



Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας Και Τεχνολογίας
Τροφίμων Και Διατροφής
Τμήμα Διατροφής Και Διαιτολογίας



UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNOLOGIES DE LILLE
Laboratoire des Procédés Biologiques Génie
Enzymatique et Microbien

Caractérisation d'un extrait coagulant issu du fruit de *Balanites aegyptiaca* utilisable en Fromagerie

Mémoire – Rapport de stage présenté par :

Vasiliki – Maria BAMPATSIKOU
Angela MUNGALA LENGU

Sous la Direction de

Dominique VERCAIGNE – MARKO, Professeur de Biochimie et Chef de Département
Génie Biologique à l'IUT A de l'Université de Lille 1

REMERCIEMENTS

Il nous est offert ici, par ces quelques lignes, la possibilité de remercier les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire de stage.

Nous tenons à remercier particulièrement Madame Dominique VERCAIGNE – MARKO, notre maître de stage, pour son accompagnement pédagogique, la confiance qu'elle nous a témoignées, les responsabilités qu'elle nous accordées, mais surtout pour la patience et le goût du travail sérieux et bien fait, qui ont contribué grandement à la réalisation de ce stage recherche.

Nous adressons également nos remerciements à Madame Maria TSIGGA, Professeur de Nutrition et responsable Erasmus. Monsieur Athanasios PAPADOPOULOS, chef du Département Nutrition et Diététique de l'ATEITH, de nous avoir accordé cette opportunité de réaliser notre stage avec le programme ERASMUS en France mais aussi pour leur accompagnement pédagogique.

Nous tenons à remercier l'ensemble du personnel du Département Génie Biologique de l'IUT 'A' pour son accueil, son support et son aide durant ce stage. Particulièrement à Magali BOTQUIN, Mélanie MOUTON et Roxana RUSU.

Enfin, nous tenons à adresser notre gratitude à nos familles respectives qui nous ont toujours soutenues. Leur soutien inconditionnel, leur patience, leur compréhension et leurs conseils ont été d'une aide précieuse à la réussite de nos d'études.

Nous leur dédions nos réussites passées et à venir.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	3
LISTE DE TABLEAUX	5
LISTE DES FIGURES	6
RESUME.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUCTION.....	9
PARTIE 1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	11
CHAPITRE 1 : LE LAIT ET SA COMPOSITION	12
1.1 Caractéristiques physico – chimiques du lait de vache	12
a. Constantes physiques du lait.....	12
b. Composition chimique	13
c. Valeur énergétique du lait.....	20
CHAPITRE 2 : LA COAGULATION DU LAIT	21
2.1 GENERALITES	21
2.2 MECANISMES DE LA COAGULATION	21
CHAPITRE 3 : LA FROMAGERIE	30
3.1 Les principes généraux de la fromagerie.....	30
3.2 La technologie de fabrication des fromages	31
3.3 Les principaux problèmes en technologie fromagère.....	32
3.4 Valeur nutritive des fromages	33
3.5 La Qualité des fromages	33
CHAPITRE 4 : DESCRIPTION DE L'ARBRE DE <i>BALANITES AEGYPTIACA</i> ET SON FRUIT : LES DATTES DU DESERT.....	34
4.1 DESCRIPTION ET BIOLOGIE	34
4.2 ECOLOGIE.....	34
4.3 LE FRUIT : LES DATTES DU DESERT	35
4.4 UTILISATION	37
PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES	38
CHAPITRE 1 : METHODES DE PREPARATION.....	39
1.1 Macération et extraction de l'extrait à pH basique	39

1.2 Macération et extraction de l'extrait à pH acide	40
1.3 Ultrafiltration frontale	41
1.4 Purification par chromatographie d'échanges d'ions	41
1.5 Techniques analytiques	42
a. Analyses	42
b. Électrophorèse	43
c. Etudes des propriétés enzymatiques	45
CHAPITRE 2 : FABRICATION DES FROMAGES	47
2.1 Préparation des échantillons	47
2.2 Protocole de fabrication des fromages	47
2.3 Préparation du lait, thermisation et maturation	48
2.4 emprésurage	48
2.5 Egouttage	48
2.6 Rendement fromager	48
2.7 Mesures Texturales	49
2.8 Analyse sensorielle	50
PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	52
3.1 Extraction de l'extrait coagulant	53
a. Rendement d'extraction	53
b. Effet du pH	54
3.2 Identification des enzymes coagulantes	55
a. Purification de la sérine protéase	55
b. Purification de la protéase acide	62
3.4 Détermination des points isoélectriques	67
CHAPITRE 4 : APPLICATION EN FROMAGERIE	69
4.1 Essai de fabrication des fromages	69
4.2 Analyses de texturation	70
4.3 Analyses sensorielles	72
PARTIE 4 : CONCLUSION	77
BIBLIOGRAPHIE	80
ANNEXES	85

LISTE DE TABLEAUX

Tableau 1 : Constantes physiques du lait

Tableau 2 : Composition moyenne des principaux constituants du lait de vache (g/litre)

Tableau 3 : Composition moyenne et distribution des protéines du lait de vache

Tableau 4 : Composition moyenne des micelles* de caséine bovine (g/100 g d'extrait sec)

Tableau 5 : Constituants lipidiques du lait de vache et localisation dans les fractions physico-chimiques (g/100 g de matière grasse)

