbique, acide acétique glacial, acide trichloracétique (TCA), acide chlorhydrique, éthanol, méthanol, potasse KOH, glycérol ;
- ✓ **Sels et tampons** : thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), tampon Tris-HCl, tartrate double de sodium et potassium,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (sulfate de cuivre pentahydrate) ;
- ✓ **Colorants et réactifs spécifiques** : Phénolphtaléine, Empois d'amidon, Lugol, Acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS), Folin- Ciocalteu , acrylamide, N, N'méthylène-bis-acrylamide, Bleu de Bromophénol , TEMED, Bleu de Coomassie R250, persulfate d'ammonium, glycine, 2-mercaptoéthanol, Gel de Sephacryle S200.

#### 2.1.3. Matériels utilisées

- ✓ **Appareillage** : unité de chromatographie liquide basse pression, unité d'électrophorèse sur mini-cuves verticales (Hoefer SE 200 et SE 280, U.S.A), Spectrophotomètre, Centrifugeuse, pH mètre, Vortex, Agitateur magnétique, Bain Marie, Balance de précision ;
- ✓ **Verrerie** : béchers, éprouvette graduée, burette, pipettes, tubes à essais, fioles jaugées, entonnoir, erlenmeyer, seringue ;
- ✓ **Autres matériels** : coupelles, spatules, pissettes (d'eau distillée), portoirs, micropipettes, papier filtre, cuves, barreaux magnétiques.

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Dosage de la vitamine C dans un jus

#### 2.2.1.1. Principe de la méthode

La vitamine C est hydrosoluble, peu soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther ou le chloroforme, elle est stable à l'abri de la lumière et de l'humidité. En revanche, elle s'altère

très rapidement au contact de l'oxygène de l'air. Cette oxydation est accélérée par la chaleur, les bases et les ions métalliques (BOURGEOIS, 2003).

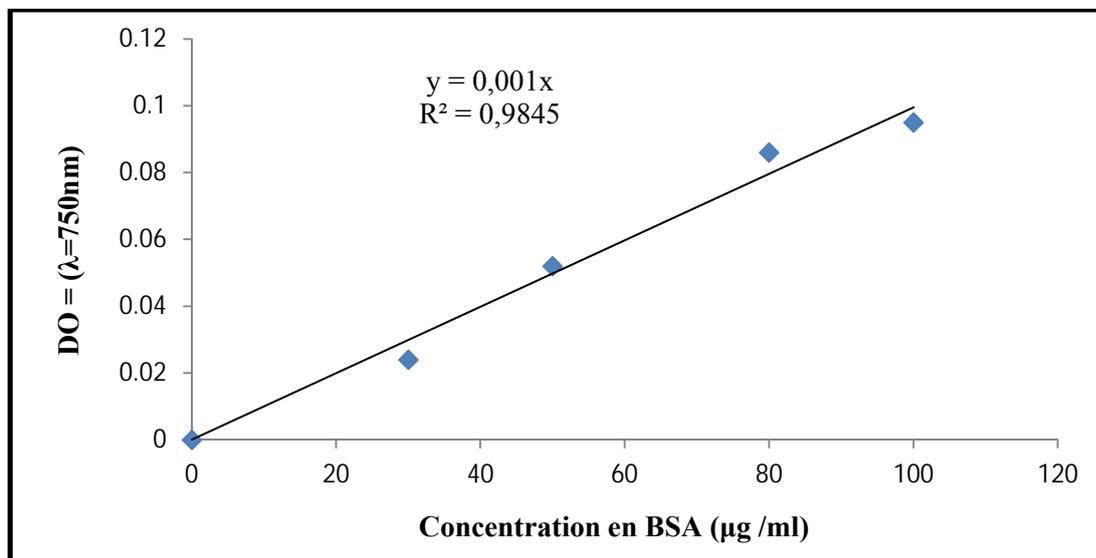
Le dosage de la vitamine C est effectué par titrimétrie. Il est basé sur la réduction par l'acide ascorbique d'un colorant : le 2,6 Dichlorophénol indophénol (DCPIP) qui est rouge en milieu acide et bleu en milieu neutre. La solution de 2,6 DCPIP est étalonnée par l'emploi d'une solution d'acide ascorbique de concentration connue. Le mode opératoire est donné en annexe 02.

### 2.2.2. Dosage des protéines: méthode de LOWRY *et al* (1951)

Le dosage est réalisé selon la méthode spectrophotométrique de LOWRY *et al* (1951). C'est une méthode particulièrement adaptée au cas des protéines laitières. Elle est de plus facile à mettre en œuvre et assez reproductible.

#### 2.2.2.1. Principe de la méthode

Le principe repose sur le développement d'une coloration bleu foncé suite à l'addition à la solution protéique d'un sel du cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration résulte de la réaction du cuivre avec des liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungstomolybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine. Les espèces réduites absorbent la lumière à 750 nm. Le dosage des protéines s'effectue à cette longueur d'onde en utilisant un spectrophotomètre visible. La concentration en protéines de l'échantillon analysé est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en employant de l'albumine sérique bovine (BSA) (figure 06). Le mode opératoire est donné en Annexe 05.



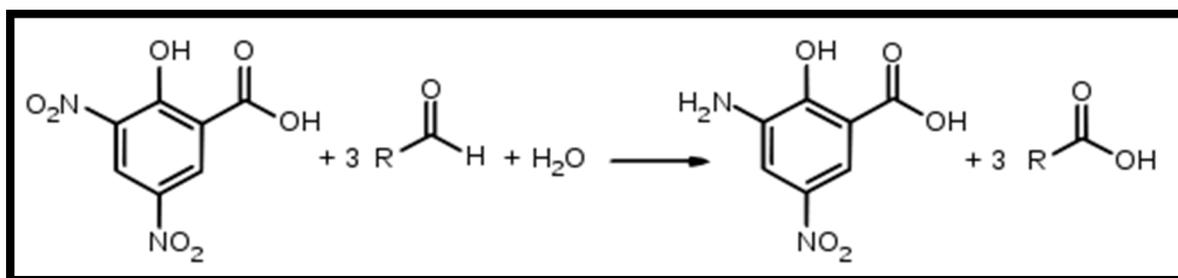
**Figure 06: Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéique de référence ; R<sup>2</sup>: Coefficient de corrélation.**

### 2.2.3. Dosage des glucides (méthode utilisant l'acide 3,5 Dinitrosalicylique (DNS))

Les sucres, encore appelés glucides ou hydrates de carbone  $C_n(H_2O)_n$ , sont des composés comportant de nombreux groupements hydroxyles (-OH) responsables de leur caractère très hydrophile. La présence de groupement carbonyle (-C = O), aldéhyde ou cétonique leur confère un caractère réducteur (BOUKHARY, 2008).

#### 2.2.3.1. Principe de la méthode

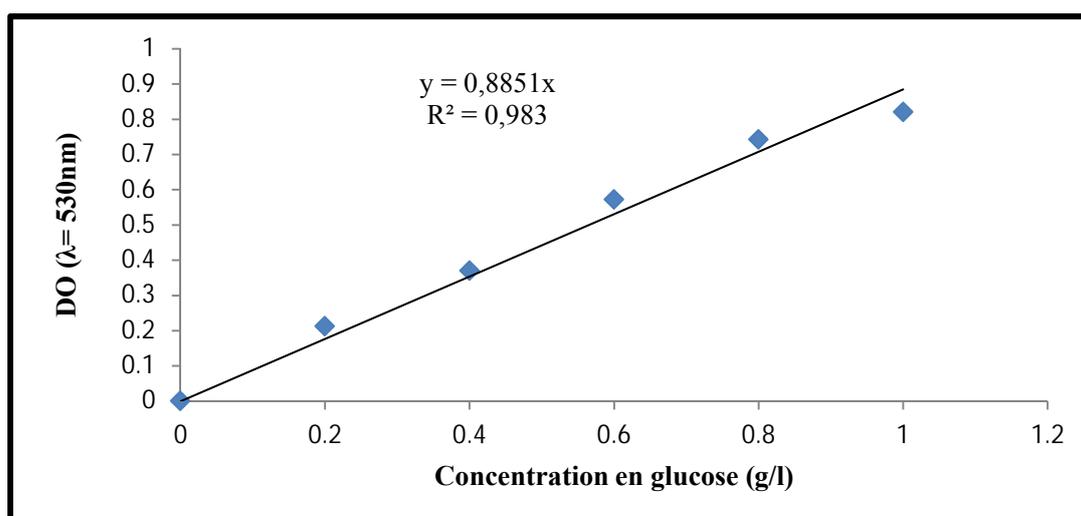
On utilise les propriétés réductrices du glucose. À chaud et en milieu alcalin, il y a réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique ou DNS (aussi appelé acide 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoïque) de couleur jaune qui joue le rôle d'oxydant en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (figure 07) qui est rouge-orangé, l'intensité de la coloration rouge est proportionnelle à la concentration de l'ose si l'on opère dans des conditions physico-chimiques constantes. La densité optique (DO) est lue au spectrophotomètre à 530 nm. Une courbe d'étalonnage  $DO=f(C)$  est établie avec des solutions en concentrations de glucose connues (figure 08). Le mode opératoire est donné en annexe 04.



Acide 3,5dinitrosalicylique

l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique

**Figure 07: Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs (AUDIGIE *et al*, 1978).**



**Figure 08: Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du glucose comme standard.**

## 2.2.4. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse

### 2.2.4.1. Détermination de l'indice d'acide

L'indice d'acide est la quantité, en milligrammes de potasse KOH nécessaire à la neutralisation des acides gras libres contenus dans 1 gramme de matière grasse (AOAC, norme 969.17, 1997). Il est déterminé par un dosage en retour. Le corps gras réagit avec un excès connu de potasse alcoolique. L'excès de potasse est alors dosé par une solution d'acide chlorhydrique. Le corps gras est mis en solution par un solvant organique neutre. Le mode opératoire est donné en annexe 03. L'indice d'acide se détermine comme suit :

$$IA = V \times N \times 56,1 / \text{Masse de la matière grasse}$$

Où :

V est le volume de KOH (ml) nécessaire à la neutralisation des acides gras libres ;

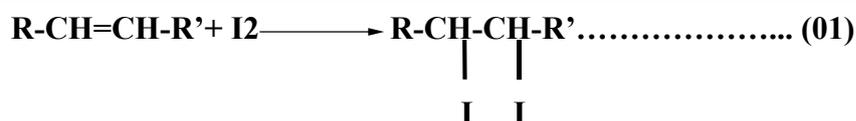
N est la normalité de la solution de KOH ;

56,1 est la masse molaire du KOH.

### 2.2.4.2. Détermination de l'indice d'iode

L'indice d'iode d'un lipide est la masse de l'iode ( $I_2$ ) (exprimée en g) capable de se fixer sur les insaturations (double liaison le plus souvent) des acides gras de 100 g de matière grasse (AOAC, norme 993.20, 1997). Le mode opératoire est donné en -annexe 03.

L'iode se fixe sur les doubles liaisons selon la réaction suivante :



L'excès d'iode non fixé est titré par la solution réductrice de thiosulfate de sodium ( $Na_2S_2O_3$ , 0,02N) selon la réaction suivante :



L'indice d'iode se détermine comme suit :

$$Ii = \frac{(V_2 - V_1) \times 0,1 \times 126,9}{M}$$

Où :

$V_1$  : est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour titrer l'échantillon

$V_2$  est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour titrer le blanc

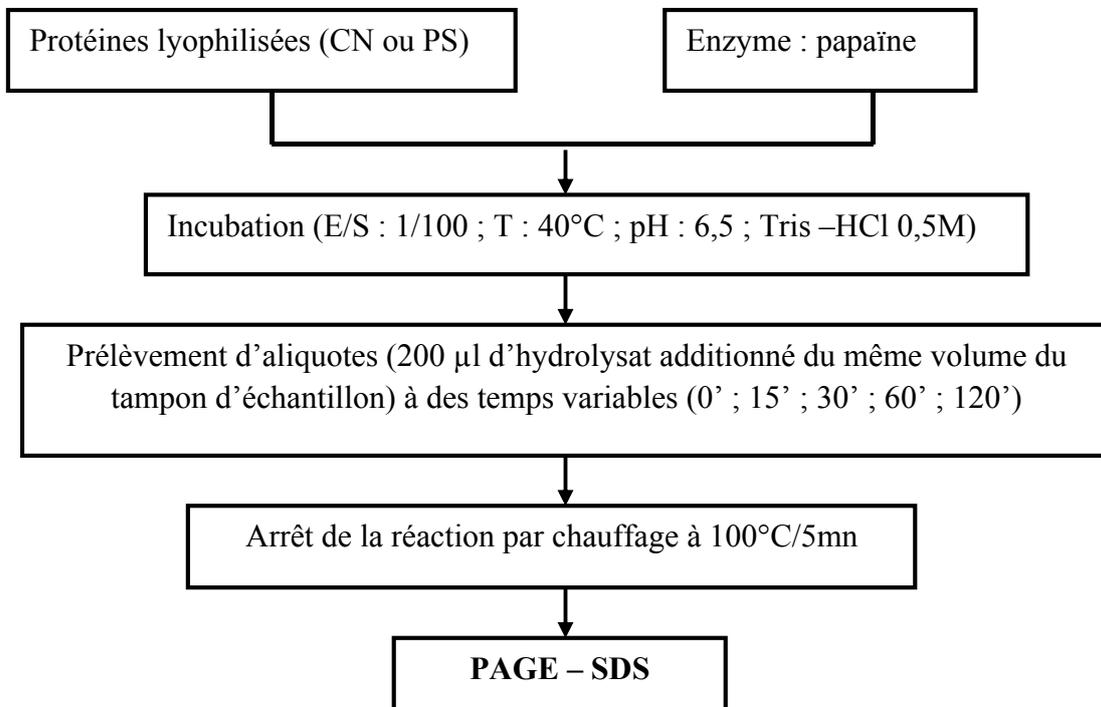
M : masse de matière grasse

## 2.2.5. Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne

### 2.2.5.1. Conditions expérimentales

A 200µl d'une solution de protéines sériques de l'œuf et les caséines du lait bovine (à raison de 10mg/ml) dans le tampon réactionnel (Tris-HCl 0,5M, pH 6,4) est ajouté 100µl de solution enzymatique de concentration 0,4mg/ml. L'incubation du substrat, additionné de l'enzyme, est réalisée à différents intervalles de temps (5 ; 15 ; 30 ; 60 et 120 mn) au bain-marie à la température optimale de l'enzyme ( $T^{\circ} = 40^{\circ}\text{C}$ ). L'hydrolyse enzymatique est arrêtée par chauffage à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 5 mn, puis refroidissement immédiat dans un bain d'eau froide (figure 09).

