

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE D'EL -HARRACH

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة - الحراش - الجزائر

PROJET DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

THEME :

**La pepsine bovine comme coagulant du lait :
extraction et caractérisation**

Présenté par : Mr. AOUADI. Djamel

Soutenu le : 20 / 07/2010

Le jury :

Présidente : Mme. CHORFI. N

Maître assistante classe A à ENSV

Promotrice : Mlle. MOUZALIL

Maître assistante classe A à ENSV

Examineur 1 : Mr. ZOUAMBI.B

Maître assistant classe A à ENSV

Examinatrice2 :Mr. OTHMANI

Maître assistant classe A à ENSV

Année universitaire : 2009/2010



Remerciements



Je tiens à remercier :

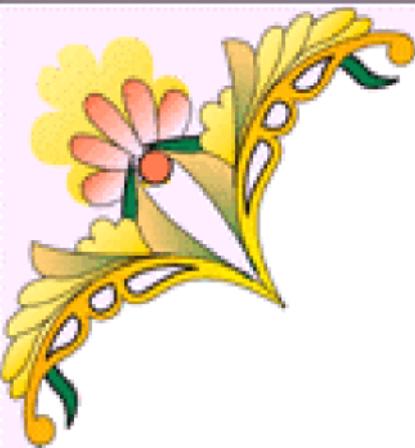
M^{lle} MOUZALI, Maître assistante classe A à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, promotrice, qui m'a constamment encouragé et conseillé pour la réalisation de ce travail.

Mme. CHORFI. N, Maître assistante classe A à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger d'avoir bien voulu accepter de présider le jury.

Mr ZOUMBI, Maître assistant classe A à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger pour avoir bien voulu examiner mon travail et de m'avoir d'autre part l'autorisation de manipuler au laboratoire de la biochimie.

Mr, OTHMANI.A, Maître assistante classe A à l'Ecole Nationale Supérieur Vétérinaire pour avoir bien voulu examiner mon travail.





Je tiens à remercier Mr. SAADI AHMED technicien supérieur de laboratoire de la parasitologie pour toutes ses aides.

Je tiens à remercier également Mlle KERMEZLI MIMI technicien supérieur de laboratoire





DEDICACE



Au nom de Dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce du quel j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :

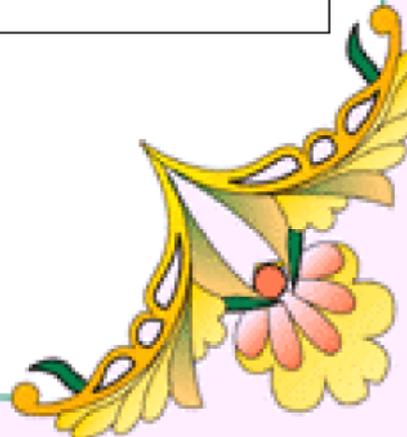
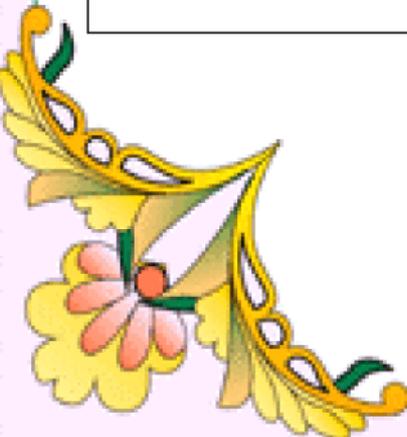
A mes parents, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir permis de réaliser ces longues études pour exercer le métier que j'avais choisi. Je ne vous le dirai jamais assez : merci pour tout...

A ma très chère grand-mère.

*A tout mes frères et mes sœurs SALIM, SIHEM,
MALIKA et TAYEB.*

*A mes oncles surtout TAHAR, YAZID, LEHCEN
mes tantes et leurs familles*

*A tous mes proches et à tous mes amis surtout :
ABDELLAH, LAIDE, MOHAMMED, YAMINE,
SALAH et FODHIL.*



LISTE DES ABREVIATIONS

AC : activité coagulante

CMP: Caséinomacropéptide

Da : Dalton

DO : Densité Optique

E.P :*Endothia parasitica*

F : Force

G : gramme

H : heure

M : molarité

M.m : *Mucor miehei*

M.p : *Mucor pusillus*

Met : méthionine

OAA : organisation pour alimentation et agriculture

PH : potentiel hydrogène

Phe : phényle-alanine

PM : poids moléculaire

PU : poids unitaire

Rt : Rendement

TCA : Acide trichloracétique

UP : Unité Présure

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : phases de la coagulation enzymatique du lait et formation du réseau. (Adapté de Alais., 1984 ; Mietton., 1995).....	8
Figure 2 : protocole de l'extraction de la pepsine bovine des caillettes issues des bovins adultes.....	13
Figure 3:photo des extraits clarifiés selon la méthode de VALLE et FURET 1977.....	14
Figure 4: méthode de BERRIDGE de mesure du temps de prise (COLLIN et al;1977).....	16
Figure 5 : dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al., 1951).....	17
Figure 6 : mode opératoire de l'activité protéolytique.....	18
Figure 7 : profils protéolytique d'extraits concentrés de pepsine de bovin adulte aux différentes concentrations choisies.....	21

LISTE DES TABLEAUX:

Tableau 1: caractéristiques physico-chimique de la chymosine et de la pepsine bovine.....	2
Tableau 2 : Composition générale du lait de vache (Michel Mahaut et al., 2000).....	5
Tableau 3 : activité coagulante obtenue après macération des caillettes.....	19
Tableau 4 : la concentration en protéines totales des extraits clarifiés.....	20

SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I-1- Présure et succédanées de la présure.....	1
I- 1-1-La présure	1
La chymosine	1
La pepsine	1
Pepsine A.....	1
Pepsine B.....	2
Pepsine C	2
I-1-2 Succédanées de la présure	3
I- 2- 1 Succédanées d'origine végétale.....	3
I-2-2 Succédanées d'origine animale	3
I-2-3 Succédanées d'origine microbienne.....	4
I-2- Le lait.....	5
Composition du lait.....	5
I-3- La coagulation du lait :.....	6
I-3-1 La coagulation acide	6
I-3-2 La coagulation par voie enzymatique	7
I-3-2-1 Phase d'hydrolyse enzymatique.....	7
I-3-2-2 Phase d'agrégation.....	7
I-3-2-3 Phase de formation du gel.....	7

I-3-3 La coagulation mixte	8
I-4 Les facteurs de la coagulation enzymatique	8
I-4-1 Effet de la nature de l'enzyme et de sa concentration	8
I-4-2 Effet de la température.....	9
I-4-3 Effet du PH du lait	9
I-4-4 Effet de la composition du lait.....	9
I-4-5 Teneur en caséines.....	9
I-4-6 Dimension des micelles.....	9
I-4-7 Taux de calcium et phosphate de calcium colloïdal.....	9

CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

II-1 : Matériel.....	12
II-2 : Méthodologie.....	12
II-2.1 : échantillonnage d'étude.....	12
II-2.2 Extraction	12
II-2- 2-1 Macération	12
II-2-2-2 Clarification	12
II-2-2-3 Concentration des extraits clarifié	13
II-2-3 Détermination de l'activité coagulante	15
II-2-4 Mesure du temps de coagulation.....	15
II-2-5 Détermination de la concentration de l'extrait concentré.....	16
II-2-6 Suivie de l'activité protéolytique	18
III-RESULTAS ET DISCUSSION.....	19
III-1 Etude de l'activité coagulante des extraits des caillettes.....	19

III-2 Détermination de la concentration en protéines de l'extrait clarifié.....20

III-3 Suivi de l'activité protéolytique des extraits concentrés de pepsine de bovin adulte...21

CONCLUSION

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

En industrie fromagère, la coagulation du lait est une étape essentielle dans laquelle l'utilisation d'un enzyme protéolytique est indispensable ; la présure obtenue à partir de la caillette de veau nourri au lait, dont l'usage est le plus ancien reste l'agent coagulant le plus souvent mis en œuvre est le mieux adapté à la transformation du lait en fromage (LENOIR et *al.*, 1985).

Cependant depuis un certain nombre d'années, on assiste à une pénurie mondiale croissante de la présure animale destinée à l'industrie fromagère. Une pénurie consécutive à une production limitée en cet enzyme, du fait d'une réduction de l'abattage des jeunes veaux.

Pour cela de nombreuses recherches ont été développées depuis quelques années, à fin de sélectionner des succédanés des présure d'origine diverses : animale, microbienne ou végétale, utilisable industriellement (SCRIBAU, 1993). Aujourd'hui, les plus utilisés sont de loin les protéases d'origine animale (mélange chymosine et pepsine) et les protéases d'origine microbienne (DE ROISSAIT et *al.* 1994).

Actuellement, l'Algérie dispose d'un potentiel de coproduits d'abattage très variés en plus de la carcasse. Un ensemble de coproduits dont une grande partie serait utilisée directement en alimentation humaine. Néanmoins, aucune voie de valorisation en vue de leur meilleure exploitation n'a été envisagée à ce jour.

L'objectif de ce travail est justement d'étudier un agent coagulant du lait extrait à partir des caillettes de bovins adultes : la pepsine bovine. Sa caractérisation permettra ainsi sa mise en valeur, et mettra en évidence l'intérêt qui devra être porté à cette catégorie de protéases acide, par leur utilisation dans le processus de fabrication fromagère, en particulier.

