



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

Ecole Nationale Supérieure Agronomique
Département: Technologie Alimentaire
Spécialité: Elaboration et qualité des aliments

المدرسة الوطنية العليا للزراعة
القسم: تكنولوجيا الغذاء
التخصص: إعداد ونوعية الأطعمة

Mémoire De Fin D'études

Pour L'obtention Du Diplôme Master

THEME

**Obtention Et Caractérisation D'une Protéase Coagulant Le
Lait, Extraite Du Proventricule De Dinde. Efficacité Fromagère.**

Soutenu Publiquement le : 27/07/2019

Présenté Par :

BOUGUERRA Manel et CAID Rachida

Devant le jury :

Promoteur:

M. BELLAL. M

Professeur, ENSA

Président :

M. MEKIMENE.L

Professeur, ENSA

Examineur :

M. NOUANI. A

Professeur à Boumerdes.

Mme. MERIBAI. A

MCA, ENSA

Promotion :

2016/2019

Table des matières

<i>Remerciements</i>	2
Résumé.....	5
Abstract	5
ملخص	6
INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I :	3
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. LE LAIT	3
1. Définition	3
2. Composition du lait	3
3. Caractéristiques organoleptiques et physicochimiques du lait	4
3.1. Les caractéristiques organoleptiques	4
3.1.1. La couleur	4
3.1.2. L'odeur	4
3.1.3. La saveur	4
3.1.4. La viscosité	5
3.2. Les caractéristiques physico-chimiques	5
3.2.1. La densité	5
3.2.2. Le pH	5
3.2.3. Le point de congélation.....	5
3.2.4 Acidité de titration ou acidité Dornic.....	5
4. Analyse détaillée de la composition du lait	6
4.1. L'eau.....	6
4.2. Les lipides ou matières grasses.....	7
4.3. Protéines.....	8
4.3.1. Les caséines.....	8
4.3.2 .Protéines du lactosérum	10
4.4. Lactose	10
4.5. Minéraux.....	11
4.6. Vitamines	11
II. COAGULATION DU LAIT	13
1. Définition de la coagulation:	13
2. Types de coagulation du lait	13

2.1. Coagulation par acidification	13
2.2. Coagulation enzymatique	15
2.2.1. Propriétés du coagulum obtenu par voie enzymatique	17
2.3 Coagulation mixte	18
3. Les différents coagulums obtenus	18
4. Facteurs influençant la coagulation du lait	19
4.1. Influence du pH.....	19
4.2 Influence de la température	20
4.3. Influence de la teneur en calcium	20
4.4. Effet de la concentration en d'enzyme.....	20
4.5. Influence de la concentration en caséines et le diamètre des micelles de caséines	21
III. LA PRÉSURE ET SUCCÉDANÉS DE PRÉSURE	23
1. La présure	23
1.1 Définition de la présure	23
1.2. Propriétés physicochimiques et technologiques de la présure.....	23
1.2.1. Les propriétés physicochimiques	23
1.2.2. Les propriétés technologiques.....	23
1.3. Composition de la présure.....	24
1.3.1. Chymosine : (E.C.3.4.23.4)	24
1.3.2. Pepsine (E.C. 3.4.23.1, 2,3).....	24
2. Succédanés de la présure.....	25
2.1. Succédanés de présure d'origine animale.....	26
2.2. Succédanés de présure d'origine végétale	28
2.3. Succédanés de présure d'origine microbienne	29
2.3.1. Les enzymes d'origine fongique.....	29
2.3.2. Les enzymes d'origine bactérienne.....	29
IV. FROMAGE	30
1. Définition du fromage.....	30
1.1. Le fromage frais	30
1.2. Différents types de fromages frais	31
2. Étapes de fabrication du fromage	31
2.1. La standardisation	32
2.2. La coagulation	32
2.3. L'égouttage	32