Afin de réaliser un contrôle électrophorétique en PAGE-SDS des hydrolysats, 400 µl des échantillons incubés sont additionnés du même volume du tampon d'échantillon avant l'inhibition de l'enzyme (par chauffage).



**Figure 09:** Les étapes suivies pour l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne. CN: Caséines ; PS : protéines du lactosérum.

### 2.2.6. Fractionnement des protéines individuelles sur chromatographie basse pression

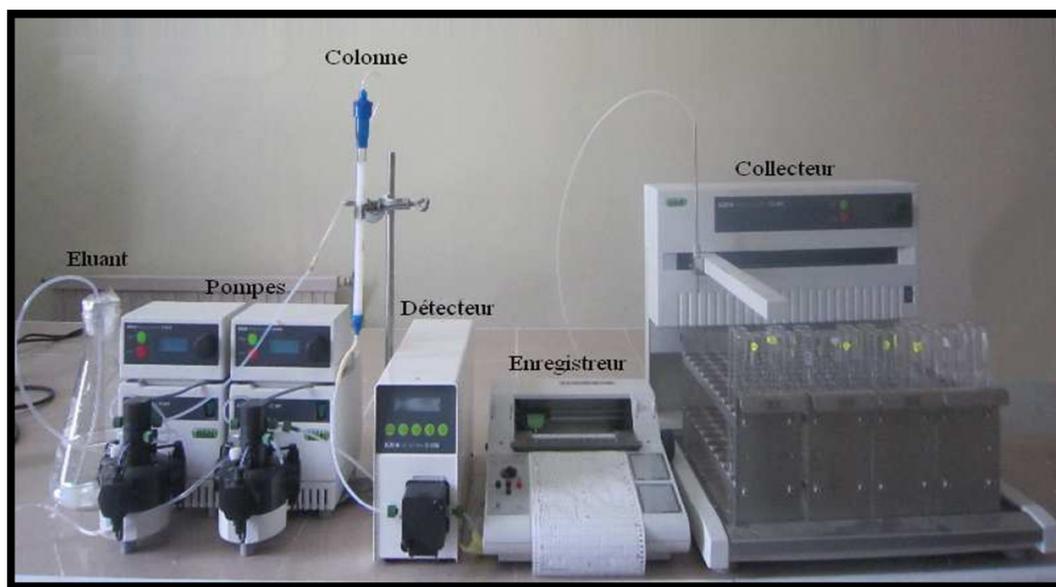
La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase.

### 2.2.6.1. Chromatographie de perméation sur gel de séphacryl S200

#### 2.2.6.1.1. Principe de la méthode

La chromatographie liquide d'exclusion est une technique basée sur la rétention sélective des molécules de soluté suivant leur taille lors de leur pénétration dans le réseau poreux de la phase stationnaire. Les plus grosses molécules ne pénètrent pas dans les pores et sont exclues tandis que les plus petites pénètrent plus profondément dans les pores et sortent les dernières (GBOGOURI, 2005).

La séparation des protéines sériques du lait bovine et cameline est effectuée sur une colonne de dimensions 20 x 1cm (figure 10). La phase stationnaire utilisée est le Séphacryl S200 (poly alkyle dextrane-CO-N-N'-méthylènebisacrylamide) ; qui est un gel mixte composé d'acrylamide et d'un agent de pontage : le N-N'-méthylènebisacrylamide. Ce gel présente un taux de stabilité et de réticulation élevé et une grande résistance aux contraintes mécaniques. Le seuil de coupure de Séphacryl S200 est de 5 à 250 kDa. La phase mobile utilisée est une solution tampon composée de Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4.



**Figure 10: Photographie d'une unité de chromatographie basse pression (LABAB UMMTO).**

### 2.2.7. Méthodes électrophorétiques

Elle permet de séparer, sous l'influence d'un champ électrique, des composés ionisés. Ces composés peuvent être des ions minéraux ou organiques, des molécules polarisables comme les acides aminés, les protéines etc. (CLAVERIE et PANET, 2008).

#### 2.2.7.1. Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturante (PAGE native)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions non dénaturantes et non dissociantes (PAGE-native), gardent les protéines dans l'état natif, ce qui fait de la PAGE-

native une technique résolutive et bien adaptée à la séparation des protéines sériques. Les molécules y sont séparées selon leur poids moléculaire ainsi que leur charge.

La PAGE native est réalisée selon la méthode de HILLIER (1976), adaptée à un système de mini cuves HOFFER au niveau du laboratoire LABAB, avec un gel de polyacrylamide de porosité (T=12% ; C=2,7%) (figure 11).

Le tampon de gel est constitué de Tris 0,75M, pH 8,9. Le tampon d'électrode contient du Tris 5 mM, glycine 77 Mm, pH 8,3. Les échantillons sont dissous dans le tampon d'échantillon qui est composé du tampon de gel (1/10 v/v), de l'eau distillée (7/10 v/v) et du glycérol 10% (v/v). Le protocole détaillé suivi est donné en annexe 07.



**Figure 11: Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260).**

### **2.2.7.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de SDS et de 2-Mercapto-éthanol (PAGE SDS)**

C'est une méthode d'analyse séparant les protéines selon leur géométrie : masse moléculaire et forme. L'électrophorèse est réalisée selon la méthode de LAEMMLI et FAVRE (1973) en conditions dissociantes et dénaturantes.

La matrice est créée par la copolymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. Le TEMED et le persulfate d'ammonium sont les catalyseurs de réaction qui fournissent des radicaux libres qui vont déclencher la polymérisation radicalaire. La grosseur des pores formés est fonction de la concentration d'acrylamide et du taux de bis-acrylamide.

Le SDS est un détergent fort possédant une longue chaîne hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement (figure 12). Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. Cela signifie que seul le poids moléculaire apparent (et non réel) des protéines sera le facteur de leur séparation. Ceci permet sa migration dans la matrice à l'aide d'un courant électrique et la séparation des protéines s'effectue uniquement en fonction de leurs poids moléculaire (les protéines ayant un poids moléculaire plus faible migreront plus rapidement). Le protocole détaillé suivi est donné en annexe 08.

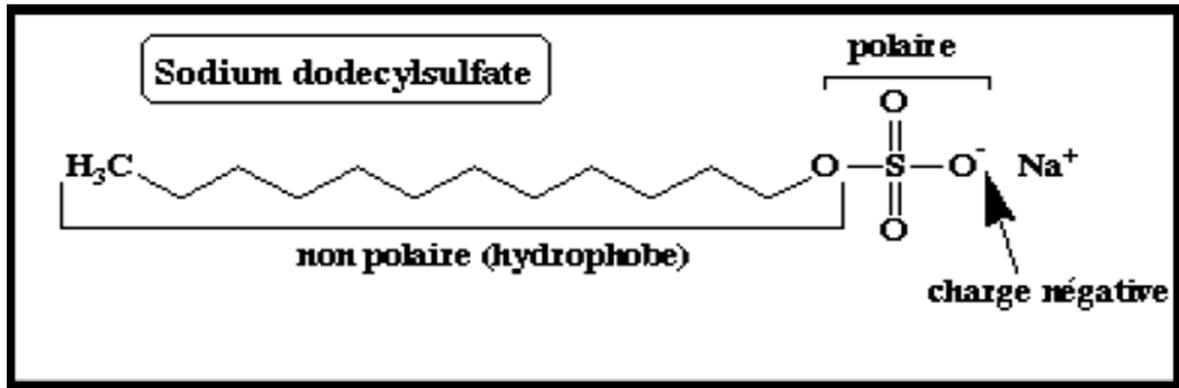


Figure 12: Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS).

*Résultats et  
discussions*



### 3. Résultats et discussions

#### 3.1. Teneur en vitamine C dans un jus d'orange

L'acide ascorbique, ou Acide oxo-3 L-gulofuranolactone (forme énolique) (Vitamine C) de formule brute  $C_6H_8O_6$ , est un acide organique ayant des propriétés antioxydantes, Il est présent dans le citron, les jus de fruits et les légumes frais.

L'acide ascorbique comporte une fonction  $\gamma$  lactone, une fonction enediol (HO-C=C-OH) support de son activité biologique et qui confère à la molécule des propriétés acides (formation de sels sodique, plombique) et enfin deux fonctions alcool, l'une primaire et l'autre secondaire.

L'acide ascorbique est une poudre cristalline, blanche, inodore, stable au contact de l'air, de la lumière du jour et à température ambiante pendant plusieurs mois, de saveur légèrement acide et qui se décompose à la température de  $190^\circ C$ . Il est facilement soluble dans l'eau, moins soluble dans l'alcool (MAREZ, 2004).

L'oxydation en milieu aérobie de l'acide ascorbique en présence d'ions de métaux de transition est la plus importante. Cette réaction est responsable de la perte de la vitamine C dans les aliments. La vitesse d'oxydation dépend des concentrations de la vitamine C et des ions métalliques mais aussi de la teneur en ions  $H^+$  du milieu ; en effet a pH très bas, voisin de 1, l'acide ascorbique est complètement protoné et plus difficilement oxydable qu'à pH plus élevé (STEVANATO et al, 1985).

Le dosage de la vitamine C est effectué par titrimétrie. L'acide ascorbique s'oxyde avec le Dichlorophénol indophénol (DCPIP). Ce dernier est étalonné à l'aide d'une solution d'acide ascorbique pure de concentration connue ( $C_1 = 0,2g/l$ ). Les résultats du dosage de la vitamine C des différents échantillons de jus commercialisés sont résumés dans la figure 13.

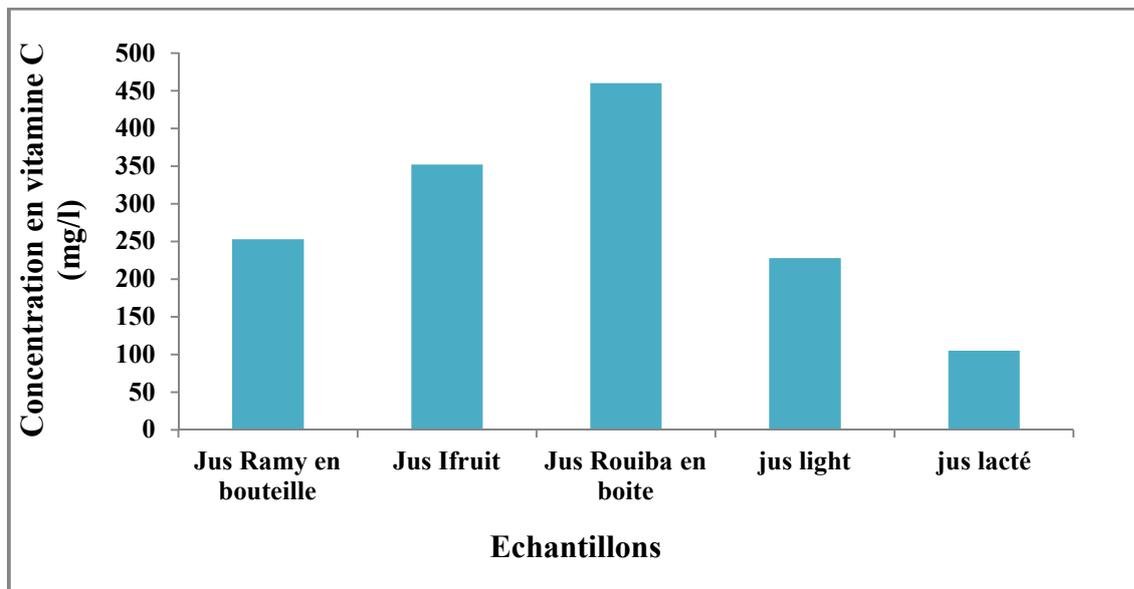


Figure 13 : les teneurs en vitamine C des échantillons étudiés.

D'après les résultats obtenus on remarque que tous les jus ont un pH acide (jus Ramy, jus Ifruit et jus Rouiba : pH 3,2 – 3,3), cela pourrait être liée à la quantité et le type d'acide qu'ils contiennent comme l'acide ascorbique et l'acide citrique qui est largement utilisé dans les jus commercialisés qui sont des acidifiants lesquels résistent plus au changement de pH. On remarque que le jus lacté a un pH légèrement plus élevé que les autres jus (pH 4,36), cela pourrait être dû au lait ajouté qui a diminué l'acidité de jus.