Tableau 6 : Valeur nutritionnelle du fruit en % de matière sèche

Tableau 7 : Apport protéique du mésocarpe du fruit

Tableau 8 : Extrait obtenu à pH alcalin

Tableau 9 : Extrait obtenu à pH acide

Tableau 10 : Résultats des analyses des fractions purifiées à pH basique

Tableau 11 : Récapitulatif des résultats de l'extraction à pH 6

Tableau 12 : Vitesse initiale d'hydrolyse de Suc-Ala²-Pro-Phe-pNa

Tableau 13 : caractéristiques des fromages

Tableau 14 : Paramètres d'analyses de texture des fromages

Tableau 15 : Appréciation générale des fromages

Tableau 16 : Statistique Descriptive

Tableau 17 : Test Kruskal-Wallis

Tableau 18 : Test Mann-Whitney U

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Equilibre salin du calcium et du phosphore dans le lait frais
- Figure 2 : Arbre de *Balanites aegyptiaca*
- Figure 3 : Schéma du fruit de *B. aegyptiaca*
- Figure 4 : Fruit de *Balanites aegyptiaca*
- Figure 5 : Diagramme d'extraction à pH basique
- Figure 6 : Diagramme d'extraction à pH acide
- Figure 7 : Le composé Sulfanilamide - azocaséine
- Figure 8 : Formule du substrat N-succinyl-dialanyl-Pro-Phe-pNa
- Figure 9 : Diagramme de fabrication des fromages
- Figure 10 : électrophorèse des extraits en tampon alcalin et acide
- Figure 11 : Chromatogramme de la purification de l'extrait en tampon Tris
- Figure 12 : Electrophorèse en SDS-PAGE des fractions obtenues à pH 8.1
- Figure 13 : Electrophorèse en Native - PAGE
- Figure 14 : pH optimum du Pic 2
- Figure 15 : Cinétique d'hydrolyse du N-Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa par la sérine protéase en fonction du pH
- Figure 16 : Chromatogramme de la purification de l'extrait en tampon phosphate pH 6
- Figure 17 : Electrophorèse en SDS – PAGE des fractions obtenues à pH 6
- Figure 18 : électrophorèse à pH acide
- Figure 19 : gel à la caséine en présence du SDS - PAGE
- Figure 20 : électrophorèse sur gel à la caséine en Native -PAGE
- Figure 21 : coagulums obtenus avec le Pic3, l'extrait brut et la présure
- Figure 22 : Appréciation générale
- Figure 23 : Appréciation des caractères organoleptiques
- Figure 24 : Préférence générale des fromages

RESUME

Ce mémoire de stage est une étude de la caractérisation d'un extrait coagulant issu du mésocarpe du fruit de *Balanites aegyptiaca* utilisable en remplacement de la présure dans la technologie fromagère. Le mésocarpe des fruits de *Balanites aegyptiaca* a été macéré dans deux tampons, Tris – HCl 50mM EDTA 1mM, β - mercaptoéthanol 3mM pH 8,1 et Phosphate de sodium 50mM pH 6 pour en extraire deux enzymes coagulantes, une sérine protéase et une protéase aspartique. La purification par chromatographie d'échanges d'ions sur colonne Q-Sepharose a permis d'isoler et d'identifier les deux enzymes. En effet la protéase aspartique présente l'activité coagulante et l'activité spécifique les plus élevées. En électrophorèse sur gel de polyacrylamide en SDS –PAGE, la protéase sérine présente des bandes bien distinctes de 28 et 42, des bandes de 64 et 68 kDa sont moins prononcées dans les mêmes conditions, la protéase aspartique montre des bandes de 41, 46 et 57 kDa. En utilisant le N-Succinyl-Ala2-Pro-Phe-pNa comme substrat, la sérine protéase présente un pH optimum de 7.5

La capacité de l'extrait à coaguler le lait a été testée en fromagerie par la fabrication des fromages avec l'extrait brut obtenu avec la solution de NaCl 5% et le Pic 3 issu de la chromatographie d'échanges d'ions sur Q – Sepharose en tampon phosphate de sodium. Les paramètres physico – chimiques et sensoriels des fromages ont été comparés au fromage obtenu avec la présure et montrent que les protéases de l'extrait du mésocarpe des fruits de *Balanites aegyptiaca* sont capables de remplacer la présure dans la fabrication des fromages après purification et assainissement des extraits.

ABSTRACT

This internship thesis is a study of the characterization of a coagulating extract from the mesocarp of the fruit *Balanites aegyptiaca*, used to replace rennet in cheese technology. The mesocarp of *Balanites aegyptiaca* was macerated in two buffers, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, beta mercaptoethanol pH8 and sodium phosphate 50mM pH 6, to extract two coagulating enzymes, a serine protease and an aspartic protease. Purification by ion exchange chromatography on Q-Sepharose column resulted in the isolation and identification of the two enzymes. In fact the aspartic protease presents higher coagulant activity and specific activity. In electrophoresis on polyacrylamide gel in SDS-PAGE, the serine protease has distinct bands of 32 and 42kDa and less pronounced band of 64 kDa and 68kDa. In the same conditions the aspartic protease shows bands of 41, 46 and 57 kDa. The serine protease presents an optimum pH of 7.5 using N-Succinyl-Ala²-Pro-Phe-pNa as substrate. The ability of the extract to coagulate milk was tested in cheese making by producing cheese using the crude extract obtained with solution NaCl 5% and pic3 from the ion exchange chromatography on Q - Sepharose in buffer sodium phosphate. The physic-chemical and sensory parameters of the cheese were compared with cheese obtained by using rennet and show that the proteases extracted by the mesocarp of *Balanites Aegyptiaca* can replace rennet in cheese production after purification of the extracts.