2.4. Le salage	32
2.5. L'affinage	33
3. Étapes de fabrication du fromage frais.....	33
4. Classification officielle du fromage	35
Chapitre II :	37
MATERIELS ET METHODES	37
I. Obtention de l'extrait enzymatique brut	37
1.1 Préparation des pro-ventricules	37
1.2. Extraction.....	37
1.3. La clarification de l'extrait	38
1.4. L'activation de l'enzyme	38
II. Étude de l'extrait coagulant brut.....	40
1. Détermination de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut	40
2. Dosage de protéines totales	40
3. Rendement en protéines brutes	41
4. Mesure de l'activité spécifique	42
5. Activité protéolytique	42
6. Détermination de l'indice AC/AP.....	43
III. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut et de la présure.....	43
1. Influence de la température du lait	43
2. Influence du pH du lait.....	43
3. Influence de la concentration en CaCl₂.....	43
4. Influence de la variation de la concentration d'enzyme.....	44
5. Estimation des mélanges EEBC-présure	44
IV. Étude de la stabilité de l'extrait enzymatique.....	44
1.1. Stabilité thermique	44
1.2. Stabilité au cours de la conservation.....	44
V. Purification de l'extrait enzymatique brut	45
1. Précipitation au sulfate d'ammonium : purification partielle.....	45
2. Rendement de pré-purification	45
3. Dialyse : dessalage de l'extrait enzymatique	46
4. Filtration sur gel Sephadex	46
5. Estimation du poids moléculaire de l'EEB de dinde	47
V. Application fromagère.....	48
1. Analyses physicochimiques des laits utilisés dans l'élaboration des fromages.....	48

1. 1. Détermination de l'acidité du lait	48
1.2. Détermination du pH du lait.....	48
1.3. Détermination du taux de M.G du lait (méthode de GERBER)	48
1.4. Détermination du taux de l'extrait sec total du lait (méthode AFNOR)	48
2. Essai de fabrication d'un fromage	49
3. Technologie de fabrication du fromage frais	49
3.1. Préparation du lait	49
3.2. Ensemencement et emprésurage.....	49
4. Analyses physicochimiques du fromage	50
4.1. Détermination du taux de l'extrait sec total (méthode AFNOR).....	50
4.2. Détermination du pH	50
4.3. Détermination de l'acidité	50
4.4. Le rendement fromager.....	50
5. Suivi des caractéristiques organoleptiques.....	51
CHAPITRE III :	52
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	52
I. Étude de l'extrait enzymatique brut.....	52
1. Le rendement d'extraction.....	52
2. Caractéristiques de l'extrait enzymatique brut clarifié	52
2.1. Activité coagulante de l'EEB	53
2.2. Le taux de protéines totales	54
2.3. Détermination de l'activité spécifique	55
2.4. L'activité protéolytique.....	56
II. Caractérisation de l'extrait coagulant brut de la dinde	57
1. Influence de la température du lait.....	57
2. Influence du pH du lait.....	58
3. Influence de la concentration de CaCl₂ sur l'activité coagulante.....	59
4. Influence de la concentration de l'enzyme	61
5. Temps de coagulation comparé des différents mélanges EEB-présure	62
III. Étude de la stabilité de l'extrait brut	64
1. Stabilité au cours de la conservation.....	64
2. Stabilité thermique	65
IV. Effet de quelques effecteurs sur l'activité coagulante	66
V. La purification de l'extrait brut	67
1. Résultat de la pré-purification au sulfate d'ammonium	67

2. Purification partielle de l'extrait enzymatique par gel de filtration	68
3. Détermination du poids moléculaire de la pepsine bovine.....	69
VI. Essai de fabrication d'un fromage	71
1. Analyse physicochimique du lait	71
3. Qualité hygiénique (microbiologique).....	73
4. Les traitements statistiques des résultats de l'analyse sensorielle des fromages élaborés et les résultats statistiques de la dégustation des fromages	73
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	75
CONCLUSION	75
Références bibliographiques.....	77
ANNEXES	84

Résumé

Dans cette étude, la coagulase de pro-ventricule de dinde a été extraite avec 10% de NaCl (1/2, p / v) par centrifugation. L'objectif est la caractérisation de cette enzyme afin de garantir son utilisation comme substitut de la présure lors de la coagulation du lait. À cette fin, nous avons étudié les propriétés protéolytiques, l'activité coagulante du lait, l'activité spécifique et le taux de protéines, par comparaison avec la présure. Les conditions optimales du coagulant ont également été déterminées.