En comparant la teneur en vitamine C des différents jus analysés, on constate que le jus Rouiba en boîtes possède la concentration la plus élevée suivie par le jus Ifruit puis le jus Ramy en bouteille. Par ailleurs, les résultats montrent que le jus lacté contient la quantité la plus faible en vitamine C. La différence de concentration pourrait être liée à des nombreux paramètres tels que la température, l'oxygène, la lumière, le pH, la présence des métaux lourds, la durée du stockage élevée.

KLIMCZAK *et al* (2007) ont indiqué que l'augmentation de la température de 10 °C cause une diminution importante de la vitamine C, ils ont aussi constaté une diminution de 21%, 31 et 81% de l'acide ascorbique dans un jus d'orange après stockage d'une durée de six mois à 18, 28 et 38 °C respectivement.

Dans le jus d'orange à base de concentré, la diminution de la vitamine C est de 25% après stockage à 25 °C pendant 60 jours (KLIMCZAK *et al* 2007).

Les méthodes titrimétriques sont basées sur les propriétés réductrices de l'acide L-ascorbique, le réactif de titrage le plus utilisé est le dichloro-2,6 phénol indophénol (TILIMANS, 1932). Ce réactif est un oxydant idéal en raison de sa sélectivité pour l'acide ascorbique qui s'oxyde facilement en sa présence. D'autres réactifs ont été proposés, mais ils ne présentent pas une meilleure spécificité que le DCPIP, il s'agit par exemple de l'iode (RAO et PRASAD, 1976) et le dihaloiodate de potassium (SKURDIN, 1980).

### 3.2. Dosage des protéines : méthode de LOWRY *et al*(1951)

La figure 14 montre la concentration en protéines du lait de vache et d'un jus lacté obtenu en utilisant la méthode de LOWRY.

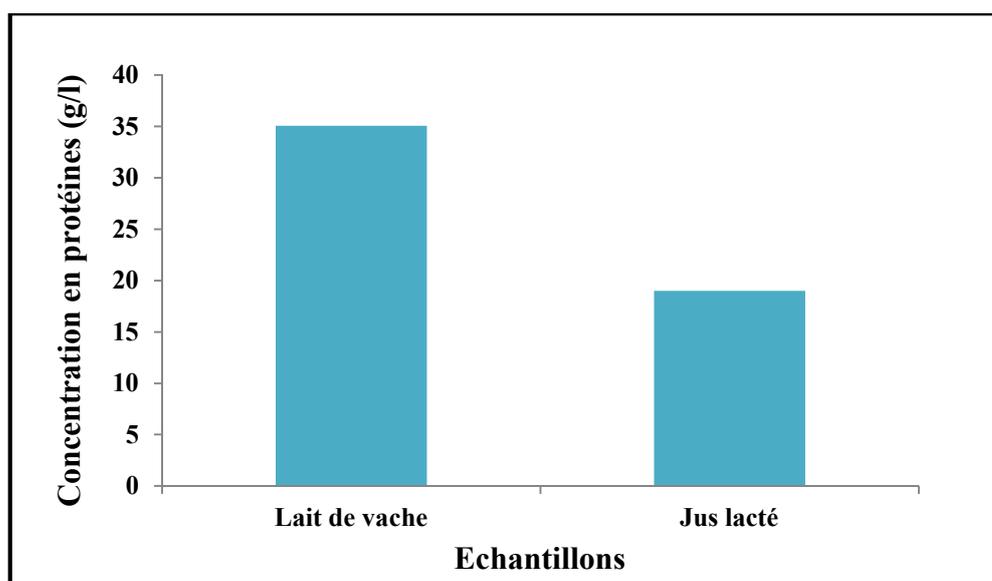


Figure 14: Concentration en protéines des échantillons étudiés.

Selon les résultats obtenus, la concentration en protéines dans le lait de vache est plus élevée comparativement au jus lacté qui contient peu de protéines provenant du lait ajouté au jus. La concentration en protéines du lait de vache est conforme aux normes FIL-AFNOR qui est comprise entre 34 – 35 g /l.

La méthode de LOWRY *et al* (1951) est une méthode rapide, peu coûteuse, précise et reproductible et exprime mieux le taux de protéines présent dans un milieu, mais elle présente aussi des inconvénients, Son mécanisme d'action est mal connu.

D'autres méthodes sont utilisées pour le dosage de protéines telles que la méthode de Bradford, Biuret et Kjeldahl.

La méthode de Bradford est basée sur la fixation du bleu de coomassie. Sa mise en œuvre est simple et assez rapide avec un coût peu élevé. L'inconvénient de cette méthode est la présence des agents interférant avec le bleu de coomassie (BRADFORD, 1976).

La méthode de Biuret est basée sur le développement d'une coloration violette, elle est rapide, fiable et peu coûteuse, mais son inconvénient majeur est sa faible sensibilité(GUILLOU *et al*, 1976).

La méthode de Kjeldahl est caractérisé par la mise en œuvre assez longue, sensible et à coût peu élevé. L'inconvénient majeur de cette méthode est la valeur variable du facteur de conversion (variabilité du taux d'azote non protéique) (GUILLOU *et al*, 1976).

### 3.3. Dosage des glucides (méthode utilisant l'acide 3,5 Dinitrosalicylique (DNS))

Les jus d'orange commercialisés sont très riches en sucre réducteurs, nous avons effectué un dosage de ces sucres dans différents jus. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 15.

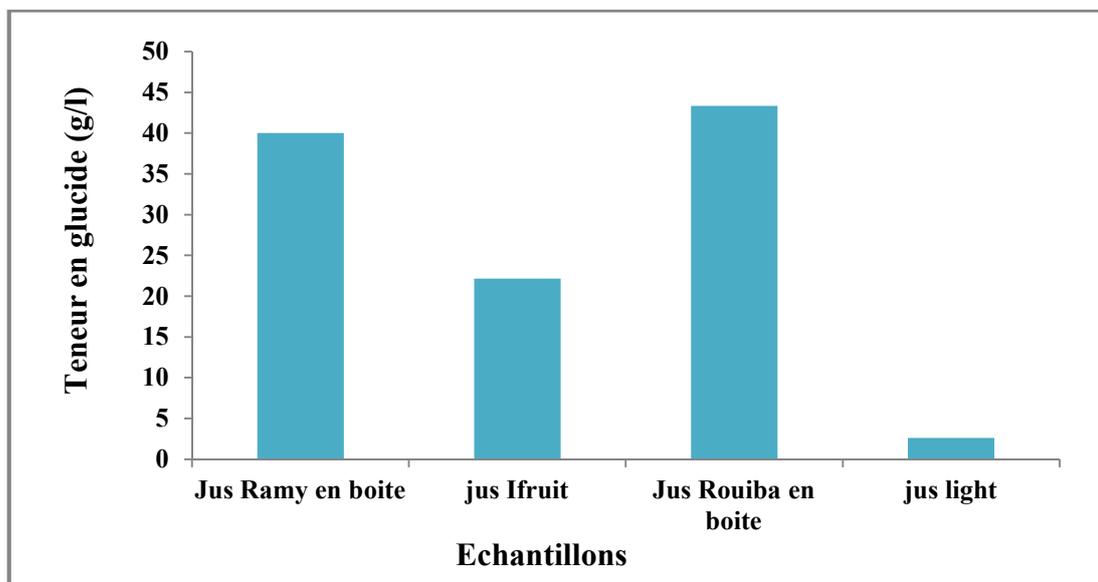


Figure 15: concentration en glucide dans les échantillons étudiés.

D'après les résultats obtenus par la méthode colorimétrique utilisant le DNS, les teneurs en glucides enregistrées pour les différents jus sont différentes, on remarque que le jus

Rouibaen boîte contient la teneur la plus élevée, suivi du jus Ramy puis Ifruit, Cependant le jus light contient une quantité très faible en sucre.

La teneur élevée en glucide dans ces jus pourrait être lié aux sucres et aux édulcorants ajoutés tels que définis dans la norme Codex sur les sucres ajouté aux jus (CX-STAN 212-1999), à savoir le sucrose, le dextrose monohydraté, le dextrose anhydre, le glucose, le fructose, le sirop de fructose et les sucres dérivés de fruits.

Les valeurs indiquées sur l’emballage des jus utilisés sont les suivantes : le jus Ramy 125 g/l, jus Ifruit : 104,5 g/l, Rouiba 120g/l. Les résultats obtenus montrent une différence significative par rapport aux normes indiquées. Cette différence pourrait être due aux conditions de stockage qui affectent la qualité microbiologique et organoleptique des jus utilisés suite à la présence des micro-organismes qui dégradent les glucides (fermentation).

Cette méthode n’est pas particulièrement robuste mais elle fournit malgré tous des résultats acceptables sur des mélanges simples de sucres, mais elle n’est pas très spécifique, ce qui empêche leur utilisation pour l’analyse des mélanges (HUDSON et BAILEY, 1980).

Une autre méthode peut être utilisée pour le dosage des sucres réducteurs (Glc, Fru). Il s’agit de la méthode de Bertrand, c’est une méthode à relation empirique, basée sur les propriétés des oses vis-à-vis des ions  $\text{Cu}^{+2}$  de la liqueur de Fehling en milieu alcalin à chaud, mais ce n’est pas une méthode spécifique des glucides réducteurs, d’autres substances peuvent réduire la liqueur et fausser le dosage.

La chromatographie phase gazeuse (CPG) est une méthode récente pour doser les glucides réducteurs, elle est plus spécifique, plus rapide et plus précise que la colorimétrie et les autres méthodes chromatographiques, son avantage étant de pouvoir doser tous les monomères, dimères ou même trimères de sucre à l’état libre ou obtenus après une hydrolyse.

### 3.4. Détermination des indices d’iode et d’acidité d’une matière grasse

#### 3.4.1. Détermination de l’indice d’acide

Les résultats de nos différents échantillons sont présentés dans la figure 16.

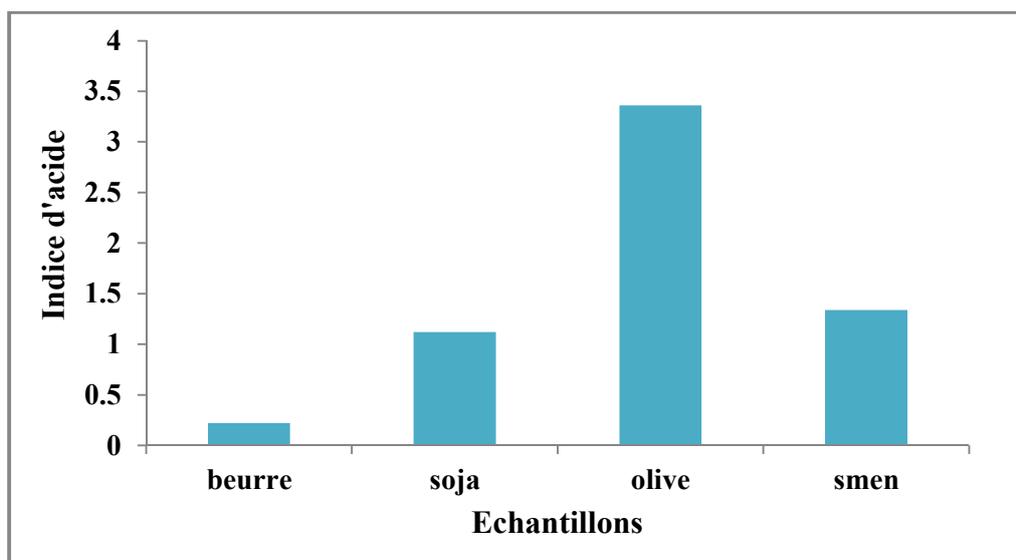


Figure 16 : l’indice d’acides des échantillons étudiés.

D'après les résultats obtenus, l'indice d'acide de l'huile d'olive est plus élevée, suivi du smen puis de l'huile de soja. Cependant le beur contient la quantité la plus faible.

L'acidité d'une l'huile est due à la présence de groupements carboxyles appartenant à des acides gras libres qui constituent l'huile. L'acidité élevée de l'huile d'olive utilisée indique sa teneur élevée en acides gras libres. Ceci pourrait être liée à l'état de maturité avancé du fruit, ou au stockage inadéquat des olives avant la trituration par l'action des lipases sur les triglycérides de l'huile d'olives qui provoquent l'augmentation de sa teneur en acides gras libres (CHIMI, 2001).

La norme d'indice d'acide du beurre est satisfaisant si IA < 2,5 mg de KOH ce qui veut dire que le beur analysé (0,22) est conforme à la norme.

Les résultats montrent que les pourcentages d'acidité de huile d'olive étudié est de 3,3 et permettent de les classer dans la catégorie des huiles d'olive vierges courantes (Ollivier *etal*, 2007) telle qu'elle est définie par les normes internationales (3,3 %) (C.O.I., 2005 ; Codex Alimentarius., 2003).

### 3.4.2. Détermination de l'indice d'iode

L'indice d'iode est une appréciation de l'insaturation des acides gras (NAUDET, 1988). Les indices d'iode et le nombre d'insaturations de nos échantillons sont représentés dans la figure 17 et le tableau V respectivement.

Tableau V : indice d'iode et nombre d'insaturations de différents échantillons étudiés.