Pour tendre, vers cet objectif, nous avons d'abord procédé à :

- extraction de la pepsine bovine, à partir de caillette de bovin adulte
- caractérisation de ces propriétés coagulantes
- Etude de son activité protéolytique en comparaison à une enzyme commerciale d'origine animale comme enzyme de références.

CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I-1 présure et succédanées de présure

I-1-1. La présure (fiche technique annexe n°1)

La présure est un extrait liquide ou pâteux provenant de la macération des caillottes des jeunes ruminants nourris exclusivement au lait dans une saumure à 10% de NaCl (MICHEL Mahaut et al, 2003). Son poids moléculaire est environ 35000 daltons (GRIPON, 1985).

La présure contient en fait un mélange de chymosine et de pepsine, deux protéases qui se distinguent notamment par leur pH optimal d'action (pH 2 pour la pepsine, pH 4,5 pour la chymosine) au pH du lait (6,2-6,6) la chymosine représente plus de 80% de l'activité coagulante. (CERNING et *al.*, 1984). Ou autrement le rapport chymosine active/pepsine active doit être supérieur à 1,38(V. LARRETA, 1997).

-La chymosine (E.C.3.4.23.4) est une protéase acide, sécrétée sous forme de pro-enzyme inactive appelée prochymosine. L'activation de prochymosine en chymosine se fait spontanément dans la caillotte aux pH inférieure à 5,0 par hydrolyse ménagée de l'extrémité NH₂ terminale de la molécule. Sa masse moléculaire est de 30 700 g/mol. Sa stabilité est maximale entre les pH 5,0 et 6,0, avec un pH optimal d'activité proche de 5,5 et une température ambiante (20-35°C), et inhibée à 65°C. En conséquence, il est conseillé de la stocker entre 0 et 5°C (Michel Mahaut et *al.*, 2003).

-La pepsine (E.C.3.4.23.1, 2,3) c'est l'extrait liquide provenant de la caillotte du ruminant adulte présentant un rapport : masse de chymosine active /masse de pepsine active < 0 1,54(V. LARRETA garde, 1997). C'est une enzyme thermosensible en solution après 55°C. Elle est dénaturée à des températures supérieures à 70°C (GRAINDY, 1978). La pepsine proprement dite comprend trois fractions A, B et C. Elle contient 5 à 7 groupes basiques et 35 à 38 groupes carboxyliques libres (REED, 1966).

- **Pepsine A** (E.C.3.4.23.1) (ou pepsine bovine) :

La pepsine bovine est produite par le suc gastrique à l'état de pepsinogène inactif (de PM = 42000 Da). Il est converti en système actif par l'acidité gastrique qui détache des oligopeptides dont un poids moléculaire de 3000 Da, responsable de l'inhibition de la fraction active du pepsinogène (Adrian et *al.*, 1980).

Par ailleurs, dès qu'une petite quantité de pepsine apparaît, elle transforme le zymogène, par un processus catalytique qui peut compléter le précédent (pepsinogène-pepsine) (PRCHERON *et al.*, 1991).

La pepsine bovine hydrolyse des liaisons peptidiques de préférence au niveau de la phénylalanine et de la leucine (Linden et Humbert, 1991). Elle a un poids moléculaire de 33370 Da et comporte 313 acides aminés (GRAINDY, 1978).

Son action protéolytique est voisine de celle de la chymosine, mais les conditions d'action sont différentes. Ces deux enzymes n'ont pas les mêmes aptitudes d'action en fonction du pH. En milieu acide, la pepsine bovine a une plus grande activité protéolytique. Par contre à PH 6,8, la chymosine a une vitesse de protéolyse supérieure (GOURSAUD, 1992).

Les principales caractéristiques de la chymosine et de la pepsine bovine sont présentés par le Tableau 1

Tableau 1: caractéristiques physico-chimique de la chymosine et de la pepsine bovine.

caractéristiques	Chymosine	pepsine
Poids moléculaire (Da)	30700 ⁽¹⁾	33370 ⁽¹⁾
Nombres d'acides aminés	273 ⁽¹⁾	313 ⁽¹⁾
pH _i	4,6 ⁽¹⁾	< 1,0 ⁽¹⁾
pH optimal	5,5 ⁽¹⁾⁽³⁾	1,8 ⁽¹⁾
pH maximal de stabilité	5,3-6,3 ⁽¹⁾⁽²⁾	--
pH maximal d'activation	<5,3 ⁽¹⁾	2,0-2,5 ⁽²⁾
pH d'inactivation	7,5 ⁽²⁾	7,85 ⁽²⁾
Température optimale (°C)	42 ⁽³⁾	--
Température d'inactivation (°C)	61 ⁽²⁾	--

(1) : Graindy ,1978

(2) : Goursaud, 1992

(3) : Ramet, 1987

- **Pepsine B** (E.C.3.4.23.2) (ou pepsine porcine) : elle a une spécificité plus restreinte que la pepsine A et dégrade faiblement l'hémoglobine (LINDEN et HUMBERT, 1991).
- **Pepsine C** (E.C.3.4.23.3) (ou gastricine) à une spécificité plus restreinte que la pepsine A et une forte activité vis-à-vis de l'hémoglobine (LINDEN et HUMBERT, 1991).

I-1- 2-Succédanées de présure

I-1-2-1 Succédanées d'origine végétale

On connaît de très nombreuses préparations coagulantes provenant du règne végétal; elles sont extraites par macération de divers organes de plantes supérieures, on peut citer le gaillet, l'artichaut, le chardon qui ont été et (ou) sont encore utilisés dans des fabrications de fromages fermiers, en particulier dans l'ouest du bassin Méditerranéen (Espagne) (IVAN LARCHER, 2002).

D'autres extraits coagulants ont été obtenus à partir de plantes tropicales : les plus connus sont les ficines: extraites du latex du figuier, la papaïne, extraite des feuilles du papayer, la bromélaïne, extraite de l'ananas. D'une façon générale, ces diverses préparations végétales ont donné des résultats assez décevants en fromagerie car elles possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée, qui se traduit par l'apparition des inconvénients technologiques majeurs (IVAN LARCHER, 2002).

L'activité coagulante de ces préparations coagulantes est d'autre part très variable car elle est fortement influencée par l'état de maturité de la plante et les conditions de leur collecte et de leur stockage. De ce fait, l'emploi de ces protéases coagulantes est toujours resté limité aux aires locales de production (IVAN LARCHER, 2002).

I-1-2-2 Succédanées d'origine animale

Plusieurs protéases d'origine animale ont fait l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en industrie fromagère.

La trypsine et la chymotrypsine entraînent des modifications profondes des modalités de fabrication et de la qualité des produits finis consécutives à la forte activité protéolytique. Ces enzymes ne sont pas utilisées au plan industriel. Seules les pepsines porcines et bovines présentent un intérêt industriel (BRULE et *al.*, 2003).

L'utilisation de pepsine porcine a débuté pendant la seconde guerre mondiale, mais ne s'est développée réellement que depuis 1960. C'est une protéase à caractère plus acide que la chymosine, son activité est meilleure en milieu acide, mais décroît fortement au-dessus du pH 6,3 ; au pH du lait frais, la coagulation n'apparaît pas mélangée à la, la pepsine porcine apparaît être d'une utilisation plus large, notamment dans les pays anglo-saxons pour la fabrication de fromages acides.

La pepsine bovine est l'un des constituants mineurs normaux de la présure, mais dont la sécrétion devient prépondérante après sevrage. Elle apparaît très voisine de la présure et son activité est moins dépendante du pH que celle de la pepsine porcine.

D'autre part la pepsine du poulet a été également expérimentée avec succès en Israël pour la fabrication de fromages locaux (IVAN LARCHER, 2002).

Des extraits de pepsine, obtenus à partir d'estomac d'autres animaux, ont fait l'objet de plusieurs recherches : citons l'exemple d'une pepsine extraite de la paroi interne de l'estomac de la morue d'atlantique qui a des aptitudes coagulantes du lait à 15°C meilleur que la chymosine de veau (BREWER et *al.*, 1984 cité par SCRIBAU, 1993).

Certains succédanés d'origine animale peuvent donc être considérés comme des produits de remplacement acceptables de la présure de veau ; il convient toutefois de remarquer que, comme pour l'élaboration de la présure, leur disponibilité reste tributaire du marché de la viande (Ivan Larcher, 2002).

I-1-2-3 Succédanées d'origine microbienne

Depuis une trentaine d'années, une puissante industrie de transformation s'est développée dans le monde ; elle produit des substances variées, dont une grande quantité d'enzymes qui trouvent de nombreuses applications dans des secteurs industriels variés, et en particulier des protéases susceptibles de coaguler le lait.

Des protéases d'origine bactérienne provenant de cultures en fermenteurs de Bacilles et de Pseudomonas ont donné en général des résultats décevants en raison de leur activité protéolytique généralement très élevée : aussi l'utilisation de ces enzymes bactériennes n'a pas dépassé le stade expérimental; aucune préparation n'est commercialisée.

Les enzymes d'origine fongique, au contraire, ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure (Pa) ; plusieurs préparations sont déjà commercialisées sur le marché international et utilisées à plus ou moins grande échelle selon les pays, ces préparations proviennent de trois genres de moisissures : *Endothia parasitica* (E.p.), *Mucor pusillus* (M.p.), *Mucor miehei* (M.m.).

I-2 lait

Le terme « lait » employé sans autres précisions, désigne exclusivement le lait de vache. Sa définition légale est la suivante : « produit intégral de la traite totale et interrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée ; il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (Congrès de la Répression des Fraudes, Genève, 1908) (LUQUET, 1985).

-Composition du lait

Le lait présente une grande variabilité dans sa composition selon l'espèce animale, la race, l'individu, le stade de lactation, etc. (Mietton et al., 1994).