INTRODUCTION

Pour des raisons de coût et d'approvisionnement de la présure, la hausse de la production mondiale du fromage, aujourd'hui on fait appel à des présures végétales en technologie fromagère. Dans certaines régions d'Afrique, l'abattage des jeunes ruminants, source de présure est proscrite afin de préserver le cheptel et l'augmentation de la demande du marché des produits végétariens conduit aux industries agroalimentaires de chercher des substituts de la présure capable d'être utilisés en fromagerie.

L'utilisation de la présure végétale est répandue tout autour du bassin Méditerranéen dans les pays tels que l'Espagne, le Portugal ou l'Italie avec l'utilisation des extraits coagulants des plantes comme le chardon, l'artichaut et le gaillet ⁽⁷⁹⁾ mais aussi en Afrique avec le fruit des arbres comme le *Balanites aegyptiaca* ⁽⁵⁸⁾.

Le *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile (Balantiaceae, alt-Zygophyllaceae) est un arbre des zones sahéliennes, soudano-sahéliennes et répandu dans la partie septentrionale du Cameroun. Localement, l'extrait des fruits de *Balanites aegyptiaca* est utilisé pour épaissir les bouillies faites à base du lait. Les travaux précédemment effectués sur ce fruit ont montré que son mésocarpe contient des substances susceptibles de coaguler le lait ⁽⁵⁸⁾. L'extrait de ses fruits n'est pas toxique, ne contient pas de germes sulfito-réducteurs. Toutefois, les fromages obtenus avec cet extrait bien qu'acceptables, présentent un arrière goût amer. Ce fruit peut aussi jouer un rôle important dans la transformation laitière locale en raison de sa disponibilité dans l'environnement. De plus, il pourrait être d'un intérêt économique important sur le marché local ou il est surtout vendu pour être consommé comme 'bonbon'. La fabrication des fromages avec l'extrait des fruits de *Balanites aegyptiaca* peut ouvrir la voie pour sa valorisation en fromagerie tout en contribuant à réduire la pauvreté, en ajoutant une plus-value au revenu des paysans.

L'objectif principal de ce mémoire de stage est de purifier l'extrait du mésocarpe pour déterminer les caractéristiques enzymologiques et physico-chimiques de la ou des protéases coagulantes qui peuvent être utilisées en fromagerie.

La première partie rapporte l'étude bibliographique sur le lait, la coagulation du lait, la technologie fromagère, les extrait coagulants ; l'analyse biologique et écologique et l'utilisation des fruits du *Balanites aegyptiaca*.

La deuxième partie, Matériel et méthodes décrit toutes les techniques ayant permis la mise en œuvre de cette étude.

Dans la partie Résultats et Discussion, le premier chapitre rassemble les résultats obtenus suite à l'extraction de l'extrait du mésocarpe. L'extrait brut aqueux du mésocarpe des plantes de *Balanites aegyptiaca* a une composition complexe constituée d'un mélange de tanins, sucres, protéines et autres substances. Par ailleurs, le fruit de *Balanites aegyptiaca* possède un goût sucré et amer et les fromages obtenus à partir de l'extrait de ce fruit ont présenté un arrière-goût amer. Au regard de ce constat, la purification de cet extrait coagulant est nécessaire afin de séparer des tanins ; des polyphénols et d'autres substances pouvant interférer dans l'activité coagulante.

Cette étape a permis d'isoler et d'identifier deux protéases responsables de l'activité coagulante, une protéase de type aspartique et une protéase à serine. Quelques unes de leurs caractéristiques physico-chimiques ont été mise en évidence, telles que la masse moléculaire, les points isoélectriques. Certaines de leurs propriétés enzymatiques ont également été déterminées telles que le pH optimum d'activité et la spécificité. La deuxième partie de résultats présente la possibilité d'utilisation de cet extrait de *Balanites aegyptiaca* en technologie fromagère.

PARTIE 1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : LE LAIT ET SA COMPOSITION

Le lait est la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur.

Le lait a été défini lors du premier Congrès international pour la répression des fraudes à Genève, en 1908, comme le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et être exempt de colostrum. ⁽¹⁾

1.1 Caractéristiques physico - chimiques du lait de vache

a. Constantes physiques du lait

Le lait de vache est un liquide opaque de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotène de sa matière grasse. Sa saveur est douce et son odeur faible, mais identifiable. Le pH du lait est voisin de la neutralité, il présente des caractéristiques liées à sa nature biologique, à savoir: la variabilité, la complexité, l'hétérogénéité et l'altérabilité. ⁽²⁾

Le lait constitue un milieu aqueux caractérisé par quatre phases: ⁽³⁾

- une émulsion de globules gras composée des triglycérides, les matières insaponifiables, les vitamines liposolubles ;
- une suspension colloïdale de matières protéiques contenue dans un sérum ;
- Ce lactosérum est une solution neutre qui contient principalement du lactose, les vitamines hydrosolubles et les sels minéraux ;
- la phase gazeuse qui renferme du gaz carbonique et de l'oxygène dissous.