échantillons	Beurre	Soja	Olive	Smen
Nombre d'insaturations	$3,99 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	$4,39 \times 10^{-4}$	$5,58 \times 10^{-4}$

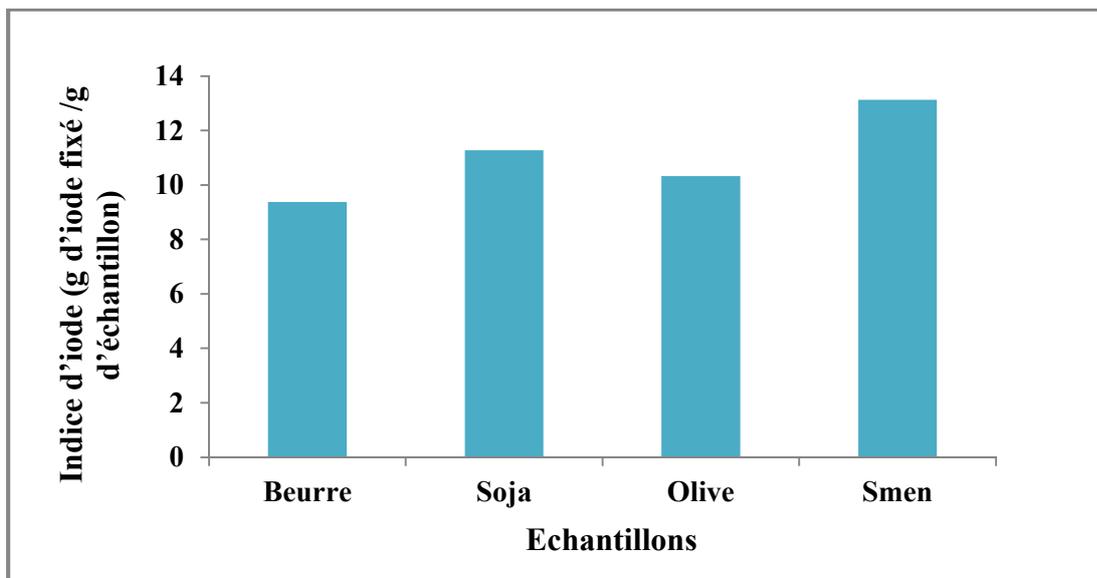


Figure 17: indice d'iode des échantillons étudiés.

D'après les résultats obtenus, le Smen a l'indice d'iode le plus élevé suivi de l'huile de soja et de l'huile d'olive alors que le beurre a l'indice le plus faible vu son origine animale.

L'huile de soja est riche en acides gras insaturés ce qui explique son indice élevé. Elle comprend 23% d'acides gras monoinsaturés (24% d'acide oléique C18 :1) et 59% d'acides gras polyinsaturés (Acide  $\alpha$ -linoléique, acide linoléique) (SEGHER et BENAHMED 2014). Les pourcentages moyens des acides gras saturés de l'huile de soja est de 14,5% (Acide palmitique, acide stéarique).

Selon le codex alimentaire (2003), l'huile d'olive contient 50-80% d'Acide oléique (C18, 1); 10-17% d'acide palmitique (C16 : O); 10% d'Acide linoléique (C18 : 2), pour cela l'huile d'olive est riche en acides gras monoinsaturés principalement l'acide oléique.

Le beurre est riche en acides gras saturés environ 60% à 65% des matières grasses. Les acides palmitique, myristique et laurique représentent environ les deux tiers de la quantité d'acides gras saturés du beurre. Cependant, le beurre est pauvre en acides gras insaturés qui représentent 35 à 40% des matières grasses du beurre. On distingue les acides gras monoinsaturés principalement l'acide oléique (C18 :1  $\omega$ 9) et les acides gras polyinsaturés, (moins de 4 % des acides gras totaux), essentiellement l'acide linoléique (C18 :2  $\omega$ 6)

Plusieurs méthodes pourraient être appliquées. Il s'agit de la méthode de Wijs en présence de trichlorure d'iode ; méthode de Hanus en présence de monobromure d'iode et la méthode au brome, mais la méthode de Wijs est certainement la plus utilisée notamment à cause de sa grande disponibilité sur le marché (Ollé, 2002).

### **3.5. Hydrolyse enzymatique des protéines du lait et de l'œuf par la papaïne**

La digestion enzymatique des protéines du lait de vache (caséines) et de l'œuf (l'albumen) génère à la fois des acides aminés libres ainsi qu'une grande quantité de peptides.

La papaïne (EC 3.4.22.2) est une protéase d'origine végétale à cystéine de PM de 25 Kda qui catalyse le clivage des liaisons peptidiques avec une spécificité assez faible. Elle présente une séquence primaire de 212 résidus d'acide aminé (23 kDa). La structure tridimensionnelle se présente sous forme de deux domaines distincts qui emprisonnent le site catalytique. Cette enzyme contient trois acides aminés Cyst<sup>25</sup>, His<sup>159</sup> et Asp<sup>158</sup> sur lesquels repose l'action catalytique. C'est une enzyme d'intérêt industriel utilisée dans l'industrie alimentaire, la clarification de la bière, ainsi que dans la préparation d'hydrolysats de protéine. On trouve cette enzyme dans le latex de la papaye (*Carica papaya*) ainsi que dans l'ananas, (Kim et al, 1992) ou de mammifères (cathepsine B) (FOX et KELLY, 2006 ; KELLY *et al*, 2006)

Nous avons suivi la cinétique de cette enzyme par électrophorèse en conditions dénaturantes (PAGE-SDS). On a obtenu des hydrolysats à différents temps d'incubation notés en minutes comme suit : T'0, T'15, T'30, T'60, T'120 à 40°C.

#### **3.5.1. Le comportement électrophorétiques des hydrolysats des caséines du lait de vache**

Les caséines sont les protéines qui se précipitent lors d'une acidification à pH 4,6 pour le lait bovin, 4.3 pour le lait camelin (WANGOH *et al*, 1998 b) et 4.2 pour le lait caprin (MATI *et al*, 1991). Elles sont présentées sous forme de particules colloïdales nommées micelles de

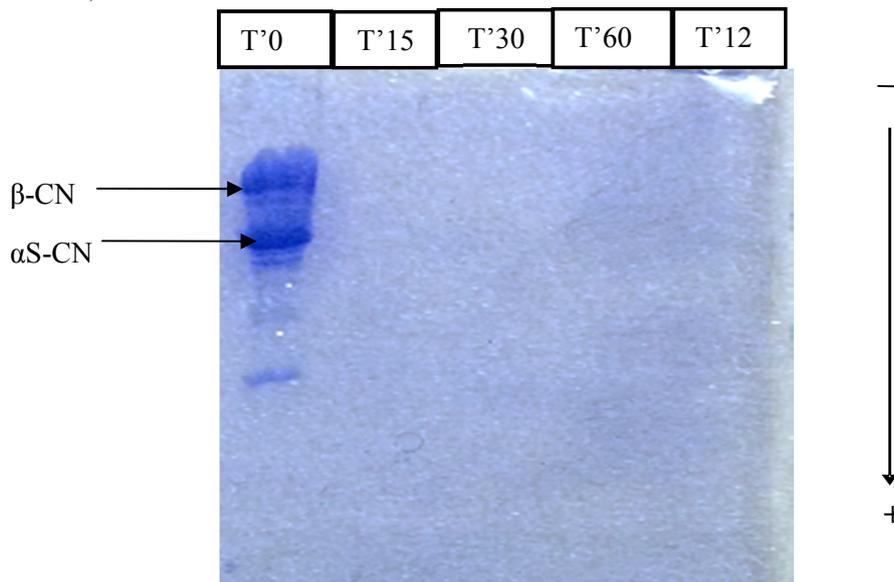
caséine. Les caséines majeures sont de nombre de quatre. Elles sont dénommées caséines  $\alpha S_1$  ( $\alpha S_1$ -CN), caséine  $\alpha S_2$  ( $\alpha S_2$ -CN), caséine  $\beta$  ( $\beta$ -CN) et enfin caséine K (K -CN).

Selon les données bibliographiques, les caséines de lait bovin migrent en PAGE-Native suivant l'ordre croissant de leurs mobilités électrophorétiques comme suit :



Selon le profil électrophorétique (figure 18), à T0 (sans hydrolyse), on observe deux bandes avec des poids moléculaire différent qui correspondraient aux caséines du lait de vache, à savoir la caséine  $\alpha S$  et la caséine  $\beta$ .

Les résultats montrent qu'il y'a eu une hydrolyse totale après 15min d'incubation. Ceci pourrait due à la très grande sensibilité des caséines à l'action de l'enzyme (PHADUNGATH, 2005).

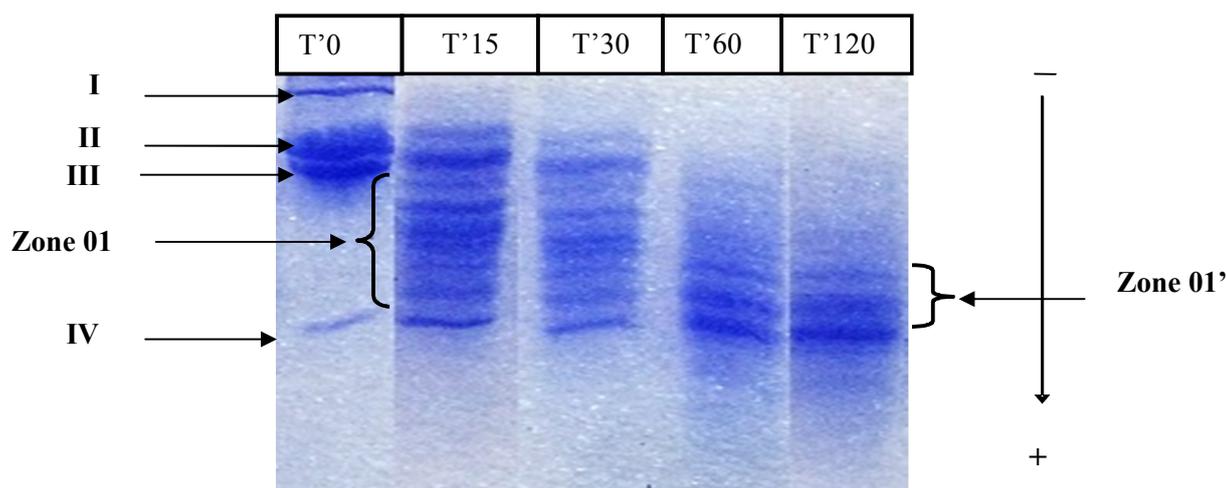


**Figure 18:Electrophorègramme des caséines du lait de vache en PAGE-SDS (Gel de séparation (T = 17 %). Le tampon : Tris HCL 0,5M ; pH 6,5 ; T=40°C ; E/S : 1/100 ;Temps d'incubation en minute : T'0, T'15, T'30, T'60, T'120.**

### 3.5.2. Le comportement électrophorétique des protéines totale de l'œuf

Les protéines du blanc d'œuf ont été longtemps considérées comme protéines de références grâce à leur composition en acides aminés indispensables. En plus de leur valeur nutritionnelle élevée, ces protéines présentent plusieurs propriétés fonctionnelles telles que les propriétés moussante, gélifiante, et coagulante. Ces propriétés offrent un attrait important pour l'industrie agroalimentaire.

Les protéines totales de l'œuf sont peu sensibles au traitement enzymatique en raison de leur structure globulaire très compacte riche en feuillettes et en hélice, ce qui rend l'accessibilité des enzymes aux sites de clivage très réduite.



**Figure 19 : Electrophorègramme en PAGE-SDS des hydrolysats protéiques libérés après l'action de la papaïne sur les protéines totale de l'œuf; Le tampon : Tris HCL 0,5M ; pH 6,5 ; T=40°C ; E/S : 1/100 ; Temps d'incubation en minute : T'0, T'15, T'30, T'60, T'120.**

La figure 19 représente l'analyse électrophorétique en conditions dissociantes et dénaturantes des hydrolysats de protéines du blanc d'œuf à des temps d'incubation différents.

Le blanc d'œuf constitue une source importante de protéines dont le nombre dépasse une vingtaine. Cependant, certaines restent non identifiées.

Sur le profil électrophorétique (figure 19), nous observons que:

- ✓ à T'0, quatre bandes de poids moléculaires différents, notées bande I, II, III et IV, sont présentes avec des intensités différentes ;
- ✓ la bande I disparaît totalement après 15 mn d'incubation ;
- ✓ les bandes II, III disparaissent totalement après 60' d'incubation ;
- ✓ la bande IV semble résister à l'action de la papaïne ;
- ✓ la présence de zones différentes :
  - l'hydrolyse des bandes I, II et III a donné de nombreux fragments représentés dans la zone 01. Ces derniers apparaissent après 15 mn d'incubation mais ne semblent pas résister à l'action de l'enzyme puisqu'une bonne partie disparaît après 60 mn d'incubation à l'exception de la zone 01' qui semble résister même après 120 min d'incubation.
- ✓ La sensibilité des protéines totale de l'œuf à la papaïne est établie dans l'ordre  $IV < III < II < I$ .

En page SDS les résultats montrent que les protéines totale de l'œuf sont peu sensible à l'action de de la papaïne.

### **3.6. Isolement des protéines sériques cameline et bovine par chromatographie de perméation suivie d'un contrôle électrophorétique**

Les méthodes chromatographiques sont très indiqués pour l'isolement et la purification des protéines que se soit en base ou à haute pression.

Nous avons essayé de fractionner les protéines sériques cameline et bovine en utilisant la chromatographie sur gel de perméation sur Sephacryl S200.

• Cas des protéines sériques cameline

Le profil chromatographique obtenu (figure 20) peut être réparti en 5 fractions (notées de F1 à F5) correspondant aux pics d'absorption enregistrés.