Les constituants majeurs du lait de vache sont présentés au Tableau 2. De ceux-ci, les protéines présentent un intérêt tout particulier car ce sont les responsables majeures des propriétés technologiques du lait. Les protéines représentent 95 % de la matière azotée du lait et peuvent être départagées en deux groupes : les caséines et les protéines du lactosérum. L'azote non protéique est composé de substances diverses telles que l'urée, l'ammoniac, l'acide urique, des acides aminés libres, des peptides, etc. (Filon., 2006).

Tableau2 : Composition générale du lait de vache (Michel Mahaut et al., 2000).

Constituants plastiques (g/kg)		
Eau		870-875
Matières sèches		125-130
	Caséines	26
Matières azotées (33-36 g/kg)	protéines solubles	5-6
	Azote non protéique	1,5-2
Matière grasse		35-45
Extrait sec dégraissé		85-90
Matières salines		
Lactose		
Biocatalyseurs (traces)		
Pigments, enzymes, vitamines, micro-organismes		
Gaz dissous		
Gaz carbonique-oxygène-azote (4 à 5% du volume de lait à la sortie de la mammelle)		

Les caséines représentent l'un des les plus importants constituant dans le processus de coagulation du lait, nous allons passer en revue, leurs principales caractéristiques. Les quatre principales caséines qui existent naturellement dans le lait sont les caséines α S1, α S2, β et κ . Les caséines γ sont, pour leur part, des fragments peptidiques issus de la dégradation de la β -caséine par plasmine (Brulé et *al.*,1997).

Les caséines se distinguent par leur faible solubilité à pH 4,6 et elles sont différenciées sur la base de la distribution des charges et de la sensibilité à la précipitation par le calcium. Leurs caractéristiques physicochimiques sont présentées dans ce tableau 4. (Brulé et *al.*,1997).

La caséine k se distingue des autres par la présence de glucide : il existe 7 formes de k (k_1 à k_7) suivant leur degré de glycosylation. Elle à la propriété de former avec les autres caséines des complexes stables en présence de calcium et a un rôle de colloïde protecteur. Elle présente une très grande sensibilité à l'action des enzymes coagulantes au niveau de la liaison Phe₁₀₅ Met₁₀₆ (Michel Mahaut et *al.*, 2000).

I-3 La coagulation du lait

Globalement, la fabrication du fromage passe par trois étapes essentielles: la coagulation du lait, l'égouttage du gel puis l'affinage ou maturation enzymatique du caillé (REMEUF, 1994). Cette coagulation peut être par voie acide ; enzymatique ou mixte. La durée de la coagulation est égale à trois (3) fois le temps de prise soit 40 à 45 mn (GOBIN, 1995).

I-3-1 La coagulation acide

Dans le lait, les micelles de caséines et les globules gras sont chargés négativement. Ceci entraîne une répulsion électrostatique qui assure la stabilité du lait. Les fragments de caséine kappa sont hydrophiles et se trouvent en périphérie des micelles, ils créent une couche d'hydratation (quantité d'eau retenue empêchant le rapprochement des colloïdes entre eux).

L'acide lactique, issu de la dégradation du lactose par les bactéries lactiques, porte des charges positives qui vont neutraliser les charges négatives des colloïdes. A pH 4.6 - appelé point isoélectrique de la caséine - on obtient leur neutralité. L'acide va ainsi déshydrater les micelles, ce qui permettra à ces dernières de se rapprocher. En effet, les micelles vont se lier par des interactions hydrophobes (liaison faible, réversible) en retenant dans leur réseau les globules gras, les micro-organismes, les vitamines, toutes les particules qui peuvent être retenues dans les mailles du réseau caséinique. On obtient un gel: c'est la coagulation lactique du lait (Wikimedia Foundation, 2008).

I-3-2 La coagulation par voie enzymatique

Diverses enzymes protéolytiques ont la capacité de coaguler le lait mais la présure est la plus utilisée. La présure est constituée de deux enzymes, soit la chymosine, qui permet l'hydrolyse de la caséine κ , et la pepsine (Ruettiman et Ladisch., 1987). La coagulation du lait par la présure est divisée en trois étapes : la phase d'hydrolyse enzymatique, la phase d'agrégation et la phase de formation du gel (Brown et Ernstrom., 1988).

➤ Phase d'hydrolyse enzymatique

Lors de cette première étape, l'enzyme vient couper le lien peptidique Phe105-Met106 de la caséine et la protéine est scindée en deux peptides, le CMP (Caséinomacropéptide) et la para-k-CN. Le mode d'action de l'enzyme n'est pas encore bien défini. L'hydrolyse progressive de la caséine durant la phase primaire altère les propriétés des micelles à un point où elles deviennent susceptibles à l'agrégation, qui représente la seconde phase de la réaction (Lucey., 1995).

➤ Phase d'agrégation

L'agrégation devient possible lorsqu'un certain degré d'hydrolyse est atteint puisqu'il existe un niveau minimum de caséine κ nécessaire à la stabilisation de la micelle (Horne *et al.*, 1993). Selon les auteurs, l'agrégation commence lorsque de 60 à 90 % de la caséine κ est hydrolysée. Le temps écoulé pour l'atteinte de cette phase se nomme temps de coagulation par la présure ou RCT (pour «Rennet Coagulation Time ») (Dalglish, 1981). En pratique, le RCT est défini comme le temps écoulé depuis l'emprésurage jusqu'à l'observation visuelle de floculation.

➤ Phase de formation du gel

La troisième phase mène à la formation d'un réseau tridimensionnel continu nommé gel. Les agrégats augmentent d'abord de taille. Par la suite, la réticulation entre les chaînes et la fusion des particules transforment le lait en gel (Ruettiman et Ladisch., 1987).

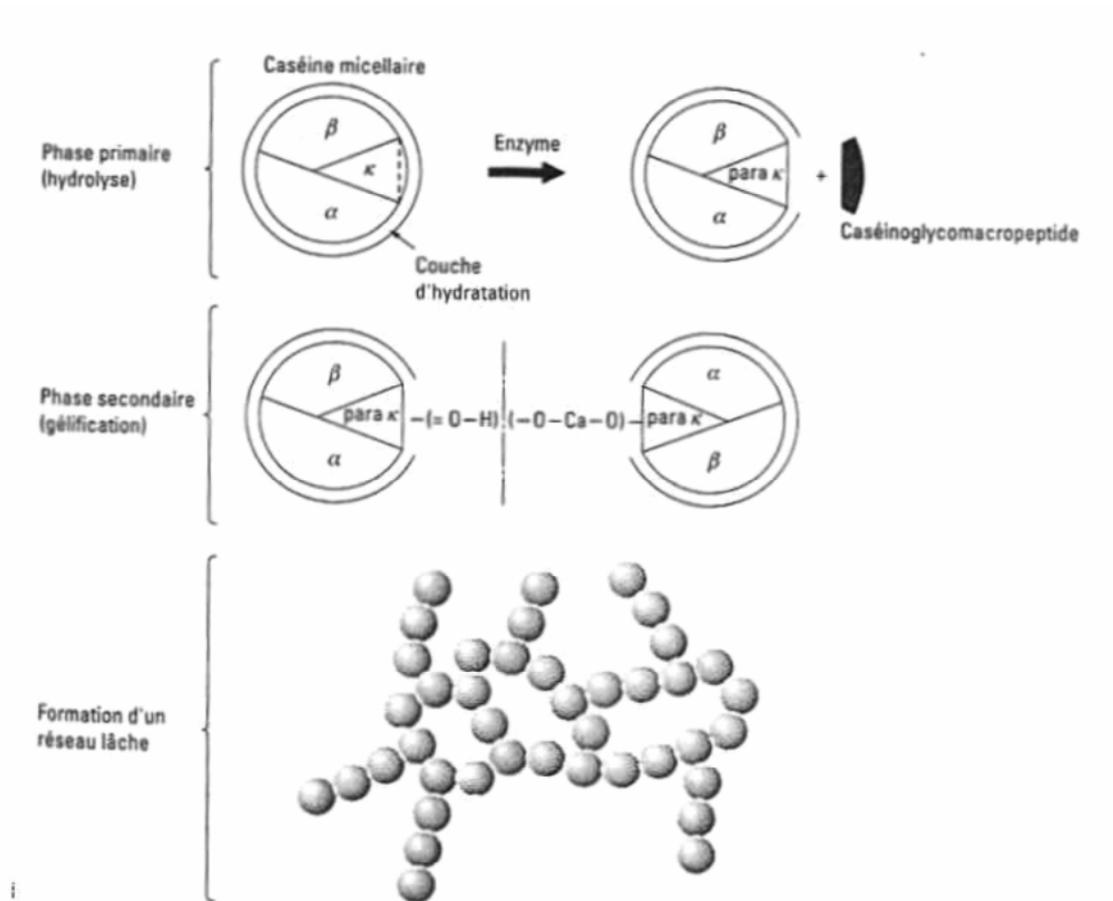


Figure 1 : phases de la coagulation enzymatique du lait et formation du réseau. (Alais., 1984 ; Mietton., 1995).

I-3-3 La coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. La multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibres spécifiques est à l'origine de grande diversité des fromages à pates molles et à pates pressé non cuite (Michel et *al.*, 2000).

I-4 Les facteurs de la coagulation enzymatique

I-4-1 Effet de la nature de l'enzyme et de sa concentration :

La vitesse de la protéolyse de la caséine κ par la présure augmente de façon croissante avec l'élévation de la teneur en enzyme dans le milieu mais seulement lorsque la concentration de cette dernière est faible (correspond aux doses employées en fromagerie). Pour des taux d'incorporation plus élevés, la vitesse de la réaction enzymatique tend à se stabiliser à une certaine limite (Garnot et Martin, 1979).