Le lactose et le sodium avec d'autres minéraux (potassium et chlore) présentent la caractéristique commune d'être osmotiquement actifs. Leur niveau de sécrétion par la mamelle détermine donc la sortie d'eau des cellules vers la lumière des acini sécrétoires, c'est-à-dire le niveau de production laitière. Les principales constantes physiques du lait sont reprises dans le Tableau (1).

Tableau (1) : Constantes physiques du lait

Constantes	Moyennes	Valeurs extrêmes
Energie		
(kcal/litre)	701	587-876
(MJ/litre)	2 930	2 454-3 662
Densité du lait entier à 20 °C	1,031	1,028-1,033
Densité du lait écrémé	-	1,036
Densité de la matière grasse	-	0,94-0,96
pH à 20°C	6,6	6,6-6,8
Acidité titrable (°Dornic) a	16	15-17
Point de congélation (°C)	-	-0,520-0,550
Chaleur spécifique du lait entier à 15 °C	0,940	-
Chaleur spécifique du lait écrémé à 15 °C	0,945	-
Tension superficielle du lait entier à 15 °C (dynes/cm)	50	47-53
Tension superficielle du lait écrémé à 15 °C (dynes/cm)	55	52-57
Viscosité du lait entier à 20 °C (centipoises)	2,2	-
Viscosité du lait entier à 25 °C (centipoises)	1,8	1,6-2,1
Viscosité du lait écrémé à 20 °C (centipoises)	1,9	-
Conductivité électrique à 25°C (siemens) b	45×10^{-4}	$40 - 50 \times 10^{-4}$
Point d'ébullition (°C)	-	100,17- 100,15
Potentiel d'oxydoréduction	0,25 V	+0,20-+30
Point de fusion des graisses (°C)	36	26-42

a = 1° D = 0, 1 g d'acide lactique/litre

(4)

b = Autrefois mhos

b. Composition chimique

Le lait est composé de quatre éléments majeurs : Protéines, Lipides, Glucides et Sels minéraux. Et plusieurs éléments mineurs: Vitamines, Oligo-éléments, Gaz dissous, Lécithine,

Enzymes, Nucléotides. Certains d'entre eux jouent un rôle en raison de leur activité biologique

TABLEAU (2) Composition moyenne des principaux constituants du lait de vache (g/litre)

Constituants	Moyennes
Matières azotées	34
Lactose	48
Matières salines	9
Extrait sec dégraissé	91
Matières grasses	37
Extrait sec total	128
Eau libre (solvant) et liée	902
Lait entier	1 030

(8)

➤ **Matières azotées et protéines**

Les matières azotées, protides ou protéines du lait constituent un ensemble complexe (9) dont la teneur totale avoisine 35 g/litre. Ce taux est élevé en comparaison des quantités présentes dans le lait de femme (environ 12 g/litre).

Les protéines représentent 95 pour cent environ des matières azotées et sont constituées soit d'acides aminés seulement (β -lactoglobuline, α -lactalbumine), soit d'acides aminés et d'acide phosphorique (caséines α et β -) avec parfois encore une partie glucidique (caséine κ). Une vingtaine d'acides aminés interviennent dans la composition de ces protéines, leur séquence conférant à chaque protéine des propriétés propres. C'est sur la base de la précipitation à pH 4,6 (20°C) qu'on sépare deux constituants: la ou plutôt les caséines (α , β , γ et κ) et les protéines solubles ou protéines du lactosérum (tableau 3) ⁽¹⁰⁾

TABLEAU (3) Composition moyenne et distribution des protéines du lait de vache

Protéines	Moyennes absolues (g/litre)	Moyennes relatives (%)
Protides totaux ou matières azotées totales	34	100
Protéines	32	94
Protéines non solubles ou caséine entière	26	82
caséine α	12,0	46
caséine β	9.0	35
caséine κ	3.5	13
caséine γ	15	6
Protéines solubles	6	18
α –lactoglobuline	2,7	45
β –lactalbumine	1.5	25
Sérum-albumine	0,3	5
Globulines immunes	0,7	12
Protéoses peptones	0,8	13
Substances azotées non protéiques	2	6

(11)

En outre, il existe dans le lait une fraction dite protéose-peptone qui présente des caractéristiques intermédiaires. Cette fraction est riche en glucides (11 pour cent de sa composition) et ne précipite pas comme les autres protéines solubles lors du chauffage à 100 °C suivi d'une acidification à pH 4,6. Cependant, cette fraction protéose-peptone fait partie des protéines sériques. Comme le lait humain, le lait de vache contient une fraction azotée non protéique (environ 5 pour cent), mais en valeur absolue elle est plus faible (0,15 g N/litre).⁽¹²⁾

Les Caséines

La caséine entière (groupe protéique qui précipite à pH 4,6 à 20°C) représente environ 80 pour cent des protéines totales du lait de vache (contre 30 pour cent dans le lait humain). Les caséines sont des polypeptides phosphorés associés surtout à des constituants minéraux, en particulier le calcium, mais aussi le phosphate, le magnésium et le citrate, de manière à former des micelles de phosphocaséinate de calcium. En mélange, elles constituent entre elles des complexes qui ne réunissent en l'absence de calcium qu'un petit nombre de molécules. En présence de calcium, le degré d'association est très élevé et les unités formées agrègent plusieurs milliers de molécules, constituant les micelles de caséine native dispersées la phase hydrique du lait (diamètre variant de 100 à 250 µm). Cette configuration spatiale permet aux enzymes hydrolytiques (carboxypeptidases) une digestion plus aisée.