Le contrôle électrophorétique, en PAGE-Native, réalisé sur ces fractions (figure 21) montre que les protéines sériques du lait de chamelle se caractérisent par l'apparition de quatre bandes principales, d'intensité différente, correspondant respectivement aux bandes notées de I à IV.

Selon les données bibliographiques, la bande I correspondrait aux immunoglobulines (Igs), la bande II à la BSA, la bande III à l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -La)(FARAH, 1986 et OCHIRKHUYAG, 1998).

La bande IV pourrait correspondre à des variants génétiques de l' $\alpha$ -La surtout que CONTI *et al* (1985) ont mis en évidence deux variants génétiques pour l' $\alpha$ -La cameline.

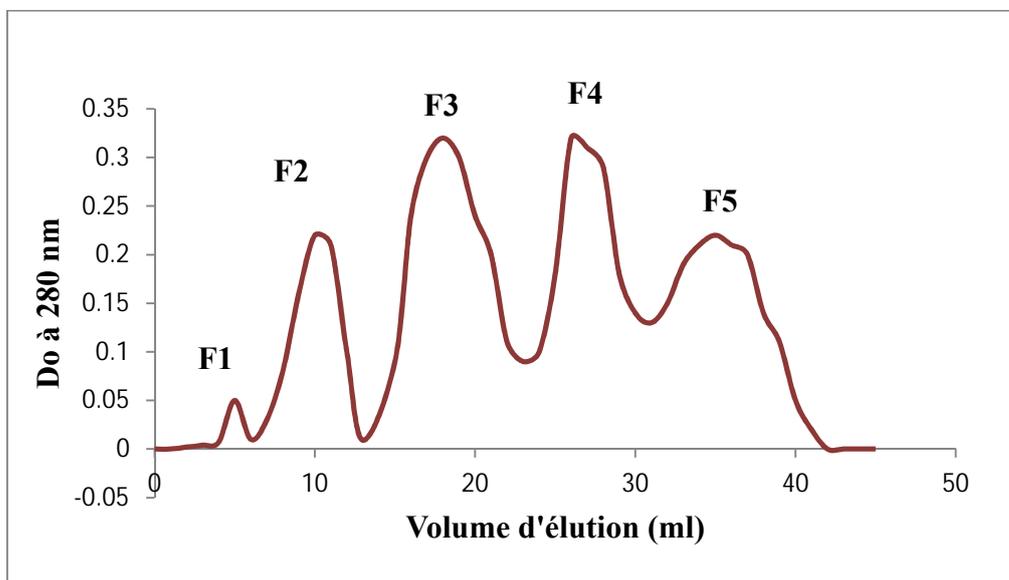
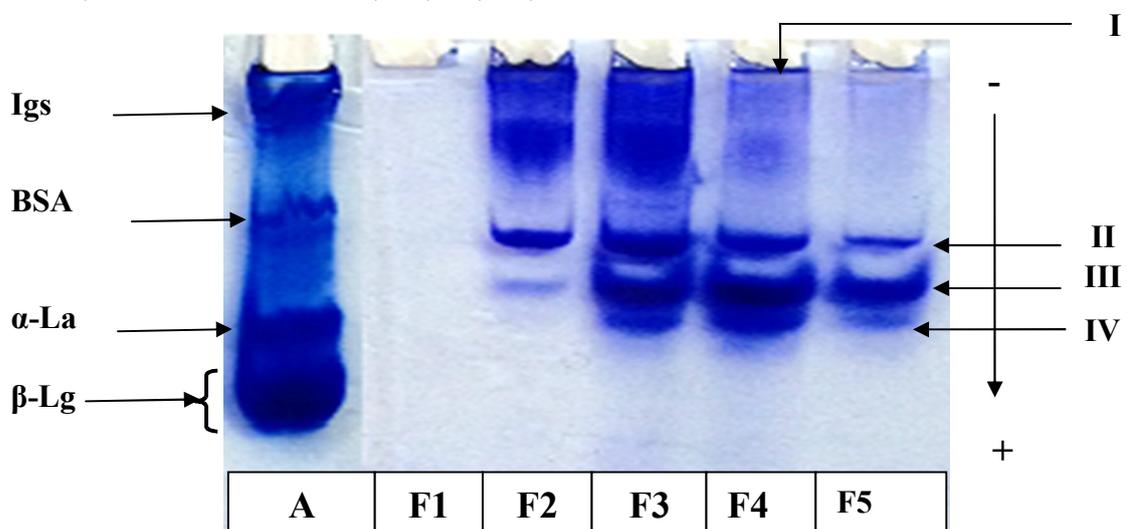


Figure 20: Chromatogramme d'isolement des protéines sériques du lait de chamelle sur gel de sephacryl S200 ; Colonne (20x1 cm) ; tampon Tris HCL 0,02 M ; pH 8,4, débit : 1,5ml/mn, fractions éluées : F1, F2, F3, F4, F5.



**Figure 21: Profil électrophorétique en PAGE-Native des fractions de protéines sériques camelines éluées en chromatographie de perméation T=12% ; A : protéines sériques bovine ; F1, F2, F3 et F4 : fractions éluées**

L'électrophorèse en PAGE-native, réalisée sur ces fractions (figure 21) a montré que :

- ✓ la fraction F1 ne renferme aucune bande visible sur le gel ;
- ✓ la fraction 2 renferme les bandes I et II, de forte intensité, qui correspondraient respectivement aux Igs et à la BSA. La bande III qui correspondrait à l' $\alpha$ -La est faiblement présente dans cette fraction ;
- ✓ la fraction 3 et 4 renferment les 4 bandes de forte intensité correspondant aux quatre protéines sériques du lait camelin notée plus haut ;
- ✓ la fraction 5 renferme les bandes II et IV de faible intensité et la bande III de forte intensité.

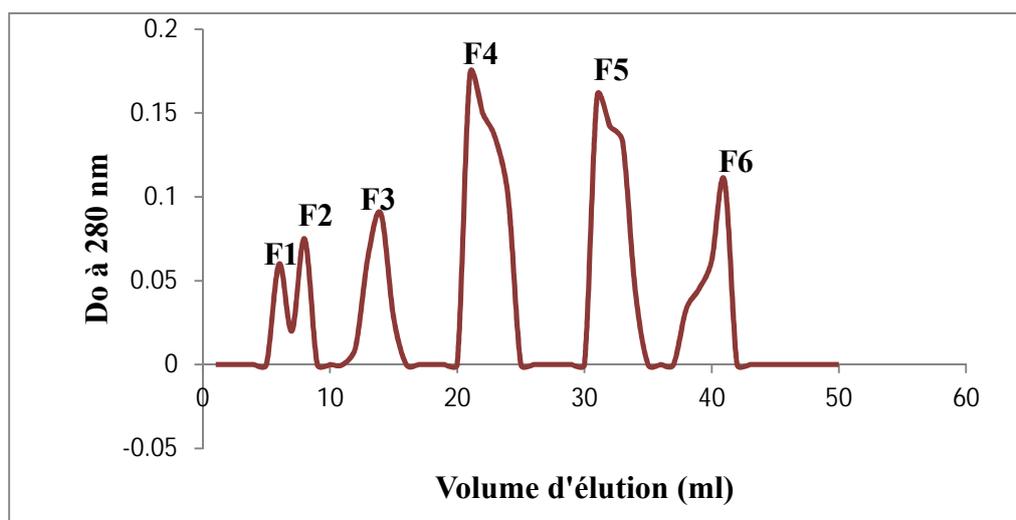
Ces résultats suggèrent que les protéines sériques camelines n'ont pas été purifiées car toutes les fractions renferment les quatre protéines sériques coéluées à des degrés différents.

- **Cas des protéines sériques bovines :**

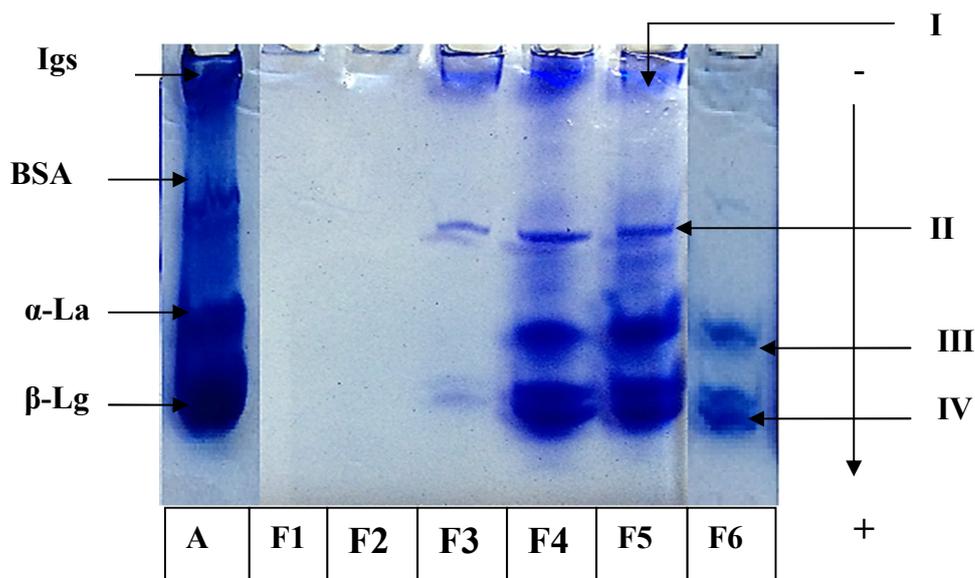
Le profil chromatographique obtenu (figure 22) montre 6 fractions (notées de F1 à F6) correspondant aux pics d'absorption enregistrés.

Le contrôle électrophorétique, en PAGE-Native, réalisé sur ces fractions (figure 23) montre que les protéines sériques du lait de vache se caractérisent par l'apparition de quatre bandes principales, d'intensité différente, correspondant respectivement aux bandes notées de I à IV.

Comparativement au témoin bovin, la bande I correspondrait aux immunoglobulines (Igs), la bande II à la sérum albumine bovine (BSA), la bande III à l' $\alpha$  lactalbumine ( $\alpha$ -La) et la bande IV à la  $\beta$  lactaglobuline ( $\beta$ -Lg).



**Figure 22 : Chromatogramme des protéines sériques camelines obtenu sur colonne (1 x 20 cm) de Sephacryl S200 en milieu Tris-HCl 0.02 M, pH 8.4 et débit : 1,5 ml/mn, F1 ; F2, F3 et F4 : fractions éluées.**



**Figure 23 : Profil électrophorétique en PAGE-Native des fractions de protéines sériques bovines éluées en chromatographie de perméation T=12% ; A : le témoin (le marqueur) du lait bovin ; F1, F2, F3 et F4 : les fractions éluées.**

Le contrôle électrophorétique (figure 23) réalisé sur les fractions obtenues a montré que :

- ✓ Les fractions F1 et F2 ne renferment aucune bande visible sur le gel
- ✓ La fraction F3 renferme la bande II, de faible intensité, qui correspondrait à la BSA faiblement présente dans cette fraction.
- ✓ Les fractions F4 et F5 renferment les bandes I, II, III et IV, de forte intensité, qui correspondraient respectivement à la BSA,  $\alpha$ -La et la  $\beta$ -Lg.
- ✓ La fraction F6 renferme les bandes III et IV de faible intensité

Ces résultats suggèrent que les protéines sériques bovines n'ont pas été purifiées car toutes les fractions sont coélues à des degrés différents.

Cette technique nous a révélé que les protéines sériques bovines et cameline n'ont pas été purifiées à un degré de pureté plus élevé. Le recours à des techniques de séparation et d'identification plus fines (HPLC, séquençage des protéines...) permettent une identification complète des bandes protéiques obtenues.

# *Conclusion*

## **Conclusion**

L'évaluation des paramètres physicochimiques des produits alimentaires constitue une étape fondamentale pour le contrôle de la qualité de ces derniers.

Le contrôle de la qualité d'un produit alimentaire offre la garantie de répondre à cinq critères fondamentaux, il s'agit de la sécurité, soit les critères sanitaires et de salubrité, la santé, soit l'aspect nutritionnel et de non toxicité, la satisfaction, le service, enfin la standardisation.

Les résultats obtenus dans notre stage pratique montre que :

- ✓ tous les jus ont un pH acide (jus Ramy, jus Ifruit et jus Rouiba : pH 3,2 – 3,3) tandis que le jus lacté a un pH légèrement plus élevé que les autres jus (pH 4,36) ;

Le jus Rouiba en boîtes possède la concentration la plus élevée en vitamine C, suivie par le jus Ifruit puis le jus Ramy en bouteille. Par ailleurs, les résultats montrent que le jus lacté contient la quantité la plus faible en vitamine C ; la concentration en protéine dans le lait de vache est plus élevée comparativement au jus lacté qui contient peu de protéines ;

Le jus Rouiba en boîte contient la teneur la plus élevée en glucides, suivi du jus Ramy puis Ifruit, Cependant le jus light contient une quantité très faible en glucides ;

- ✓ l'huile d'olive contient la teneur la plus élevée en indice d'acide, suivi du smen puis de l'huile de soja. Cependant le beur contient la quantité la plus faible.

Le Smen a l'indice d'iode le plus élevé suivi de l'huile de soja et de l'huile d'olive alors que le beurre a l'indice le plus faible.

Les protéines totales de l'œuf sont peu sensibles au traitement enzymatique en raison de leur structure globulaire contrairement aux caséines bovines qui sont trop sensibles grâce à leur structure ferme ;

- ✓ le contrôle électrophorétique nous a révélé que les protéines sériques camelines et bovines n'ont pas été purifiées à un degré plus élevé ;

- ✓ Les méthodes utilisées fournissent des informations sur la qualité du produit analysé. Ces méthodes sont de mise en œuvre facile, de faible coût et permettent d'obtenir des résultats à court durée.