Il a été montré aussi que la concentration en enzyme influe sur les caractères rhéologiques du gel, notamment sa vitesse de raffermissement, sa fermeté maximale et son élasticité (Brulé et Lenoir., 1987). En outre, la nature des préparations enzymatiques, et dans le cas de la présure, le rapport chymosine/pepsine ont aussi une incidence sur la vitesse de coagulation et sur les caractéristiques rhéologiques du gel (Mietton et *al.*, 1994).

I-4-2 Effet de la température

La température optimale d'activité de la présure est de 40-42°C. A une température inférieure à 10°C, la coagulation ne se produit pas. Le temps de floculation est minimal entre 40-42°C, puis augmente aux températures plus élevées et devient nul à 65°C (temps d'inactivation de la présure) (Michel Mahaut et *al.*, 2000).

I-4-3 Effet du pH du lait

Son incidence est considérable, globalement l'abaissement du pH réduit le temps de prise, augmente la vitesse de raffermissement du gel et influe tant sur l'activité de l'enzyme coagulante (augmentation de la vitesse d'hydrolyse de la caséine k) que sur l'organisation du gel (diminution de la stabilité des micelles par neutralisation des charges négatives et libération des ions Ca^{+2}) (Martin et Coulon., 1995).

L'optimum d'hydrolyse de la caséine par la pepsine se situe entre 2et3 et 5,4 à 5,7 pour la chymosine (Mietton et *al.*, 1994).

I-4-4 Effet de la composition du lait

L'aptitude du lait à la coagulation et les propriétés rhéologiques du coagulum sont également influencés par la teneur en caséines et les caractéristiques de la structure micellaire et les teneurs en calcium soluble et en phosphate colloïdale (Remeuf et *al.*, 1991).

I-4-5 Teneur en caséines

la vitesse d'agrégation et la fermeté des gels augmentent avec la teneur en caséines (Michel Mahaut et *al.*, 2000).

I-4-6 Dimension des micelles

Il semble que les petites micelles soient à l'origine d'un temps de coagulation plus court ainsi que la formation d'un gel plus ferme (Remeuf et *al.*, 1991).

I-4-7 Taux de calcium et phosphate de calcium colloïdal

Les micelles de caséines, après action de la présure, deviennent sensibles aux ions calcium (Bringe et Kinsella., 1986). En effet, il a été montré que de faibles variations dans les teneurs en calcium du lait peuvent affecter notablement le temps de coagulation et la fermeté du gel (Martin et Coulon., 1995).

La présence de phosphate de calcium colloïdal est donc nécessaire à la formation du gel (Shalabi et Fox., 1982), sans ce sel il y aura formation d'un flocculat sans tenue et sans rigidité.

CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

II-1 : Matériel (voir annexe 4).

II-2 : Méthodologie

II-2.1 : échantillonnage d'étude

Pour l'extraction de la pepsine bovine objet de l'étude, nous avons utilisé des échantillons de caillettes fraîches (parties de caillettes) de bovins adultes de poids compris entre 80 et 110g acheter au niveau des boucheries d'El-Harrach ou reçues par l'abattoir de Rouïba directement après abattages.

Ces échantillons ont été par la suite, acheminés au laboratoire dans une glacière. Ils sont aussitôt lavés, dégraissés, coupés en morceaux mis dans des sacs en plastiques de congélation à fin de les congeler à -18°C après leur étiquetage.

II-2-2 Extraction

L'extraction de la pepsine bovine à partir des caillettes de bovins adultes est réalisée selon la méthode décrite par Valles et Furet (1977) dont les principales étapes présentées par la Figure2 sont :

II-2-2-1 la Macération

Les échantillons sont d'abord décongelés à -4°C pendant une nuit puis hachés et pesés : PU (g) et macérés dans une solution de HCl 0,2M de volume (1,25xPU) dans un bain de Marie à 42°C pendant une heure .Le mélange obtenu et par la suite macéré puis filtré sur gaz permettant ainsi l'obtention d'un extrait total brut et trouble de pepsine bovine.

II-2-2-2 Clarification

Après la macération l'extrait brut obtenu est clarifié par ajout de 1% du volume macéré (V/V) d'une solution de sulfate d'aluminium $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ 1M et 5% (V/V) d'une solution de sulfate dissodique Na_2SO_4 1M chauffée à 42°C. Après agitation et quelques minutes de repos à

42°C, on procède à une centrifugation de 3000 tours/min pendant 10 min conduisant à un extrait clarifié jaune plus ou moins limpide.

II- 2-2-3 Concentration des extraits clarifiés

A un poids donné de macération clarifiée, on ajoute deux fois son poids d'une solution saturée de NaCl qui contenait 1 p. 100 (*p/p*) d'acide chlorhydrique concentré $d = 1,19$. Une fois le mélange agité et laissé en repos pendant 1 h. On centrifugeait à 2100 g pendant 20 mn. Le surnageant est par la suite rejeté et on notait le poids du précipité humide repris dans une quantité déterminée d'eau distillée. Le pH des extraits clarifiés obtenus et par la suite ajusté à 5,30 avec une solution de phosphate disodique 1M (chauffée vers 42° C) Figure3).

Pour cette étude, trois extraction ont été effectuées, à partir des quelles nous avons constitué un échantillon moyen objet de l'étude. Le rendement d'extraction estimé lors de cette étude R_t est défini comme le nombre d'unités coagulantes contenues dans l'extrait clarifié provenant de 1 g de caillette utilisé selon VALLES et FURET (1977)

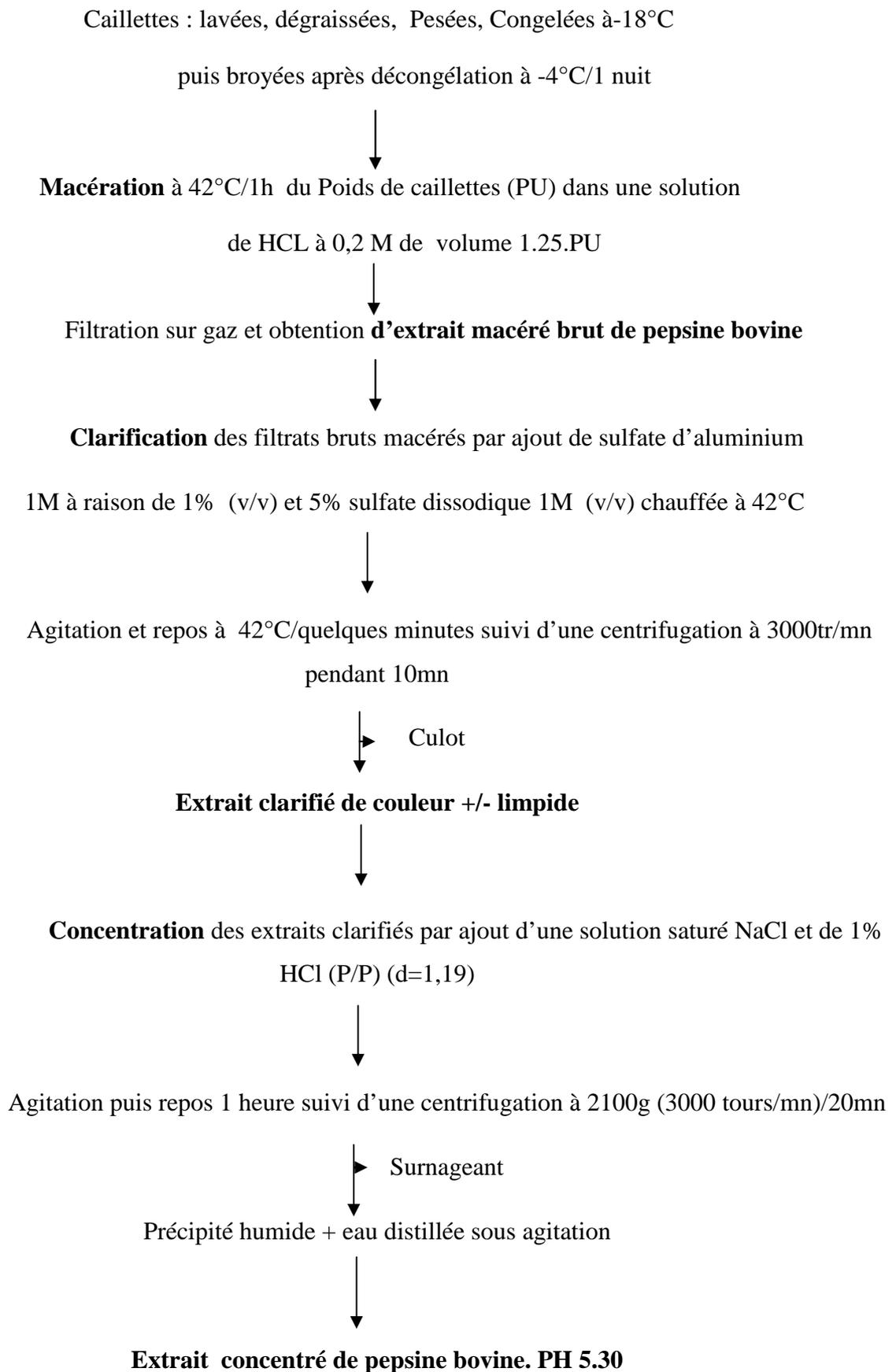


Figure 2 : Méthode d'extraction de la pepsine bovine (VALLES et FURET, 1977)



Figure 3: photo des extraits clarifiés et concentrés de pepsine bovine

II -2-3 Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante, de l'extraits concentrés de pepsine bovine adulte, a été exprimée soit :

- En «**Force**» coagulante, selon la méthode de SOXHLET rapportée par TSOULI (1974). La force coagulante représente le volume de lait coagulable par unité de volume de l'extrait enzymatique ou d'une enzyme, en 40 minutes, à 35°C et à pH du lait égal à 6.4. Cette mesure d'activité est déterminée dans les conditions standards suivantes :

Volume de la solution enzymatique..... 1 ml
 Volume de lait à coaguler..... 10 ml
 Température du lait..... 35°C
 pH du lait.....6.4
 Durée du test..... 40 minutes (2400 sec)

Notons que la présure animale, employée comme témoin dans cette étude, titre une force coagulante de 1/100 000 (1 volume d'enzyme coagule 100 000 volumes de lait dans les conditions standards de mesures (**Annexe 1**).