Les caséines ont un caractère acide marqué. Sur gel de polyacrylamide, on peut séparer quatre composants principaux au sein des caséines: α (α S0, α S 1, α S2). La composition moyenne des micelles de caséine bovine (constituants protéiques ou minéraux est donnée au (tableau 4). Ainsi, l'ensemble de ces caractéristiques physico-chimiques conditionnent en partie la digestibilité du lait ^(13,14)

TABLEAU (4) Composition moyenne des micelles* de caséine bovine (g/100 g d'extrait sec)

Constituants	Moyennes
Constituants protéiques	92
Caséine α S1	33
Caséine α S2	11
Caséine κ	11
Caséine γ	4
Constituants minéraux	8,0
Ca ⁺⁺	2,9
Mg ⁺⁺	0,1
Ions phosphate	4.3
Ions citrate	0.5

* Teneur en eau de la micelle: 65 pour cent.

(15)

Protéines solubles ou protéines du lactosérum

Les protéines solubles représentent environ 20 % des protéines totales du lait de vache (alors que, dans le lait maternel, plus de 70 pour cent de l'apport protéique est solubilisé dans cette fraction) ⁽¹⁶⁾. Elles flocculent difficilement en présence d'acide ou de présure. Par contre, à l'exception des protéoses peptones, elles sont dénaturées par la chaleur et sont entraînées lors de la coagulation de la caséine sous l'action de la présure. Un chauffage à 80 °C pendant une minute en dénature environ 20%, mais, lors de la pasteurisation HTST (72 °C pendant 15 à 20 secondes), la dénaturation est négligeable. Ces protéines ont une valeur nutritionnelle importante qui n'est pas modifiée par le chauffage. Cette fraction protéique est complexe. Son constituant essentiel (50-55%) est la β -lactoglobuline bovine, totalement absente du lait humain. Son rôle n'est pas connu.

La deuxième protéine soluble (20-25%) du lait bovin est, par ordre d'importance, l' α -lactalbumine. Elle est présente dans le lait de tous les mammifères qui sécrètent du lactose puisque cette protéine est partie intégrante de l'enzyme de synthèse du lactose. Parmi les protéines solubles restantes (20-30% de cette fraction), certaines, comme la sérum-albumine, ont une faible valeur nutritionnelle; d'autres comme les immunoglobulines et la lactoferrine n'en ont pas du tout. Le taux de lactoferrine (ou lactotransferrine) est très bas dans le lait mature de vache (0,2 g/litre), mais élevé dans le colostrum bovin (5 g/litre) et à des valeurs comparables à celles du colostrum humain (de 5 à 15 g/litre). La lactoferrine bovine est nettement plus saturée en fer que la lactoferrine humaine (environ 30 pour cent contre 5 pour cent) et ce fer lié est peu biodisponible pour l'absorption digestive tant chez l'enfant que chez l'adulte ⁽¹⁷⁾.

Les protéines du lactosérum ont une valeur nutritive majeure en nutrition humaine, car elles sont riches en acides aminés essentiels. Les teneurs en protéines des laits de vache et de femme sont sensiblement identiques, mais leur aminogramme est différent. En conséquence, lorsqu'une formule lactée adaptée au lait maternel (laits infantiles dits «à prédominance ou enrichis en lactalbumines») est choisie pour alimenter un enfant, les protéines lactosériques induisent dans le plasma du nourrisson un aminogramme tout différent de celui obtenu par l'administration d'un lait de vache non modifié.

Les protéines non nutritionnelles du lactosérum bovin se répartissent en lysozyme et en immunoglobulines sécrétoires A (dont les taux sont 500 fois plus bas que dans le lait humain) ainsi qu'en immunoglobulines G et M (dont les taux sont élevés). Ces deux derniers

types d'immunoglobulines sont transmis en grandes quantités au veau durant la phase colostrale de la lactation. Celles-ci, une fois ingérées, sont passivement absorbées par l'intestin et gagnent la circulation, où elles reprennent leur rôle immunitaire.

➤ Les Lipides

Les termes «matière grasse» et «lipides» ne sont pas synonymes. En effet, la matière grasse obtenue par des moyens mécaniques (produit de l'écémage obtenu par centrifugation) représente le contenu du globule gras. De ce fait, elle ne contient pas les lipides polaires ou complexes (phospholipides, etc.), mais contient par contre, des composés liposolubles qui ne sont pas des lipides au sens strict et que l'on nomme «substance lipoïdique». Il s'agit essentiellement d'hydrocarbures (dont le carotène), d'alcools (dont le cholestérol, tocophérol (vitamine E) et de vitamines liposolubles (A, D, K). Cette fraction lipidique encore appelée insaponifiable regroupe donc des composés variés et nombreux qui, en raison de leur importance et de leur rôle, seront envisagés séparément, même s'ils ne représentent pas même 1 pour cent de la matière grasse totale du lait. Les lipides (fraction saponifiable) constituent donc l'essentiel de la matière grasse (>98 pour cent). Le tableau (5) détaille à la fois la teneur (par 100 g de matière grasse) et la (ou les) localisations) principale(s) des lipides du lait.