*Références  
bibliographiques*

**ABDELLAOUI R. (2007).** Obtention et caractérisation d'une Enzyme Coagulant le lait D'aspergillus Niger Isole au Sol de la région de Boumerdès. Thèse de Magister en génie Alimentaires. Faculté des Sciences de l'Ingénieur. Université de Boumerdès. 96 p.

**ABUHARFEEL N.M. and ABUEREISH G.M. (1984).** Isolation and characterization of camel pepsine. *Comp Biochem. Physiol. A*, 77 (11), 175- 182.

**ALAIS C. (1974).** Science du lait ; principes des techniques laitières, 3ème ed., Publicité Sep, 807p

**ALAIS C. (1984).** Principe des techniques laitières. Science du lait. 4 Ed. Sepaic, 68.

**ALAMAREOT J. (1982).** Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaire, édition du point vétérinaire-Alfort P1982.289.

**AL-MZAIEN k .A. (2007).** Extraction, purification and characterization of camels pepsin (camelus dromadarius). *Iraqi. J. Biotech.*, 6 (2), 64- 76.

**ANDREN A. (1992).** Production of prochymosin, pepsinogen and progastricsin and their cellular and intracellular localization in bovine abomasal mucosa. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 54 (Suppl. 210), 59–64.

**ANDREN A., BJORCK L. (1986).** Milk-feeding maintains the prochymosin production in cells of bovine abomasal mucosa. *Acta Physiol. Scand.* 126, 419–427.

**ANONYME 1.** Procédé de fabrication de la présure d'origine animale. [Extraction.htm](#) de la présure. Htm.

**ANTONINI J. et RIBADEAU DUMAS B. (1971).** Isolement, purification et propriétés de deux zymogènes gastriques bovins, propriétés des protéases correspondants. *Biochimie*, 53:321-329.

**AOAC,** Official Methods of Analysis. 1997. 15th Ed., Association of Official Analytical Chemistry, Washington DC.

**AUDIGIE CL., DUPONT G. et ZONZAIN. (1995).** Principes des méthodes d'analyse biochimique : tome 1, DOIN, France.

**BARBANO, D. M., et RASMUSSEN R. R. (1992).** Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants *J.dairy Sci.* 75:1-12.1992.

**BAUDYS M, ERDENE TG, KOSTKA V, PAVLIK M, FOLTMANN B. (1988).** Comparison between prochymosin and pepsinogen from lamb and calf. *Comp Biochem Physiol, B* 89: 385–391.

**BELDARRAIN A, ACOSTA N, MONTESINOS R, MATA M, CREMATA J. (2000).** Characterization of *Mucor pusillus* rennin expressed in *Pichia pastoris*: enzymic, spectroscopic and calorimetric studies. *Biotechnol Appl Biochem* 31 (Pt 2): 77–84.

**BOHAK, Z. (1969).** Purification and characterisation of chicken pepsinogen and chicken pepsin *J. biological chemistry*. Vol. 244, N° 17: p.4638-4648.

**BOUKHARY. (2008).** Travaux pratique de biochimie structurale deuxième année biologie-géologie. Faculté des sciences et techniques. Université NOUAKCHOTT. p60.

**BOURGEOIS C.F. (2003).** Les vitamines dans les industries agroalimentaires. Paris : éd. Tec et Doc Lavoisier. p708. ISBN 2-7430-0524-6.

**BREWER P., HELBIG. et HAARD N. N. (1984).** Atlantic cod pepsin. Characterization and use as a rennet substitute. *Canadian. Int. Food SCI. Tech J.* Vol 17. P38- 42.

**BRULE G. et LENOIR J. (1987).** La coagulation du lait in *Le Fromage A.* Eck 2ème édition Tech. Et Doc.

**BRULE, G., LENOIR, J., et REMEUF, F. (1997).** La micelle de caséine et la coagulation du lait In: *Le fromage.* Ed., A. Eck, 3ème ed., Technique et documentation Lavoisier, Paris, p.7-41, 891p.

**CARDOZA RE, GUTIERREZ S, ORTEGA N, COLINA A, CASQUEIRO J, MARTIN JF. (2003).** Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene in *Aspergillus awamori* from constitutive and pH-regulated promoters and secretion using two different pre-pro sequences. *Biotechnol Bioeng* 83: 249–259.

**CHEESEMAN, G. C. (1981).** Présure et fabrication de fromage, enzyme and food processing. applied, Publisher. ldt. London. 85.

**CHEFTEL J. C. et CHEFTEL. H. (1980).** Introduction a la technologie des aliments. Vol : 1. Tech et Doc. Lavoisier. P381.

**CHITPINYOL, S., GOODE, D. AND CRABBE, M. J. C. (1996).** Does crystallin chaperone prochymosin folding? In *Perspectives on Protein Engineering* ed. M. J. Geisow. Biodigm Ltd.

**CLAVERIE I. et PANET M. (2008).** Biochimie. 2e édition. Edition Wolters Kluwer, France. p87.

**CREAMER, L.K. (2002).** Casein nomenclature, structure and association properties In: Encyclopedia of Dairy Science, Ed., H. Royinski, J. Fuquay, and P. Fox, Elsevier science Ltd, p.1895-1902

**CUVELIER, G.F. (1993).** Production des enzymes In: Biotechnologie. Ed., R. Scribon, 4 ème ed., Technique et documentation Lavoisier, p.948.

**DAI X, CHEN Q, LIAN M, ZHOU Y, ZHOU M, LU S, CHEN Y, LUO J, GU X, JIANG Y, LUO M, ZHENG X. (2005).** Systematic high-yield production of human secreted proteins in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 593–601.

**DALGLEISH D.G. (1997).** The Enzymatic coagulation of milk. in *Advanced Dairy Chemistry V1 Proteins*. P.F. Fox Blackie and son Ltd. P579-619.

**DANLEY D.E. GEOGHEGAN K.F. (1988).** Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C. *J. Biol. Chem.*, 263, 9785-9789.

**DEMAIN AL. et VAISHNAV P. (2009).** Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27: 297–306.

**DESMAZEAUD J.M. (1981).** Principales utilisations des enzymes en industrie laitière, aspects scientifiques et techniques. *Industr. aliment, agric*, 98 : 195-204.

**ECK ANDRE et JEAN CLAUDE GILLIS. (1997).** Les Enzymes D'origine Animale : Le Fromage De La Science A L'assurance Qualité, 3ème Edition, Lavoisier Tec& Doc. Paris.

**ELAGAMY E.I. (2000).** Physicochemical, Molecular and Immunological Characterization Of Camel Calf Rennet: A Comparison With Buffalo Rennet. *J. Dairy Res.* 67: 73-81.

**EMTAGE J.S., ANGAL S., DOEL M.T., HARRIS T.J.R., JENKINS B., LILLEY G., LOWE P.A. (1983).** Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 3671-3675.

**ERNSTROM C.A. (1983).** Milk clotting enzymes and their action in fundamentals of dairy chemistry. Webb B.H., AH. Johnson and J.A. Alford . The Avi Publishing company Inc. 2nd Edition. PP 663-718.

**ERNSTROM, C.A. et WONGT, N.P. (1983).** Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In: *Fundamentals on dairy chemistry*. Ed., B.H. Webb, A.H.Johnson and J.A. Alfold .2ème ed., the Avi publishing Company Inc, p. 662-771, 929p.

**FOLTMAN B. (1977).** Prochymosin and Chymosin (Prorennin and Rennin). *Methods In Enzymology*, 19: 421-436.

**FOX P. F. WHITAKER J. R and O'LEARY P. A. (1977).** Isolation and caractérisation of sheep pepsin. *Biochem. J.*, 161, 389 -398.

**FOX P. F. (1989).** The milk protein system in *Developpements in dairy chemistry Functional milk proteins* pp1-53 Elsevier science publishers.

**FRANKE A.E., KACZMAREK F.S., EISENHARD M.E., GEOGHEGAN K.F., DANLEY D.E., DE ZEEUW J.R., O'DONNELL M.M., GOLLAHER M.G. Jr., DAVIDOW L.S. (1988).** Expression and secretion of bovine prochymosin in *Yarrowia lipolytica*. *Dev. Ind. Microbiol.*, 29, 43-57.

**FOLTMANN B. (1992).** Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases. *Scand J Clin Lab Invest* 210: 65–79.

**FOLTMANN B. (1993).** General and molecular aspects of rennets. In Fox PF. (eds), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp 37–88). London: Elsevier.

**FOX P. F. and KELLY A. L. (2006).** Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects: Review. *International Dairy Journal*, 16, 500–516.

**GENEX. (1985).** Production of chymosin by recombinant DNA methods. European Patent Application EP 134662.

**GBOGOURI G. (2005).** Co-valorisation des protéines et des lipides riches en lécithine et en acides gras polyinsaturés oméga 3 à partir de têtes de saumon (*salmo salar*) par hydrolyse enzymatique. Thèse doctorat. L'Institut National Polytechnique de Lorraine. LORRAINE. P

**GOFF C.G., MOIR D.T., KOHNO T., GRAVIUS T.C., SMITH R.A., YAMASAKI E., TAUNTON-RIGBY A. (1984).** Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 27, 35-46.

**GORDIN S. et ROSENTHAL I. (1978).** Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *Journal of food protection* September Vol. 41 N° 9 (684-688).

**GREEN M.L. VallerM.J. Kay J. (1984).** Assesement of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparations. *Journal of dairy research* (1984), 51, 331-340.

**GRIPON J.C, DESMAZEAUD J.M., LEBARS D et BERGÈRE J.L. (1975).** Etude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Le Lait*, 548 : 502-516.

**GUERARD F. (1987).** Une utilisation des enzymes protéolytiques extraites des viscères de poissons : La coagulation du lait. *Institut pêches maritimes*.49, N°3, PP 199-203.

**GUILLOU H., PELISSIER J.P. et GRAPPIN R. (1976).** Méthodes de dosage des protéines de lait de vache. *Le Lait*, 66, 143-175.

**GUÉRARD. F et LEGAL. Y. (1986).** L'activité coagulante d'une pepsine de la Roussette *Scyliorhinus canicula*. *C.R. Soc. Biol.*, 180 : 651-655.

**GUILLOU H., PELISSIER J.R., et GRAPPIN R. (1986).** Méthodes de dosage des protéines du lait de vache, lait, 66, 143- 175.

**HAARD N.F., SHAMSUZZAMAN K., BREWER P. et ARUNCHALAM K. (1985).** Enzymes from marine organisms as rennet substitutes In : Utilisation des enzymes en technologie alimentaire. Ed., P.Dupuy. Technique et documentation Lavoisier p237-242.

**HARBOE M., ANDERSEN P.M., FOLTMANN B. (2010).** The activation of bovine pepsinogen sequence of the peptides released, identification of a pepsin inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 249, 4487-4494.

**HILL R., LAING R. (1965).** The action of rennin on casein: the effect of modifying functional groups on the rennin. *Biochim Biophys Acta* 99: 352–359.

**HASSAN MD. I., TOOR A. and AHMAD F. (2010).** Progastriscin : structure, function, and Its role in turn progression. *J. Mol. Cell. Biol.*, 2, 118- 127.

**KAGEYAMA T. (2006).** Pepsinogens. Progastrisins, and prochymosins : structure, fixation, evolution, and development. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59, 288- 305.

**KAPPELER SR, VAN DEN BRINK HJ, RAHBK-NIELSEN H., FARAH Z., PUHAN Z., HANSEN EB., JOHANSEN E. (2006).** Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 647–654.

**KAWAGUCHI Y., KOSUGI S., SASAKI K., UOZUMI T., BEPPU T. (1987).** Production of chymosin in *Escherichia coli* cells and its enzymatic properties. *Agric Biol Chem* 51: 1871–1877.

**KIM H. H. Y. and JIMENEZ-FLORES R. (1992).** Comparison of milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 77, 2177-2190.

**KLESSEN C., SCHMIDT K.H., GUMPERT J., GROSSE H.H., MALKE H. (1989).** Complete secretion of activable bovine prochymosin by genetically engineered L forms of *Proteus mirabilis*. *Appl. Environ. Microb.*, 55, 1009-1015.

**KLIMICZAK I., MALICKA M., SZLACHTA M and GLISZCZYNSKA. (2007).** Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of food composition and analysis*. 20 : 313-322.

**KOLMER M., ORD T., ULMANEN I. (1991).** Expression of recombinant calf prochymosin in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.*, 20, 131-140.

**KREVEZET, M.V., Siebenthal, A.M et Kanfman, A. (1996).** Determination of the relative efficacy to enhance milk renneting properties of alternation in dietary and stage of lactation. N° 11. Vol : 51. P403- 413.

**KUMAR S., GROVER J., SHARMA V. K. et BATISH. (2010).** Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4), 243-258.

**LENOIR J. (1985).** Les caséines du lait. *Rev lait franç*, 440 : 17-23.

**LILLA S., MOGNAG. And ADDEOF. (2005).** Validation of recombinant and bovine chymosin by mass spectrometry. *J. Agric. Food chem.*, 53, 5230- 5238.

**LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L et RANDALL R.J. (1951).** Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of molecular Biology*. 193,265-275.

**LUCEY J. K. (2002).** Rennet coagulation of milk ; in : « Encyclopedia of Dairy Science ». Elsevier, New York.

**LUCEY J.L. et FOX P.F. (1993).** Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture : a review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1714- 1724.