Expression usuelle de la force coagulante est donnée par la relation suivante (TSOULI, 1974) :

$$F = \frac{2400 \cdot V}{v \cdot T}$$

F : Force de l'enzyme
V : Volume de lait de pH 6.4 porté à la température de 35°C (substrat de BERRIDJE)*
v : volume de la solution enzymatique (1 ml)
T : Temps de coagulation du lait (en seconde)

* : **Le substrat de BERRIDJE**, est obtenu par reconstitution de 12 grammes de poudre de lait écrémé (Low-heat) dans une solution de chlorure de calcium à 0,01 mole/l. Après une agitation non violente en vue d'éviter la formation de mousse, et un repos de 30 minutes à l'obscurité ; le substrat de pH égal à 6,4 est prêt à l'emploi (COLLIN *et al.*, 1977).

- En Unité Présure (U.P) selon la méthode de Berridge modifiée par Collin *et al.* (1977). l'UP (Unité. Présure) ce définit comme la quantité d'enzyme qui coagule 10 ml de substrat en 10 secondes à 30°C et à pH du lait : 6,5

Expression usuelle **U.P** est donnée par la relation suivante :

$$\text{Activité en UP} = \frac{10 \times \text{volume de lait}}{\text{Temps de coagulation en secondes} \times \text{volume de présure}}$$

II-2-4-Mesure du temps de coagulation

Le temps de l'addition d'enzyme jusqu'à la coagulation commençante du mélange de réaction encore appelé temps de coagulation, est mesuré comme le montre la Figure 4 selon la méthode décrite par COLLIN *et al.* (1977). Dans les conditions standards de mesure de l'activité coagulante sur une solution de lait écrémé en poudre «LOW HEAT » contenant du chlorure de calcium à 0.01mol / l (pH = 6,4 ; T°= 35°C).

Substrat du BERRIDGE (lait écrémé en poudre « low heat » 12g \pm 0,02 dissous dans 100ml solution aqueuse CaCl₂ 0,01M).

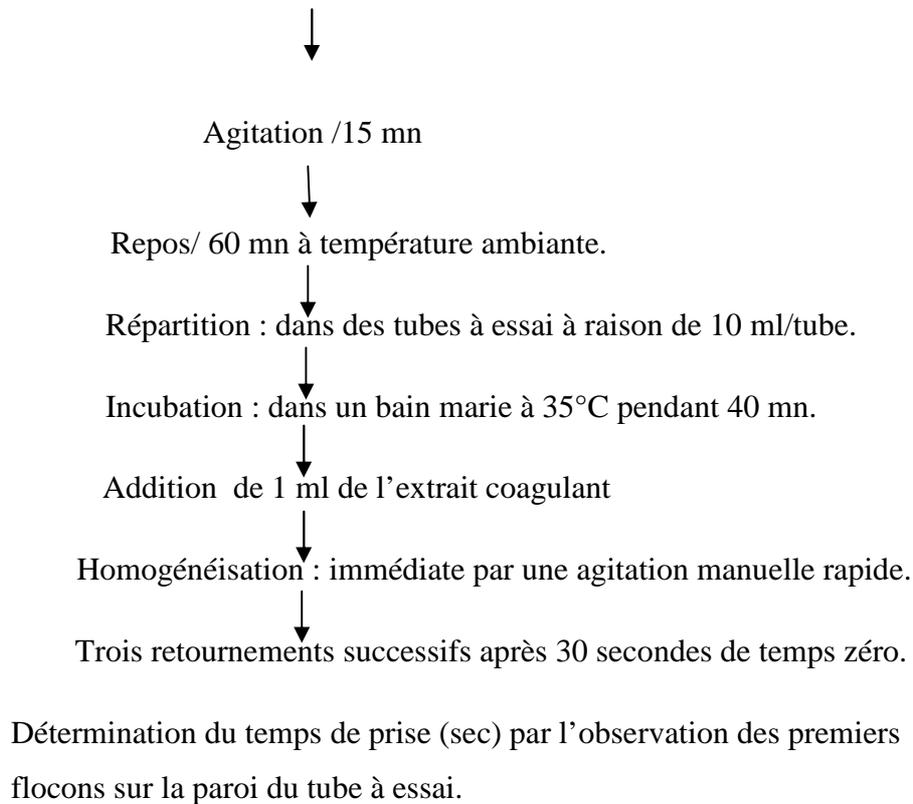


Figure 4 : Méthode de BERRIDGE de mesure du temps de prise (COLLIN et *al.*,1977).

II-2-5 Détermination de la concentration des extraits concentrés

(LOWRY et *al.*, 1951).

- **Principe**

La concentration en protéines totales des extraits concentré de pepsine bovine obtenus, est déterminée selon la méthode de LOWRY et *al.*(1951). En milieu alcalin et en présence de sulfate de cuivre, le réactif de phosphtungstique-phosphomolybdique (Réactif de Folin-Ciocalteu) donne une coloration bleue avec les protéines suite à une réaction de réduction appréciable par spectrophotométrie UV-visible à une longueur d'onde de 750nm.

Cependant l'intensité de la couleur produite varie avec les différentes protéines, puisqu'elle est due en grande partie entièrement à leur taux de tyrosine et tryptophane. La concentration en protéines totales (μ g/ml) est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage faite à partir d'une solution BSA à 200 μ g/ml.

- **Réactifs**

Réactif A : Na_2CO_2 2% dans du NaOH 0.1N

Réactif B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% dans du tartrate de potassium et de sodium 1%

Réactif C : solution de cuivre alcaline obtenue par mélange de 50ml du réactif A avec 1 ml du réactif B.

- **Mode opératoire :** 5 la Figure, illustre les étapes essentiels du dosage des protéines par la méthode de LOWRY et *al.*(1951)

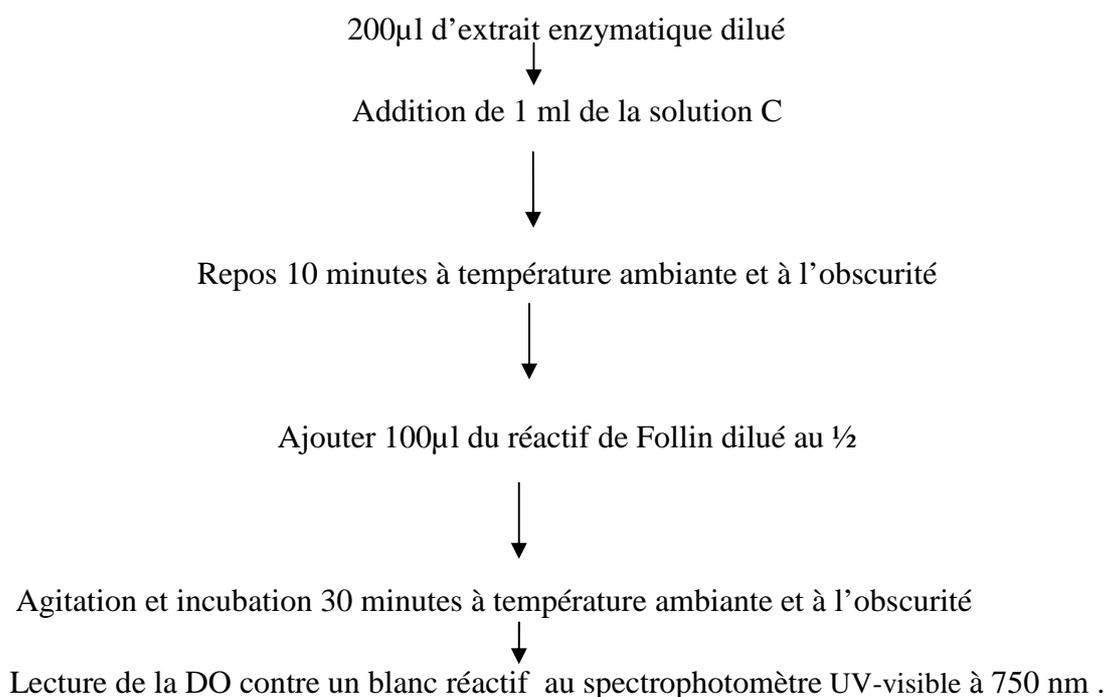


Figure 5 : Dosage des protéines par la méthode de LOWRY et *al.*(1951)

II-2-6 Suivi de l'activité protéolytique

Lors de cette étude, l'activité protéolytique de l'extrait de pepsine bovine en comparaison à une présure commerciale d'origine animale a été déterminée selon la méthode de GREEN et STACKPOOLE (1975), utilisant la caséine du lait comme substrat.