TABLEAU (5) Constituants lipidiques du lait de vache et localisation dans les fractions physico-chimiques (g/100 g de matière grasse)

Constituants lipidiques	Proportions	Localisation,
Triglycérides	96-98	Globule gras
Diglycérides	0,3-1,6	Globule gras
Monoglycérides	0,0-0,1	Globule gras
Phospholipides	0,2-1,0	Membrane du globule gras et lactosérum
Cérébrosides	0,0-0,08	Membrane du globule gras
Stérols	0,2-0,4	Globule gras
		Membrane du globule gras et lactosérum
Acides gras libres	0,1 -0,4	Membrane du globule gras et lactosérum
Esters du cholestérol	Traces	Membrane du globule gras
Vitamines	0,1-0,2	Globule gras

(18)

De tous les composants du lait de vache, les lipides sont ceux qui, quantitativement et qualitativement, varient le plus. Les taux moyens précisés dans la littérature (35 g/litre) peuvent être retenus en pratique industrielle lorsque le lait est un mélange provenant de plusieurs animaux.

➤ Les Glucides

Le lactose, disaccharide composé de glucose et de galactose, est le seul glucide libre du lait présent en quantités importantes (de 45 à 50 g/litre). Il est synthétisé par la glande mammaire au départ du glucose prélevé dans le sang. Sa faible contribution à l'apport énergétique du lait (30 pour cent), ne fait pas de ce dernier un aliment équilibré en termes de répartition calorique (les recommandations théoriques prônent un apport de 50 à 60% de calories glucidiques). Le lactose joue un rôle nutritionnel particulier et intervient également comme élément de fermentescibilité. Il peut être hydrolysé par les acides forts, mais surtout par le lactase. De par sa fonction aldéhyde, il peut réagir avec diverses substances azotées. Cette réaction, avec des résidus de Lysine notamment, fait partie des réactions de Maillard (brunissement du lait chauffé à température de stérilisation classique). La saveur sucrée du lactose est faible; lorsqu'on impute au saccharose une valeur arbitraire de 100%, celle du lactose atteint environ le tiers (de 27 à 39%). Le lait contient une cinquantaine d'oligosaccharides bien répertoriés présents à l'état libre, mais en quantités souvent négligeables (0,1 g/litre).

➤ Les éléments minéraux

Tous les éléments minéraux ne se retrouvent pas à l'état dissous. Une partie se trouve à l'état colloïdal, une autre est dissoute dans la phase aqueuse et une dernière se retrouve sur des protéines diverses et à la périphérie des globules gras⁽¹⁹⁾. Le phosphore et le calcium sont les deux éléments qui forment l'essentiel de la partie minérale-colloïdale. Les 2/3 du calcium et plus de la moitié du phosphore font principalement partie du complexe phospho-caséinate de calcium.

➤ **Les vitamines**

Toutes les vitamines connues sont présentes dans le lait de vache. Les diverses techniques de traitement du lait peuvent en modifier sensiblement les taux, surtout pour la vitamine C ⁽²⁰⁾.

Les vitamines hydrosolubles : Ces vitamines se trouvent dans le colostrum à des taux transitoirement (environ 14 jours) deux fois plus élevés que dans le lait mature avant d'atteindre des taux stables. Dans le lait de vache, la thiamine (vitamine B₁) est en partie libre et en partie liée aux protéines ou phosphorylée. Elle est ainsi vulnérable à la chaleur (chauffage prolongé à haute température), mais résiste à des chauffages forts (145-150 °C) et en quelques minutes.

c. Valeur énergétique du lait

La teneur énergétique du lait de vache oscille habituellement entre 650 et 720 kcal/litre, et dépend surtout de la teneur en matières grasses. ^(5, 6, 7)

CHAPITRE 2 : LA COAGULATION DU LAIT

2.1 GENERALITES

La coagulation du lait correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine du lait. Dans la pratique, cette déstabilisation est réalisée de deux manières :

- Par voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes, en particulier la présure,
- Par voie fermentaire à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains).

Les mécanismes d'action de ces deux agents coagulants au niveau de la micelle sont très différents. Bien qu'ils conduisent tous deux à la formation d'un coagulum (gel ou caillé), les propriétés rhéologiques de ce dernier restent caractéristiques du mode de coagulation. L'aptitude à l'égouttage, dont dépendent les caractéristiques physico-chimiques du fromage non affiné, est déterminée également de façon spécifique.