L'activité coagulante, l'activité protéolytique, l'activité spécifique et la concentration en protéines totales de l'enzyme brute sont respectivement de 5,88 Up, 0,422 mg / mL, 0,3 Up / mg et 19,25 mg / mL. Les résultats relatifs aux conditions optimales de coagulation du lait sont: 45 °C, pH = 5,8 et 0,03 M de CaCl₂.

La purification de l'extrait brut a été évaluée par la chromatographie de filtration sur gel de Séphadex G-75. Sur les fractions obtenues l'activité coagulante a été déterminée. Seules les fractions comprises entre 27 et 36 sont douées d'activité coagulante. Le poids moléculaire de la fraction protéique active est estimé à 31 KDa.

Des essais de fabrication de fromage frais ont été réalisés avec un mélange de coagulase de dinde – présure et comparés à la coagulase et la présure seules. Les meilleurs rendements de la qualité organoleptique des produits élaborés sont à la faveur de l'emploi du mélange.

Mots clés : Coagulase de dinde, présure, activité coagulante, fromage frais.

Abstract

In this study, the coagulase from turkey proventriculus was extracted with 10% NaCl (1/2, p/v) by centrifugation. The objective is the characterization of this enzyme in order to ensure its use as a rennet substitute in the milk coagulation. For this purpose, we studied its proteolytic, specific milk clotting, coagulant activities and protein content with comparison with rennet. The optimal coagulant conditions were also determined.

The coagulant activity, proteolytic activity, specific milk clotting and the concentration of total protein of the crude enzyme are 5.88 MAC, 0.422 mg/mL, 0.3 MAC/mg and 19.25mg/mL respectively. The relative results of optimal milk clotting conditions are: 45°C, pH= 5.8, 0.03 M of CaCl₂.

Purification of the crude extract was evaluated by Sephadex G-75 gel filtration chromatography. Fractions obtained were analysed for milk clotting activity. Only the fractions

between 27-36 have a milk clotting activity .The molecular weight of the active protein fraction is estimated by 31 KDa.

Fresh cheese making trials were carried out with a mixture of turkey coagulase - rennet and compared with coagulase and rennet alone. The best organoleptic quality yields of the made products are favored by the use of the mixture.

Key words: coagulase of turkey, rennet, coagulant activity, fresh cheese.

ملخص

في هذه الدراسة ، تم استخراج البيبسين من المعدة الكيميائية للديك الرومي باستعمال 10 ٪ من كلوريد الصوديوم (2/1) ، وزن / حجم) باعتماد طريقة الطرد المركزي. الهدف هو توصيف هذا الانزيم لضمان استخدامه كبديل لمخثر الحليب" الروبة التجارية".

. لذلك قمنا بدراسة عملية تخثر الحليب المحدد ، أنشطة التخثر ومحتوى البروتين بالمقارنة مع المنفعة. كما تم تحديد الظروف المثالية للتخثر.

كان نشاط التخثر ، نشاط التحلل البروتيني ، تخثر الحليب المحدد و تركيز البروتين الكلي للإنزيم 5.88 MAC ، 0.422mg / m m L ، 0.3MAC / mg و 19.25 mg / mL على التوالي. كانت نتائج ظروف تخثر الحليب المثالية: 45 درجة مئوية ، درجة الحموضة = 5.8 ، 0.03 M من CaCl₂.

الترشيح الهلامي تم باستعمال جل Sephadex G-75. تم تحليل الكميات المرشحة لنشاط تخثر الحليب ومحتوى البروتين والنشاط المحدد. فقط الاقسام بين 27-36 كان لها نشاط تخثر الحليب و بوزن جزيئي يقدر ب 31 KDa .

كشفت تطبيق خليط البيبسين-الروبة في صناعة الاجبان عن عائد أفضل و جودة عالية.

الكلمات المفتاحية : البيبسين' الروبة' عملية تخثر الحليب' جبن طازج'