Son principe consiste à mesurer l'accroissement des produits d'hydrolyse obtenus par action enzymatique sur la caséine, après solubilisation dans l'acide trichloroacétique (T.C.A). L'évaluation du taux de dégradation du substrat (caséine) lors de cette étude est réalisée au spectrophotomètre UV-Visible par le dosage de chaînes latérales contenant les noyaux aromatiques à 280nm (GREEN M L, 1977).

Notons que pour cette étude la concentration des extraits coagulant est ajustée de façon à obtenir des temps de coagulation de grandeur comparable (voisines de 6 mn) selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante.

- **Mode opératoire** : Les étapes essentielles du suivi de cette activité sont présentées par la Figure 6

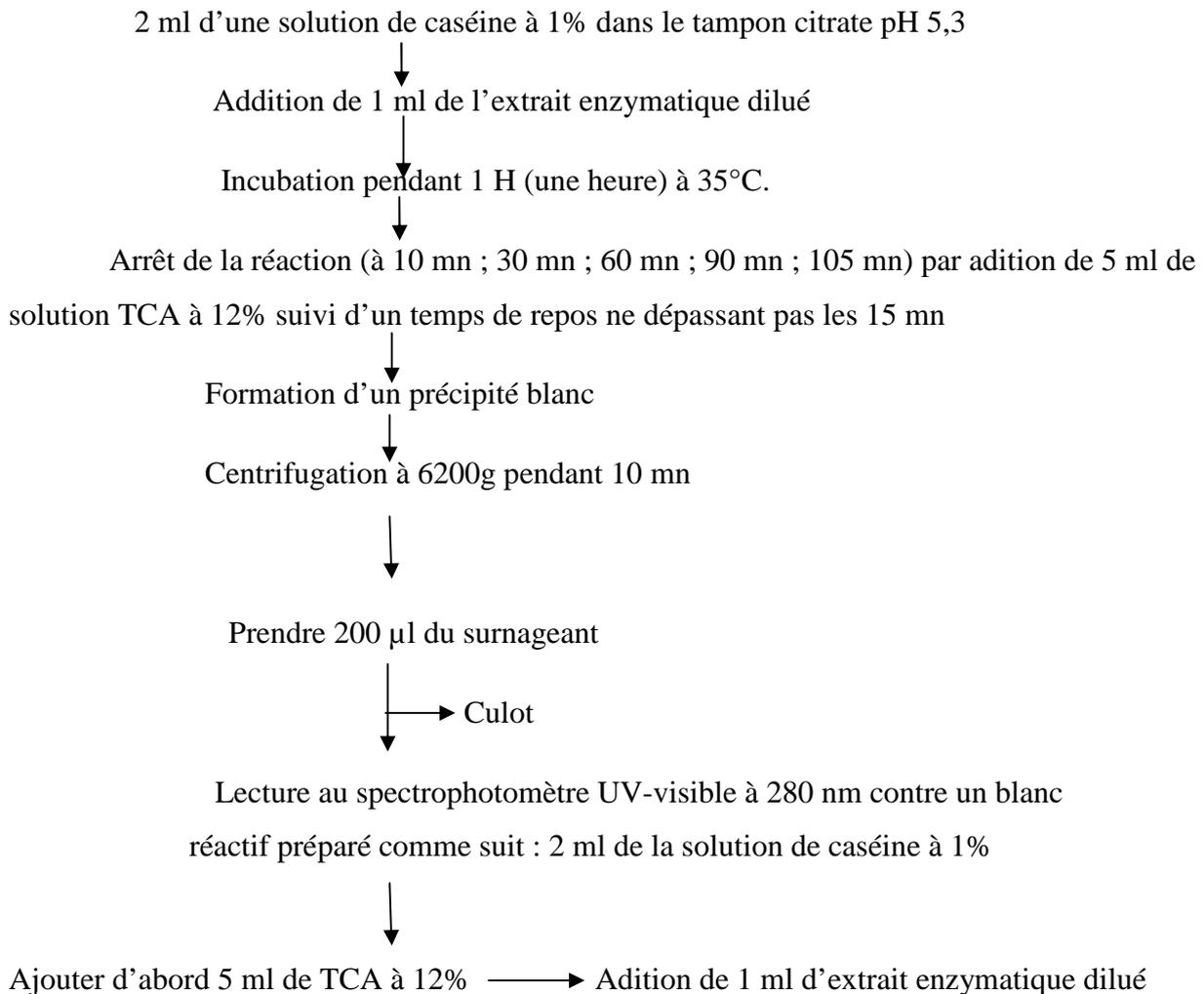


Figure 6 : Mode opératoire de l'activité protéolytique

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III-I Etude de l'activité coagulante des extraits des caillettes

Les caractéristiques coagulantes, des extraits clarifiés de pepsine de bovins adultes à savoir : Force coagulante (F) et UP associées au rendement d'extraction (Rt) sont présentés par le Tableau 6.

Tableau 3 : Activité coagulante des extraits macérés et clarifiés de pepsine bovine.

	PU(g)	HCl (ml)	Pm (g)	pH	F (Force)	UP	Rt UP/g de caillette
E₁	82,70	103,37	133,53	1,90	2285,71	10,28	0,12
E₂	87,61	109,51	124,63	1,87	2400,00	10,80	0,12
E₃	65,46	081,82	105,70	1,88	1935,48	08,70	0,13
E_m	78,59	098,23	121,28	1,88	2207,06	09,93	0,12

E₁ ; **2.3 Extraits clarifiés de pepsine bovine** ; **E_m** : **Extrait clarifié moyen**

PU (g) : poids unitaire d'un échantillon de la caillette.

Pm (g) : poids de la solution macérée après clarification.

AC : activité coagulante. (**UP**) : la quantité d'enzyme nécessaire pour coaguler 10 ml du substrat de BERRIDGE pendant 100 secondes au pH 6,5 à 30°C. $UP = F \cdot 0.0045$

Rt : Rendement d'extraction (nombre d'unités coagulante contenues dans les extraits clarifiés provenant d'un gramme de caillettes).

De ces résultats, il ressort pour l'ensemble des extraits clarifiés obtenus :

- Une activité moyenne exprimée en Force coagulante égale à 1/2207.06.
- Une activité moyenne exprimée en UP égale à 9.93
- Un Rendement d'extraction égal à 0,12
- Des temps de prise égal respectivement à : 1'55'' ; 1'40'' et 2'.04'' pour E₁, E₂ et E₃ soit un temps de prise très court de 1'48'' pour l'extrait moyen de pepsine bovine issu des trois extractions effectuées.
- Un pH bas des extraits clarifiés égal à 1.88 pour E_m. Celui-ci finalise comme ça été signalé par VALLES et FURET (1977) l'activation du pepsinogène en pepsine.

Effectivement, l'activité coagulante moindre des extraits clarifiés obtenus (Tableau 6) bien qu'elle est acceptable, est fort probablement due au fait qu'à ce stade expérimentale

d'extraction, l'agent coagulant n'a pas été complètement extrait d'où l'utilité de sa purification.

Par ailleurs, l'obtention d'un faible rendement d'extraction pourrait être probablement lié au caillettes elles même, car il et comme ils l'ont signalés VALLES et FURET (1977) lors de la mise au point de la présente technique d'extraction, la racé, l'âge, l'alimentation sont, parmi d'autres, des facteurs susceptibles d'influencer le contenu enzymatique des caillettes au moment de l'abattage. C'est donc des facteurs important pour la production, commerciale de la pepsine bovine.

III-2 Détermination de la concentration en protéines totales des extraits clarifiés

Tableau 4 : Concentration en protéines totales des extraits clarifiés (LOWRY et al., 1951)

Extraits	E ₁	E ₂	E ₃	E _m
DO	0,086	0,121	0,100	0,097
Concentration en protéines µg/ml	43	60,5	50	48,5

Des résultats, des concentrations en protéines totales dosées par la méthode de LOWRY et al. (1951) des extraits clarifiés de pepsine bovine adulte obtenus et présenté par le Tableau7 il ressort :

- Une concentration moyenne en protéines totales de 48.5 µg/ml estimée par référence à une courbe d'étalonnage faite à partir d'une solution de BSA à 200µg/ml (Annexe3)
- Pas de « corrélation » entre les concentrations en protéines totales des extraits clarifiés de pepsine bovine adulte et les Activités coagulantes retrouvées (Tableau 6)

L'explication, plausible à cet effet sans aucun doute due :

- Pertes constaté lors des étapes d'extraction.
- Au faite que les concentrations en protéines totales obtenues, ne reflète pas avec précision la concentration en protéases rechercher, mais comporte en plus des protéines coagulantes d'autres protéines de nature diverse. D'où la nécessité de purification des

extraits clarifiés de pepsine bovine, pour la détermination de la concentration protéique reflétant exactement l'activité enzymatique recherchée.

III-3 Suivi de l'activité protéolytique des extraits concentrés de pepsine de bovin adulte

La Figure 6 illustre les profils protéolytiques des extraits concentrés de pepsine de bovin adulte aux différentes concentrations choisies : 100% de Pa ; 100% de pepsine ; 50%Pa-50%Pepsine ; 60%Pa et 60% Pepsine pour des intervalles de temps compris entre 10 à 90mn d'emprésurage.