2.2 MECANISMES DE LA COAGULATION

1. *Le substrat spécifique intervenant dans la coagulation*

Le substrat spécifique intervenant dans la coagulation du lait est constitué par les protéines, essentiellement représentées par les caséines. Nous avons vu précédemment que ces protéines constituent la phase colloïdale; elles se trouvent pour leur plus grande part à l'état originel dans le lait sous forme de micelles. Les micelles sont des agrégats hétérogènes formés des polymères des différentes fractions caséiniques et associés, sous forme de complexes, à plusieurs sels minéraux dont le plus représentatif est le phosphate de calcium. La forme des micelles est subsphérique : leur diamètre moyen varie entre 30 et 300 μm celui-ci varie avec l'espèce, la race et le stade de lactation et se situe pour le lait de vache entre 80 et 100 μm . La composition des micelles provenant d'une même femelle laitière n'est pas constante ; les petites micelles sont deux fois plus riches en caséine κ que les grosses, leur degré d'hydratation est plus élevé. Entre les mailles du réseau protéique se trouve fixé le phosphate

colloïdal. Cette micelle renfermerait 97 % de la caséine totale, 3 % se trouvant à l'état très dispersé dans la phase aqueuse.

Une propriété remarquable des micelles de phosphocasinat de Ca est leur grande stabilité vis-à-vis des traitements thermiques et mécaniques, relativement énergiques. L'état colloïdal résiste donc bien à des opérations de transformation comportant des transferts et des variations de température modérées. Sous réserve de quelques précautions, il n'est pas altéré par une conservation de longue durée.

Plusieurs facteurs contribuent à conférer aux micelles leur stabilité : les principaux sont leur charge électrique, leur degré d'hydratation et leur charge minérale.

- La charge électrique des micelles du lait frais est fortement négative ; ce caractère résulte de la présence de nombreux groupements COO^- correspondant aux acides dicarboxyliques constituant en particulier la caséine κ . Les micelles peuvent être assimilées à de gros ions chargés négativement, leur dispersion dans le lactosérum résulte de la forte répulsion électrostatique qui s'exerce entre particules voisines.
- Le degré d'hydratation des micelles est élevé : 1 g de protéines fixe environ 2,5 g d'eau. Ce caractère très hydrophile de la micelle correspond à la présence à sa périphérie d'une couche d'eau liée, étroitement fixée aux protéines, et d'une couche d'eau d'hydratation à structure moléculaire plus lâche, et moins orientée. Ces enveloppes d'eau contribuent à stabiliser fortement la micelle.
- Les sels minéraux, notamment Ca et P, se trouvent dans le lait sous des formes variées que l'on a coutume de classer en formes solubles et insolubles ou colloïdales.

L'équilibre existant dans le lait frais correspondant à la répartition illustré dans la figure (1)

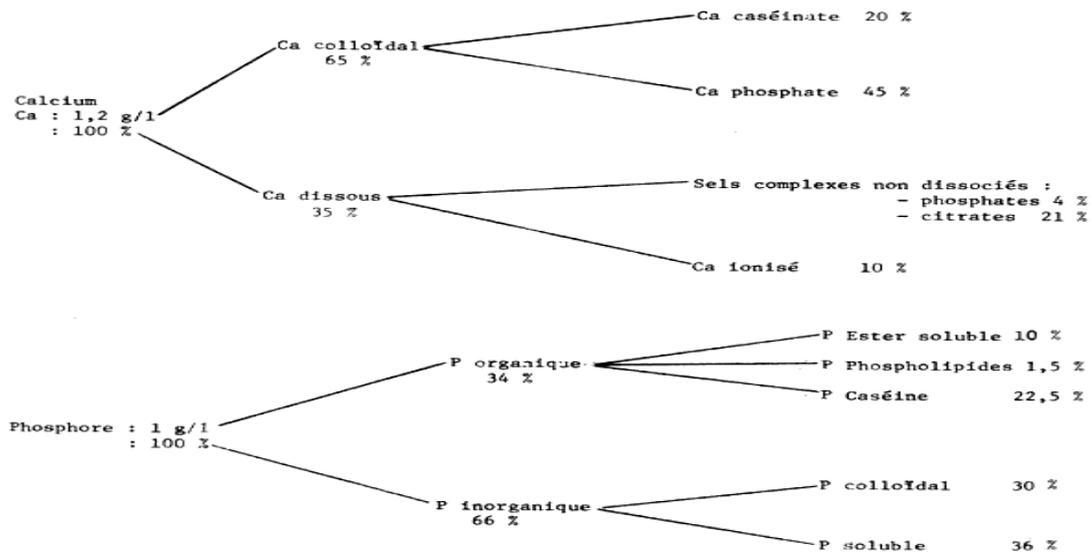


Figure 1 : Equilibre salin du calcium et du phosphore dans le lait frais

2. La coagulation acide

Le mécanisme de la coagulation acide est de nature électrochimique. Quel que soit le processus envisagé, l'acidification entraîne une chute du degré de dissociation des groupements acides COO^- , PO_3H^- du phosphocaséinate de calcium. Les ions H^+ libérés par l'acidification neutralisent progressivement les charges électronégatives : la répulsion électrostatique diminue au fur et à mesure de l'enrichissement du milieu en ions H^+ , puis disparaît. A la température ambiante, les micelles commencent à s'agréger à pH 5,2. Lorsque le pH isoélectrique de la caséine est atteint (pH 4,6), il y a floculation totale.⁽²¹⁾ Si l'acidification intervient sur un lait au repos, il y a formation d'une structure continue occupant tout le volume initial du lait : le gel ou coagulum ; si le lait est en mouvement, il y a apparition d'un précipité baignant dans la phase dispersante.