**MAHAUT M., JEANTET R et BRULE G. (2003).** Initiation à la technologie fromagère, Tec et Doc lavoisier. France.

**MAREZ M., JEHL B., MADET N. (2004).** L'acide ascorbique et son utilisation tant qu'additif dans les industries alimentaires, licence, Gaultier, Paris.

**MARTIN B. et Coulon J.B. (1995).** Milk production and cheese characteristics: influence of milk production conditions on herd milk clotting ability. *Le lait*. N°1. Vol : 75.P61-68.

**MARTIN P., TRIEU-CUOT P., COLLIN J.C., RIBADEAU-DUMAS B. (1982).** Purification and characterization of bovine gastricsin. *Eur. J. Biochem*. 122, 31–39.

**MARSTON F.A.O., LOWE P.A., DOEL M.T., SCHOEMAKER J.M., WHITE S., ANGAL S. (1984).** Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. *Bio- Technol.*, 2, 800-804.

**MATHIER U. (1981).** Presure, pepsine bovine et protéases acides en fromagère. Circulaire du 28 Janvier 1981. Technique laitiere. Vol : 954. P59- 52.

**MATI A., GIRARDET J-M., XENAKIS D. and LINDEN G. (1991).** Isolement and caractérisation de la fraction hydrophobe des protéose-peptones des laits bovin, ovin and caprin. *Lait*, 71, 259-273.

**MATI A., MOULTI-MATI F., GIRARDET J M., FOKOU E., BELLEVILLE-NABET F., and LINDEN G. (1992).** Mitogenic activity of hydrophobic fractions of proteose peptone from cows', ewes' and goats' milk measured with MARK 3 hybridoma culture. *Journal of Dairy Research*, 60(3), 443-448.

**MICHAEL ESKIN N.A. (1990).** Biochemistry of food 2nd edition Academic press, Inc.

**MISTRY V.V. (2012).** Chymosine in cheese making : in food biochemistry and food processing second Edition Edited by BENJAMIN K. Simpson, BLACHWELL Publishing 241- 252.

**MOHANTY A.K., MUKHOPADHYAY S., GROVER S., BATISH V.K. (2003).** Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol. Adv.*, 17, 205-217.

**MOSCHOPOULOU EE, KANDARAKIS IG, ALICHANIDIS E, ANIFANTAKIS EM. (2006).** Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *J Dairy Res* 73: 49–57.

**NARITA Y., ODA S., MORIYAMA A. and KAGEYAMA T. (2002).** Primary structure, unique enzymatique properties, and molecular evolution of pepsinogen B and pepsin B. *Arch. Biochem. Biophys.*, 404, 177- 185.

**NEWMAN, M., SAFRO, M., FRAZAO, C., KHAN, G., ZDANOV, A., TICKLE, I. J., BLUNDELL, T. L. AND ANDREEVA, N. (1991).** X-ray analyses of aspartic proteinases IV: Structure of bovine chymosin. *Journal Mol. Biol.* 221, 1259±1309.

**NIELSEN P. K. and FOLTMAN B. (1995).** Purification and characterization of porcine pepsinogen B and pepsine B. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322, 417- 422.

**NISHIMORI K., SHIMIZU, N., KAWAGUCHI, Y., HIDAKA, M., UOZUMI, T., BEPPU, T. (1984).** Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the tryptophan promoter. *Gene*, 29, 41-49.

**NODA M. et MURAKAMI K. (1989).** Studies of proteinases from the digestive organs of sardine. II. Purification and characterization of two acid proteases from the stomach. *Biochem. Biophys. Acta.*, 658(1):27-34.

**NUNGARY A. et LEGOFFIC F. (1996).** Étude d'une lipase hépatique et de la pepsine d'un requin benthique en vue de la valorisation de ses viscères .utilisation des INIST.CNRS, travaux universitaires, université de Paris06.

**OLIVER H. Lowry. (2007).** Nira J. Rosebrough, A Lewis Farr et Rose J. Randall, « *Protein measurement with the Folin phenol reagent* », J. biol. Chem., vol. 193, n° 1, 1951, p. 265-275.

**PARENTE D., DEFERRA F., GALLI G., GRANDI G. (1991).** Prochymosin expression in Bacillus subtilis. FEMS Microbiol. Lett., 77, 243-250.

**PELMONT J. (1993).** Enzyme. Office de la publication universitaire, Alger.

**PHADUNGATH C. (2005).** Casein micelle structure: a concise review. *Journal of Science Technology*, 27(1), 201-212.

**POLAINA J. et MACCABE A.P. (2007).** Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications. Springer. Netherlands.

**RAMET. J.P. (1997).** Les agents de transformation du lait; la présure et les enzymes coagulantes In: Le Fromage. Ed., A. Eck, 3ème Ed., Tec Et Doc, Lavoisier, P.101-107, 539p

**RAMET. J.P. (2011).** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin Méditerranéen. Etude FAO production et santé animales, Rome. P16.

**RAMPILLI M., LARSEN R. and HARBOE M. (2005).** Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *Int. Dairy J.*, 15, 1130- 1137.

**REPS. A et ZELAZOWSKA. H. (1982).** Some faction affecting the proteolytique activity of a microbial enzyme preparation. *J. Food. Biotech.* N°5. Vol : 71, P1127- 1130.

**RICHTER C. TANAKA T. et YADA R.Y. (1998).** Mecanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastriecin and prochymosin. *Biochem Journal*, 335:481-490.

**ROGELJ I. PERKO B. FRANCKY A. PENCA V. PUNGERCAR J. (2001).** Recombinant Lamb chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme In Cheese Production. *J. Dairy Sci.* 84: 1020-1026.

**SCRIBAN R. (1999).** Biotechnologie. 5e édition. *Tec et Doc. Lavoisier.* Paris.

**SCOTT A. (1973).** Rennet and substitute. *Process bioch.* Vol : 12.P 10-14.

**SHINDO K., ARIMA S. (1979).** Studies on chymosin. I. Chromatographic purification and some properties of chymosin. *Agr Biol Chem* 28: A177–A180.

**SHMIDT D.G. (1982).** Association of caseins and casein micelle structure. In developments of Dairy chemistry- 1. Proteins. Applied science publishers, London and New York.

**SIBOUKEUR O., MATI A., et HASSAN B. (2005).** Amelioration de l'aptitude a la coagulation du lait cameline (*camelus dromadarius*). Utilisation d'extrait enzymatique coagulants gastriques de dromadaire. Cahiers d'études et de recherches francophone/ Agriculture N°05. Vol473.

**SIDIKOU I.D. REMY B. HORNICK J.L. LOSSON B. DUQUESNOY N. YENIKOYE A. et BECKERS J.F. (2005).** Le pepsinogène et la prochymosine des bovins: connaissances actuelles, applications et perspectives dans la stratégie de lutte contre les verminoses gastrointestinales. Ann. Méd. Rét, 149, 213-228.

**SMITH JL., BILLINGS GE., YADA RY. (1991a).** Chemical modification of amino groups in *Mucor miehei* aspartic proteinases, porcine pepsin, and chymosin. I. Structure and function. Agric Biol Chem 55: 2009–2016.

**SMITH JL., BILLINGS GE., YADA RY. (1991b).** Chemical modification of amino groups in *Mucor miehei* aspartic proteinases, porcine pepsin, and chymosin. II. Conformation stability. Agric Biol Chem 55: 2017–2024.

**SUZUKI M., NARITA Y., ODA S., MORIYAMA A. and TAKENAKA O. (1999).** Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins. Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol., 122, 453- 460.

**SOUSA M.J et Malcata F.X. (1997).** comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical and proteolysis characteristics of ovine cheese *j.agri.food.chem.*,45, 74-81.

**SUGRUE R., MARSTON FA., LOWE PA., FREEDMAN RB. (1990).** Denaturation studies on natural and recombinant bovine prochymosin (prorennin). Biochem J 271: 541–547.

**TANG G., JAMES MNG., HSU IH., JENKINS JA., BLUNDELL. (1978).** Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteinases. Nature 271: 618–621.

**TEUBER M. (1990).** Production of chymosin by microorganisms and its use for cheesemaking. Bull. IDF, 251, 3-15.

**TSUCHIYA K., GOMI K., KITAMOTO K., KUMAGAI C., TAMURA G. (1993).** Secretion of calf chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Appl. Microbiol. Biot., 40, 327-332.

**UCHIYAMA H., UOZUMI T., BEPPU T., ARIMA K. (1980).** Purification of prorennin mRNA and its translation in vitro. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1373-1381.

**UUSITALO J.M., NEVALAINEN K.M.H., HARKKI A.M., KNOWLES J.K.C., PENTTILA M.E. (1991).** Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. *J. Biotechnol.*, 17, 35-50.

**VALLEJO JA., AGEITOS JM., POZA M., VILLA TG. (2008).** Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem* 56: 10606–10610.

**VALLEJO JA., AGEITOS JM., POZA M., VILLA TG. (2012).** A comparative analysis of recombinant chymosins *J. Dairy Sci.*, 95, 609- 613.

**VAN DEN BRINK HJ., PETERSEN SG., RAHBK-NIELSEN H., HELLMUTH K., HARBOE M. (2006).** Increased production of chymosin by glycosylation. *J Biotechnol* 125: 304–310.

**VAN DEN BERG J.A., VAN DER LAKEN K.J., VAN Ooyen A.J.J., RENNIERS T.C.H.M., RIETVELD K., SCHAAP A., BRAKE A.J., BISHOP R.J., SCHULTZ K., MOYER D., RICHMAN M., SHUSTER J.F. (1990).** *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Bio-Technol.*, 8, 135-139.

**VEGA-HERNANDEZ MC, GOMEZ-COELLO A, VILLAR J, CLAVERIE-MARTIN F. (2004).** Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. *J Biotechnol* 114: 69–79.

**WALSTRA P., BLOOMFIELD V. A., WEL G. J., and JENNESS R. (1981).** Effect of chymosin action on the hydrodynamique diameter of casein micelles. *Biochimia and Biophysica Acta*, 669, 258- 259.

**WANGO H J., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998 b).** Composition of milk from 3 camel (*Camelus dromedarius*) breeds in Kenya during lactation. *Milchwissenschaft*, 53(3), 136-139.

**YAMAMOTO A. (1975).** Proteolytic enzymes *in* Enzymes in food processing 2nd Edition, Reed G. Academic press.

**ZHANG L., JIANG Y., ZHANG J., YANG Z. (2009).** Recombinant expression of bovine chymosin in *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 25: 1160–1165.

# *Annexes*

## Annexe 01 : Expression de la chymosine de différentes espèces animales dans différents hôtes microbiens.

Espèce originale	Forme de chymosine	plasmide	promoteurs	hôtes	Références
dromadaire	Prochymosine	pGAMpR	glaA	<i>Aspergillus niger</i>	KAPPELER <i>et al</i> , 2006
bovin		pKM636, 1361, 6361	SpeA	<i>Proteus mirabilis</i>	KLESSEN <i>et al</i> , 1989
		pSM316	protéase Neutre	<i>Bacillus subtilis</i>	PARENTE <i>et al</i> , 1991
chèvre		pPICZaA	-	<i>Pichiapastoris</i>	ZHANG <i>et al</i> , 2009
		pQFlag1	ADH2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,	VEGAHERNANDEZ <i>et al</i> , 2004
		pQSec1	pGK	<i>Kluyveromyces lactis</i>	VEGAHERNANDEZ <i>et al</i> , 2004
veau		pCR301	LacUV5	<i>Escherichia coli</i>	NISHIMORI <i>et al</i> , 1982
veau	Chymosine	pGK2231	Trp- $\beta$ , glyA gène tryptophane & serine hydroxyméthyl transférase		GENEX, 1985
		-	glaA	<i>Aspergillus oryzae</i>	TSUCHIYA <i>et al</i> , 1993
bovin		-	pdA&pepB	<i>Aspergillus awamori</i>	CARDOZA <i>et al</i> , 2003

(PGK) : phosphoglycérate kinase ; (gal 1 et gal 10) : la galactosidase ; (tpi) : triosephosphate isomérase ; (LAC4) : gène lactase K. lactis ; XPR2 : le promoteur protéase alcaline ; (glaA) glucoamylase d'A. Niger ; PCR : Polymerase Chain Reaction.

## Annexe 02 : Détermination de la teneur en vitamine C par la méthode utilisant le DCPIP

### 1. Réactifs

Solution de 2-6- dichlorophenol indophénol à 0,5 g/l, préparée de la manière suivante:

- Sel de sodium du DCPIP.....0,5 g
- Bicarbonate de sodium .....0,2 g
- Eau distillée chaude.....300 ml
- Laisser refroidir et ajuster à 1000 ml avec de l'eau distillée froide, puis filtrer.
  - Solution d'acide ascorbique à 0,2 g/l
  - Acide acétique glacial (99 à 100%)

### 2. Protocole expérimental

#### Préparation des solutions

Dans un bécher de 10 ml, introduire :

- 1 ml de solution à doser ;

- Ajouter 200 µl d'acide acétique glacial, mélanger ;
- Verser goutte à goutte la solution du DCPIP à l'aide d'une burette, jusqu'à apparition d'une coloration rose pâle persistante ;
- Lire le volume sur la burette (chute de burette).

### 3. Etalonnage de la solution d'acide ascorbique

L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une solution étalon de concentration  $C_1 = 0,2$  g/l. elle correspond à une chute de burette  $V_1$  (ml).