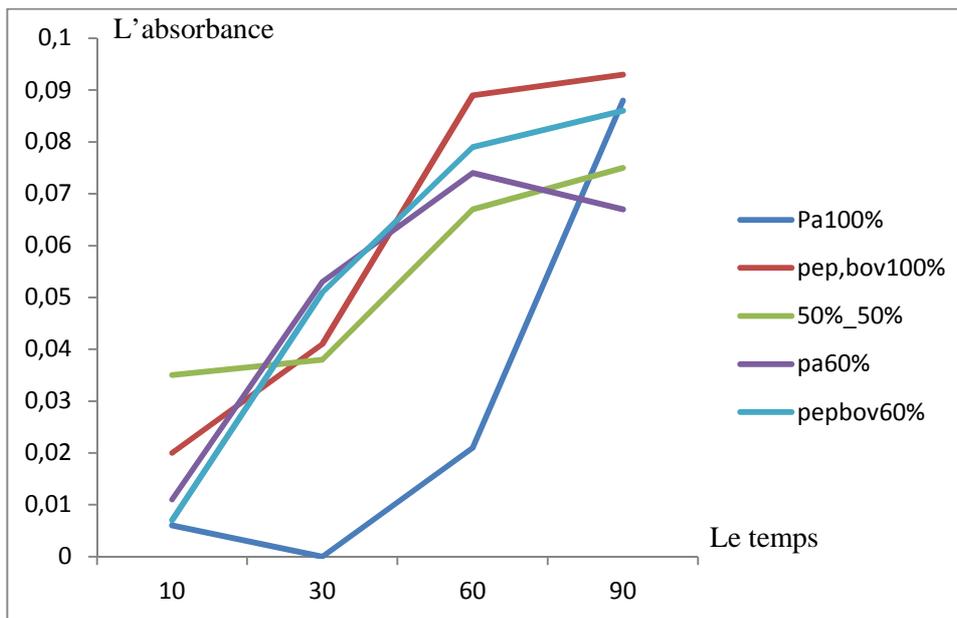


Figure 7 : profils protéolytiques des extraits concentrés de pepsine de bovin adulte aux différentes concentrations choisies

Au première vue, on note une évolution positive de cette protéolyse pour l'ensemble des extraits étudiés et aux différentes concentrations choisies. Celle-ci se montre moins importante avec la présure animale tout particulièrement entre 10 et 30 d'emprésurage. Au-delà de 30mn, on observe une augmentation progressive de celle-ci devenant importante à partir de 60mn d'emprésurage pour la présure animale mais restant toujours bien en dessous de celle observée avec les autres extraits coagulants à base de pepsine bovine. La différence est donc importante entre les tracés de courbes des deux types de coagulant utilisés.

Toutefois l'utilisation d'extrait de pepsine bovine et de présure tout particulièrement aux proportions 50-50% semble diminuer nettement cette protéolyse en comparaison aux autres

proportions choisies. Une relation entre la quantité de pepsine bovine utilisée et l'effet de protéolyse et donc certaine.

CONCLUSION

A l'issu de cette étude dont le but est d'extraire puis de caractérisé l'agent coagulant extrait de caillettes de bovins à l'état ruminant : la pepsine, nous sommes arrivés aux résultats suivants, caractéristiques des extraits clarifiés obtenus :

- Une activité moyenne exprimé en Force coagulante égale à 1/2207.06.
- Une activité moyenne exprimée en UP égale à 9.93
- Un Rendement d'extraction égal à 0,12 UP /g de caillette
- Des un temps de prise égal à 1'48''
- Un pH bas des extraits clarifiés égal à 1.88
- Une concentration moyenne en protéines totales de 48.

Toute fois, il à été démontré que l'utilisation d'extrait de pepsine bovine et de présure tout particulièrement aux proportions 50-50%, semble diminuer nettement l'activité protéolytique de la pepsine objet d'étude.car si celle-ci est excessive, elle peu généré des défauts technologiques pouvant affecter le rendement fromager.

En perspective, il serait nécessaire de compléter ce travail par la réalisation d'essai de fabrication de fromage avec un extrait purifié de pepsine en comparaison à une présure animale et en utilisant des mélanges appropriés de pepsine bovine adultes et présure pour la mise au point et pourquoi pas de fromage typiquement Algérien.

Références bibliographiques

- **ADRIAN J, LEGRAND G et FRAGNE R 1980.** Dictionnaire de biochimie alimentaire et de nutrition. Ed. Tec. Doc, Lavoisier, 2^{ème} édition Paris, p. 157.
- ALAIS, 1984.** In : Science du lait. Principes des techniques laitières. 4^{ème} édition, Sepaic, Paris.
- AMIOT J., FOURNIER F., LEBEUF Y., PAQUIN P., SIMPSON R., 2002.** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait. Dans : Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses internationales Polytechnique, Montréal, 1-73.
- **BERRIDGE NJ.1945.** The purification and crystallization of Rennin. Biochim.J., 39. 176-186.
- BOURDIER JF, LUQUET.FM:** dictionnaire laitier. Paris: Tech& Doc-Lavoisier, 1981.
- BREWER et al., 1984 cité par Scribau , 1993)
- BRINGE et KINSELLA., 1986 :** influence of calcium chloride on the chymosin initiated coagulation of casein micelles journals. Combridge.org/abstrat.
- BRULE G et LENOIR J, 1987 :** la coagulation du lait ; In « le fromage». Ed. Tec. Doc. Lavoisier, 2^{ème} édition, Paris, p. 1-21.
- BRULE G, LENOIR J, REMEUF F, 1997.** In : le fromage 3^{ème} édition, Tec & Documentation
- CARLSON A, CHARLES G. and HILL J. R.1985.** Improved essay procedure for determination of milk clotting enzymes. J. dairy .68, (2).
- CAROLE L 2002 :** Science et technologie du lait. Transformation du lait. Page 368
- CERNING, J, C. GRIPON, G .LAMBERT et J .LENOIR, 1984.** Les activités biochimiques des Penicillium utilisés en fromagerie.
- **COLLIN J.C, GRAPPIN R. LEGREAT Y.1977.** Étude de la méthode de mesure, selon BERRIDGE, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. Revu. Lait. Fr. 355, 389-394.
- DALGLEISH., 1981 :** Measurement of electrophoretic mobilities and zeta-potentials of particules frommilk using laser Dopplerelectrophoresis. J. Dairy Res.51, 425-438.
- **ECK A 1997 :** le fromage. 3^{ème} édition. Technique et Documentation. Lavoisier 891p.

- FILON., 2006.** Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en sciences et technologie des aliments pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.). Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université laval québec.
- GARNOT P. et MARTIN P. 1979.** La présure : composition, détermination de l'activité. Son rôle en fromagerie. Tec. Lait. 930, 27-30.
- **GOBIN M, 1998**: les pates molles. Bulletin de l'E.N.I.L.I.A.A.P :1-4.
- GOURSAUD J, 1992.** Coagulation enzymatique du lait ; In « biotechnologie ». Ed. Tec. Lavoisier 2^{ème} édition, paris.
- GRAINDAY P, 1978.**détermination de l'activité enzymatique d'extraits coagulants d'origine animale. Technicien du lait, 83, 5-47.
- GREEN M L, 1977** : Review of the progress of dairy science, milk coagulans. J. Dairy. Res.N°44 , pp : 159-188.
- GRIPON J.C.1985.** Les enzymes protéolytiques en industrie laitière. Hydrolases et dépolymérasés. Ed. BORDAS, édition, paris
- IVAN LARCHER, 2002).** La fabrication fromagère fermière
centre-fromagercarne@wanadoo.fr web: www.centre-fromager.com
- JEAN METGE, 1990** : la production laitière 248pages. Page 181 (Congrès de la Répression des Fraudes, Genève, 1908).
- **LENOIR J, LAMBERT G, SCHMIDT J-L et TOURNEUR C.1985.** la maîtrise de bioréacteur fromage. Biofutur, 12, 23,47.
- LENOIR J et SCHNEID N., 1987.** L'aptitude du lait à la coagulation par la présure ; in « le fromage ». Ed. Tec. Et doc. Lavoisier, 2^{ème} édition, paris.
- LINDEN et HUMBERT, 1991.** Microparticle-Enhanced Nephelometric Immunoassay. 1-Measurement of α casein and κ -casein. J. Dairy Sci. 1991. 74_3702-3708.
- LOWRY O. H. ROSENBROUGH N. J, FARR A.I.& RANDALL R.J. 1951.** Protein measurement with the Follin phenol reagent. J. biol. Chem. N° 193, pp : 265-275.
- **LUCEY J. A., 1995.** Effect of heat treatment on the rennet coagulability of milk. Dans: Heatinduced changes in milk, International Dairy Federation (IDF) 171-187.

- MAATOUB 1999:** assai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale de *BACILLUS subtilus* sélectionnée (Lc₃₃). Thèse de Magister. Agro. El-Harrach.91p
- MARTIN B. et COULIN J.B. 1995.** Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. I-influence des facteurs de production sur l'aptitude à la coagulation des laits de troupeaux. *Lait*, 75,61-80.
- MICHEL MAHAUT, JEANTET R., BRULE G., 2003.** Initiation à la technologie fromagère. Edi. Lavoisier. Paris (France). 194p
- MICHEL MAHAUT, JEANTET R., BRULE G., 2000 :** initialisation à la technologie fromagère.
- MIETTON B., DESMAZEAUD M., DE ROISSART H. et WEBER F. 1994.** Transformation du lait en fromage ; in « bactéries lactiques II». Ed. Tec. Doc. Lavoisier, édition paris.
- MIETTON., 1995 ;** Science et technologie du lait : transformation du lait.
- MORSLI, 1996 :** recherche sur les activités protéasiques des extraits de *Cynara scolymus*, du latex de *Ficus carica* et de proventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Thèse de Magister. I.N.A.
- **PACCLIN & GALENTIER, 1985.** Valeur nutritionnelle du lait et des produits laitiers. In. Laits et produits laitiers. Ed. F. M. LUQUET. Tech & Doc. Lavoisier.
- PERCHERON F., PERLES R. et FOGLIETTI M.J. 1991.** Les enzymes ;in « Biochimie - Structurale et Métabolique ». Ed. MASSON, édition, paris.
- **PAYENS T.A.J., 1979 :** la coagulation enzymatique du lait ; quelques aspects cinétiques, XX Congrès International de Laiterie, Paris, 34 ST,1-20.
- RAMET J. P. et WEBER F, 1980.** Contribution à l'étude de l'influence de différents facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Lait*, (591-592), 1-13.
- **RAMET J.P. 1987.** Les agents de transformation du lait ; in « le fromage ». ed. tec. Doc. Lavoisier. 2^{ème} édition. Paris.
- REED G. 1966.** Protéolytique enzymes; In « Enzyme in food processing ». Ed. Academic Press New York and London.
- REMEUF F., COSSIN V. , DERVIN C., LENOIR J. et THOMASONE R. 1991.**relations entre les caractères physico-chimique des laits et leurs aptitudes fromagères. *Lait*, 71, 397-421.

- REMEUF F.1994.** Relations entre caractéristiques physico-chimiques et aptitudes fromagères des laits. Recueil de médecine vétérinaire. Spéciale qualité du lait. (359-364).
- **ROLLEMA H.H.1992.** Casein association and micelle formation. In : Advanced dairy chemistry-1: Proteins. Fox P. F. (Ed.), Elsevier Applied Science, London, UK, 111-140.
- **RUETTIMANN K. W., LADISCH M. R., 1987.** Casein micelles: structure, properties and enzymatic coagulation. Enzyme and Microbial Technology 9: 578-589.
- SCHMIDT D.G1980.** Colloidal aspects of casein. Neth Milk Dairy Res, 34: 42-64.
- **SCHMIDT DG, 1982.** In: développements in Dairy chemistry. I proteins, 61-86. Ed. P. F. Fox, Appl. Sci. publish, London.
- SHALABI S.I., & FOX P.F., 1982:** influence of pH on the rennet coagulation of milk. J. Dairy. Res. 49 (1), pp :149-157.
- SINGH H., FOX P.F., 1989.** Heat-induced changes in casein. Bulletin of the International Dairy Federation (IDF) 238: 24-30.
- SLAMANI ROSA., 2003 :** thèse de magistère institut national agronomique. Optimisation de l'extraction de la pepsine ovine.
- SMINEGA T., HUMBERT G., LE DZAUT J. V. and LINDIN G. 1985.** Détermination de l'activité protéolytique dans le lait et les produits laitiers. Tec. Lait., 1001, 47-54.
- **SWAISGOOD H.E. 1982.** Chemistry of milk protein. In: « developments in Dairy chemistry », 1, proteins. Applied Science Publishers, LONDON.
- **TSOULI J., 1974:** etude comparée de l'activité enzymatique de trios varieties d'artichauts du genre Cynara cardunculus. L sur la coagulation du lait. Lait. Juillet- Aout.N°537.
- **VALLES E. et FURET J.P. ,1977.** Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extrait coagulant à base de pepsine bovine. I-Méthode d'extraction. Le lait. (569-570).
- VALLES E. et FURET J.P., 1981.** Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extrait coagulant à base de pepsine bovine.II- influence de la race, de l'âge et du sexe sur le contenu enzymatique. Lait, 61, 590, 618.
- VEISSEYER R, 1966.** In techniques laitières. 2^{ème} édition, La Maison Rustique, Paris.
- V. LARRETA, 1997 :** lait et produits laitiers. Les enzymes en agroalimentaire. Lavoisier Tech&Doc 1997-380p.

-WALSTRA P, JENNESS R, 1984. In Dairy chemistry and physics, publication JOHN WILEY & Sons. Inc.

-Wikimedia Foundation., 2008. 18772<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt4>

Annexes

Annexe 1

INFORMATION PRODUIT

RENIDAN 95/5

Force 1/125.000

REFERENCE: DANIMEX 11-02-01

DESCRIPTION: Présure en poudre d'une pureté exceptionnelle extraite du quatrième estomac de jeunes bovidés, et standardisée à une teneur de 95% de chymosine active.

**ANALYSE
CHIMIQUE:**

Force coagulante	1:125.000
Chymosine %	95 (+/-3)
Pepsine %	5 (+/-3)
Arsenic	< 3 ppm
Métaux lourds	< 40 ppm
Plomb	< 10 ppm

ANALYSE

BACTERIOLOGIQUE: Germes totaux	< 1000/gr.
Moisissures	< 50/gr.
Lactobacilli	< 50/gr.
Salmonella	Absent en 25 gr.
Listeria	Absent en 20 gr.
Coliformés	Absent en 5 gr.
Staphylococcies	Absent en 1 gr.

PRESENTATION: Poudre blanche claire avec une odeur faible de présure.

UTILISATION: Tous types de fromages.

DOSAGE: La force coagulante de RENIDAN 95/5 a été standardisée à 1:125.000.

Or, la coagulation est sujette à des influences telles que variations saisonnières de la qualité du lait, pH, variations de l'acidité, l'addition de chlorure de calcium et la présence d'agents inhibiteurs dans le lait.

Ainsi la dose d'emploi préconisée est de 2,5 gr.
pour 125 litres de lait entier.

Annexe 2

Photo1 : Mesure du PH du substrat de BERRIDGE.



Photo2 : Mesure du temps de la coagulation en bain marie.



Suite Annexe 2 : Photo montrant le début de la coagulation



ANNEXE 3 : Détermination de la Concentration en protéines totales des extraits de pepsine de bovin adulte

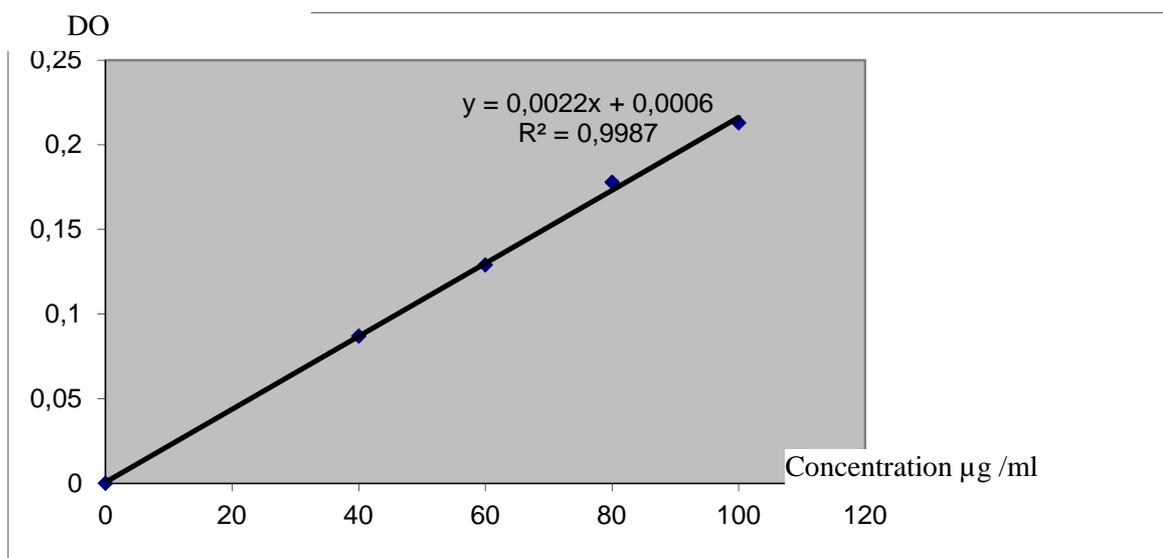


Figure : courbe d'étalonnage avec BSA

Résumé

La pepsine bovine est l'un des constituants mineurs normaux de la présure, mais dont la sécrétion devient prépondérante après sevrage. Elle apparaît très voisine de la présure. Les principales caractéristiques des extraits de pepsine clarifiés obtenus lors de cette étude sont :

- Une activité moyenne exprimé en Force coagulante égale à 1/2207.06.
- Une activité moyenne exprimée en UP égale à 9.93
- Un Rendement d'extraction égal à 0,12 UP/g de caillette
- Une activité protéolytique supérieure à celle de la présure animale

Mots clés : présure/ Pepsine bovine/caillettebovine.

Summary

Bovine Pepsin is one of the minor constituents of normal rennet, but whose secretion becomes dominant after weaning. It appears very neighbor of rennet. The main characteristics of the extracts of pepsin clarified obtained during the study are:

- An average activity expressed as clotting force equal to 1/2207.06.
- An average activity expressed as equal to 9.93 UP
- An equal extraction efficiency through 0, 12 UP / g of abomasum
- A proteolytic activity than that of animal rennet

Keywords: rennet / Pepsin veal / veal rennet.

ملخص

الأبقار البيبسين هي واحدة من مكونات بسيطة من الإنفحة طبيعي ، ولكن ويبدو جدا إفراز الذي يصبح المهيم بعد الفطام جارة الإنفحة. الملامح الرئيسية للبيبسين تستخرج : توضيح تم الحصول عليها خلال هذه الدراسة هي

- نشاط متوسط أعرب كقوة تخثر يساوي 1/2207.06
- نشاط متوسط أعرب متساوية عند ارتفاع 9.93
- abomasum وعلى قدم المساواة من خلال كفاءة استخراج أعلى / ز من 0, 12 نشاط بروتين من تلك الحيوانات الإنفحة

كلمات البحث : الإنفحة / البيبسين لحم العجل / الإنفحة لحم العجل