### 4. Expression des résultats

La teneur en vitamine C en mg/l, est donnée par la relation suivante :

$$C_2 = (C_1 \times V_1 / V_2) \times 10^3$$

Où :  $C_1$ : concentration en acide ascorbique de la solution étalon

$C_2$ : concentration en vitamine C dans le jus

$V_1$ : chute de burette mesurée dans le cas de la solution étalon

$V_2$ : chute de burette dans le cas de jus.

## Annexe 03 : détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse

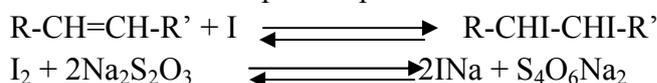
### 1. Indice d'acide

#### Protocole expérimental

- Peser 2,5g de matière grasse (huile d'olive et huile de soja dans des béchers différents) puis on les dissout dans 5ml d'éthanol ;
- Titrer immédiatement avec la potasse alcoolique (0,1N), en présence de 3 gouttes de phénolphthaléine jusqu'à l'apparition d'une coloration rose-pâle persistante.

### 3. Indice d'iode

La réaction est exprimée par :



#### Protocole expérimental

- Préparer deux tubes, un tube témoin qui contient du lugol seul et un autre contenant un échantillon d'huile et du lugol ;
- Titrer avec une solution de thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,02N), et déterminer les volumes de thiosulfate nécessaires pour le titrage des deux tubes :
- **Préparation du tube témoin :** introduire dans un tube à essai 5ml de lugol et quelques gouttes d'amidon (le mélange est bleu). Déterminer le volume  $V_1$  de thiosulfate de sodium nécessaire pour neutraliser l'iode contenu dans le tube témoin.

**Préparation du tube échantillon :** introduire dans un tube à essai 5ml de lugol, 0,5ml d'huile puis chauffer pendant 5min (bien homogénéiser le long du chauffage) ; après refroidissement, ajouter quelques gouttes d'empois d'amidon (mélange bleu) puis verser le thiosulfate goutte à goutte en agitant, jusqu'à décoloration. Déterminer le volume  $V_2$  nécessaire pour neutraliser l'iode contenu dans l'échantillon.

### 3. Expression des résultats

#### 3.1. Détermination d'indice d'acide

Il est calculé selon la formule suivante :

$$I_a = 5,61 \times V_{\text{KOH}} / M_1 \quad \text{avec } V_{\text{KOH}} = 0,5\text{ml}$$

5,61 : nombre de gramme équivalent à 1ml de pottasse à 0,1N =  $n_{\text{KOH}} \times M_{\text{KOH}} = 5,61$

M1 : masse en gramme de la matière grasse.

### 3.2. Détermination d'indice d'iode

Il est calculé par la formule suivante :

$$I_i = (V_1 - V_2) \times 1,269 / M_e$$

$V_1$  = Volume de thiosulfate de sodium (ml) pour doser le tube témoin

$V_2$  = Volume de thiosulfate de sodium (ml) pour doser le tube échantillon

1,269 = nombre de gramme d'iode correspond à 1 ml de thiosulfate de sodium 0,1N dans 100g de corps gras.

$M_e$  = Masse de l'échantillon (g)

### 3.3. Détermination de nombre d'instauration

$$n(=) = I_i \times M_e / M_{I_2} \times 100 \quad M_{I_2} = 254 \text{ g/mole.}$$

## Annexe 04: Dosage des glucides, méthode utilisant l'acide DNS

### 1. Protocole expérimental

- Réaliser une courbe d'étalonnage avec une solution de glucose à 1g/l ;
- Préparer les dilutions nécessaires pour les échantillons inconnus ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ...).
- La gamme étalon est préparée comme suit dans le tableau IX.

**Tableau IX: Gamme étalon pour le dosage des glucides avec une solution de glucose à 1g /l.**

Numéro du tube	01	02	03	04	05	06
Solution de Glu (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
DNS (ml)	2	2	2	2	2	2

- Préparation des différentes dilutions de l'échantillon ;
- Mettre 1ml de la solution à doser (ou des différentes dilutions) dans un tube à essai ;
- Ajouter 2ml de réactif (DNS) ;
- Chauffer au bain- marie bouillant pendant 5 mn ;
- Refroidir par écoulement d'eau sous le robinet ;
- Ajouter 7ml d'eau distillée et homogénéiser ;
- Laisser reposer 15 mn à température ambiante ;
- Faire la lecture à 530nm contre le blanc.

La densité optique (DO) obtenues lors du dosage des sucres par la méthode utilisant le DNS est présentée dans le tableau X.

**Tableau X : Densité optique (DO) obtenue par spectrophotométrie ( $\lambda= 530\text{nm}$ ) pour la gamme étalon et pour la solution d'échantillon (jus Rouiba).**

N° de tube	01	02	03	04	05	06	07 (jus d'orange en boîte)
Densité optique (DO)	0	0,061	0,168	0,337	0,452	0,555	0,567

### 1. Expression des résultats

Après la projection de la DO de la solution échantillon sur le graphe de la gamme étalon, on obtient la teneur en sucre dans le jus Rouïba qui est comme suit :

$$\begin{cases}
 Y = 0,855 X \\
 DO = \epsilon L C \longrightarrow 0,576 = 0,855 C \longrightarrow C = 0,673 \\
 C_{\text{Jus Rouïba}} = 0,673 \times 10^2 = 67,3\text{g/L.}
 \end{cases}$$

### Annexe 05 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951)

Echantillon utilisé : lait de vache et le jus light

#### 1. Solutions :

##### Solutions alcalines A

- Soude 0.1 N.....500 ml
- Carbonate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).....10 g

##### Solution cuivrique B

- $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$  (0.32 g/ 100ml).....2 ml
- Tartrate double de Na et de K (1 g/100ml).....2 ml

##### Solution C

- Solution A .....50 ml
- Solution B.....1 ml

##### Solution mère de BSA

- BSA.....10 mg
- Eau distillée .....100 ml

#### Gamme étalon

A partir de la solution de BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous

**Tableau XI : Gamme étalon pour le dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al (1951) avec la protéine étalon (la BSA):**

N° de tube	01	02	03	04	05
Concentration en BSA $\mu\text{g/ml}$	0	30	50	80	100
Solution mère de BSA ( $\mu\text{l}$ )	0	150	250	400	500
Eau distillée ( $\mu\text{l}$ )	500	350	250	100	0

**1. Méthode :**

- 0,5 ml d'échantillon contenant 100  $\mu\text{g}$  de protéine maximum et 25  $\mu\text{g}$  minimum
- ajouter 2,5 ml de solution C et mélanger ;
- laisser 5 à 10 mn à température ambiante ;
- ajouter 250  $\mu\text{l}$  de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- Homogénéiser rapidement et laisser 30mn à l'obscurité ;
- lire la DO à 750 nm.

**2. Expression des résultats :**

Une courbe étalon est tracé en portant sur l'axe des abscisses, les concentrations en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparée et sur l'axe des ordonnées, les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration de la protéine inconnue X est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

La densité optique obtenue lors du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951) est présentée dans le tableau XII.

**Tableau XII : Densité optique (DO) obtenue par spectrophotométrie ( $\lambda = 750\text{nm}$ ) pour la gamme étalon et pour la solution d'échantillon (lactosérum de lait de vache).**

N° de tube	01	02	03	04	05	07(lactosérum)
Densité optique (DO)	0	0,024	0,052	0,086	0,095	0,3506

**1. Expression des résultats**

Après la projection de la DO de la solution échantillon sur le graphe de la gamme étalon, on obtient la teneur en protéines qui est comme suit :

$$\left\{ \begin{array}{l} Y=0,001 X \\ DO = \epsilon L C \longrightarrow 0,3506 = 0,001C \longrightarrow C = 350,6 \\ C_{\text{protéines de Lactosérum}} = 350,6 \times 10^2 = 35060 \mu\text{g/ml} = 35,06 \text{ g/l.} \end{array} \right.$$

**Annexe 5: Chromatographie de permeation sur gel de SEPHACRYL S200**

Echantillon utilisé : protéines sériques de lait de vache

## 1. Protocole expérimental

- Echantillon 1 : lactosérum liquide de lait de vache de concentration 6,13g/l
- Echantillon 2 : protéines sériques lyophilisées de lait de brebis.
- On a injecté chaque échantillon délicatement sur la paroi de la colonne à un débit constant ;
- Noter les DO enregistrées par le détecteur pour tracer le chromatogramme ;
- Les fractions contenant les protéines obtenues sont sélectionnées par le graphe et récoltées ; V mort = 17 ml.

## Annexe 06 : Hydrolyse enzymatique des caséines de lait de vache et des protéines totale de l'œuf par la papaïne.

### 1. Préparation du tampon d'échantillon pour la PAGE-SDS

- Solution C.....1ml
- Eau distillée.....500µl
- SDS (10%).....500µl
- Mercaptoéthanol.....100µl
- Solution de glycérol 50%.....400 µl

Quelques graines de bleu de bromophénol

Prendre cinq tubes à essai en verre étiquetés comme suit : 0, 15, 30, 60 et 120min, versé dans chaque tube 200µl du tampon d'échantillon. On a pris un autre tube et dissoudre 10mg de caséines de lait de vache dans 1ml de tampon Tris-Hcl (tube mère). On a prélevé 200 µl de contenu de tube mère et les mettre dans le tube 0min sans ajouter la solution enzymatique et puis ajouté 25 µl de la solution enzymatique au tube mère. Puis l'incuber à 40°C. Après 15min, on a prélevé immédiatement 200µl dans le tube 15min. Pour arrêter la réaction enzymatique, on a incubé une deuxième fois à 100°C pendant 5min. Refaire la même chose pour les tubes 30, 60 et 120min. Après l'incubation, Les hydrolysats récoltés vont subir une PAGE-SDS.

## Annexe 07 : Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)

### Solution d'acrylamide A :

- Acrylamide.....36 g
- Bisacrylamide.....1 g

### Tampon du gel B :

- Tris.....9.14 g
- Eau distillé.....100 ml
- Ajuster le PH à 8,9 avec HCL 4N

### Tampon d'électrode :

- Tris.....0.12 g
- Glycine.....0.58 g
- Eau distillé.....250 ml

Ajuster le pH à 8,3 avec du Tris

**Tampon d'échantillon :**

Tampon du gel (B).....100 µl  
Eau distillée .....700 µl  
Glycérol 50%.....200 µl

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 1 ml de ce tampon

**Electrophorèse**

**Préparation du gel : T = 12% et C = 2.7% (pour une plaque)**

Solution (A) .....3.25 ml  
Solution (B) .....5 ml  
Eau distillée ..... 1.68 ml  
Dégazer le mélange (maximum 2 mn)  
TEMED.....10 µl  
Solution de persulfate d'ammonium 10%.....75 µl

Couler et mettre le peigne immédiatement

**Dépôt d'échantillon :** 10 à 20 µl

**Mise sous tension :** 20 mA, 25 V

**Fixation :** 45mn dans la solution de fixation

**Coloration :** 1 heure dans la solution de coloration

**Décoloration :** dans la solution de décoloration

**Annexe 08 : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)**

**Solution :**

**Solution d'acrylamide (A)**

Acrylamide.....36 g  
Bisacrylamide.....1 g

**Tampon de gel de séparation**

Tris.....18.15 g  
Eau distillé.....100 ml

Ajuster à pH 8.8 avec de HCl 4N

**Tampon de gel de concentration**

Tris.....6 g  
Eau distillé.....100 ml

Ajuster à pH 6.8 avec de HCl 4N

#### **Tampon d'électrode**

Tris.....	1.2 g
Glycine.....	5.76 g
SDS.....	0.2 g
Eau distillée.....	200 ml

Ajuster à pH 8.3 avec du Tris

#### **Tampon d'échantillon**

Solution (C).....	500 µl
Eau distillé.....	250 µl
SDS (10%).....	250 µl
2-mercaptoéthanol.....	50 µl

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon

Chauffage à 100°C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide

Ajouter 200 µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques graines de bleu de bromophénol

#### **Solution de fixation**

TCA.....	12 g
Eau distillée (qsp).....	100 ml

#### **Solution de coloration**

Bleu de Coomassie R250.....	0.5 g
TCA.....	4 g
Méthanol.....	100 ml
Eau distillé.....	100 ml

#### **Solution de décoloration**

Acide acétique.....	37.5 ml
Eau distillée.....	312.5 ml
Méthanol.....	150 ml

#### **Solution de persulfate d'ammonium**

Persulfate d'ammonium.....	0.1 g
Eau distillée (qsp).....	1 ml

## Electrophorèse

### Préparation du gel de séparation : T = 17 % et C = 207 % (pour une plaque)

Solution (A).....	4.60 ml
Solution (S).....	2.51 ml
Eau distillée.....	2.73 ml
Dégazer pendant 2 mn maximum	
SDS 10%.....	100 µl
TEMED.....	13 µl
Persulfate d'ammonium 10%.....	75 µl

Couler à environ 1.5 cm du sommet de la plaque de moindre

### Préparation du gel de concentration : T= 4.8 % et C = 2.7 % (pour une plaque)

Solution (A).....	1.3 ml
Solution (C).....	2.5 ml
Eau distillées.....	5.8 ml
Dégazer quelques secondes	
Solution de SDS à 10%.....	100 µl
TEMED.....	20 µl
Persulfate d'ammonium à 10%.....	10 µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne

**Dépôt d'échantillon** : 10 à 20 µl

**Mise sous tension** : 20 mA, 25 V

**Fixation** : 45 minutes dans la solution de fixation

**Coloration** : 1 heure dans la solution de coloration

**Décoloration** : dans la solution de décoloration