La coagulation acide est fortement dépendante de la température : pour des températures croissantes du lait supérieures à + 5° C, la floculation apparaît à des valeurs d'acidité de plus en plus basses. Un lait acide peut aussi coaguler de manière imprévue lors du chauffage : il y a donc lieu de contrôler l'acidité avant tout traitement thermique, lorsqu'on redoute cette floculation. Au contraire, une acidification sera souhaitable lorsqu'on réalise la précipitation thermique des protéines comme cela est pratiqué dans plusieurs procédés artisanaux de fabrication de fromages. A l'opposé, pour les températures inférieures à 5° C, la floculation par voie acide ne se fait plus, seule la viscosité du lait s'accroît et il n'est pas possible d'obtenir un gel véritable. En pratique fromagère la température choisie pour la

coagulation est généralement comprise entre 20 et 35° C, elle contribue à une déstabilisation dans des délais raisonnables.

Au cours des fabrications fromagères, l'acidification développée en cours de coagulation et d'égouttage conduit toujours à une déminéralisation plus ou moins poussée du coagulum. Le contrôle constant de cette évolution permet de suivre et de régler la charge minérale du caillé ; cette dernière conditionne directement l'aptitude à l'égouttage et détermine, en grande partie, la composition et l'extrait sec final du fromage.

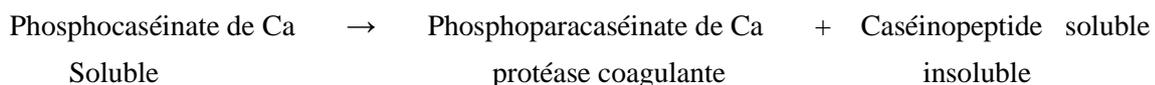
L'acidification du lait accélère plus rapidement la coagulation en présence de la présure ⁽²²⁾. L'acidité développée n'est pas la même pour tous les types de fromages, mais possède pour chacun d'eux une valeur caractéristique qui est déterminée principalement par l'importance de la quantité de lactose transformée et par l'humidité finale du produit, les fromages humides étant généralement plus acides que les fromages secs.

Au plan de la conservation, l'acidification intervient en ralentissant la croissance des micro-organismes intervenant dans l'altération du substrat ; mais cet effet est sélectif. Dans les limites d'acidification observées au cours de la fabrication des fromages, le développement des bactéries est ralenti d'une manière importante.

3. *La coagulation enzymatique du lait*

La coagulation du lait par la présure se produit en deux étapes : une phase primaire, enzymatique et une phase secondaire, agrégation. La coagulation enzymatique a pour conséquence la coagulation du lait sans modification du pH. ⁽²³⁾

Le mécanisme d'action des enzymes coagulantes lors de la coagulation du lait est bien connu. Schématiquement, lors de la réaction d'hydrolyse, un fragment de la caséine, le caséinopeptide est dissocié de la micelle et éliminé dans le lactosérum ; le phénomène peut être résumé comme suit :



A la suite de l'hydrolyse, la caséine κ qui à l'état originel protégeait la micelle de l'insolubilisation, perd ce pouvoir protecteur et provoque une modification de structure et de composition de la micelle qui conduit à la gélification. ⁽²⁴⁾

La perte du pouvoir protecteur est liée au fait que l'hydrolyse prive la micelle des groupements chimiques stabilisateurs présents sur la caséine κ ; il s'agit de fonctions hydrophiles conférant l'hydratation et de fonctions acides apportant la charge électro négative à la micelle et responsables de sa stabilité native.

Le phénomène de coagulation a été largement étudié, il se dissocie en deux phases successives ⁽²⁵⁾ :

- Une phase dite primaire qui correspond à la réaction d'hydrolyse proprement dite de la fraction κ ; elle se traduit par une augmentation progressive de l'azote solubilisé dès l'apport de l'enzyme coagulante au lait. En fin de réaction, lorsque toute la caséine κ a été hydrolysée, la teneur en azote soluble se stabilise à 1,6 % de la teneur en azote total. La réaction primaire est très sensible à la température, elle est très lente entre 0 et 10° C, sa vitesse augmente rapidement aux températures supérieures, elle triple lorsque l'élévation de température est de 10° C.
- Une phase secondaire correspondant à la floculation proprement dite. Cette réaction ne peut se faire que si elle a été précédée par la phase primaire. Elle exige la présence du calcium ionisé et se fait à une température supérieure à 4°C.

Diverses enzymes protéolytiques ont la propriété de coaguler le lait. Elles sont d'origine animale, végétale ou microbienne.⁽²⁶⁾ Outre leur activité coagulante, spécifique sur la caséine, ces enzymes ont une activité de protéolyse générale pouvant se manifester sur toutes les protéines.

4. Les principaux enzymes coagulants du lait

a. Les protéases d'origine animale

- La Présure

La dénomination "présure" est donnée à l'extrait coagulant provenant de caillettes de jeunes ruminants abattus avant sevrage. La présure de veau est l'agent coagulant traditionnellement utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages. Elle contient en réalité deux fractions actives : l'une majeure constituée par la chymosine (80%), l'autre mineure, par la pepsine (20%). La présure est une préparation thermolabile, sa dénaturation est rapide au dessus de 55°C ⁽²⁷⁾

La sécrétion de la chymosine s'arrête au moment du sevrage, elle est transformée en enzyme active par un processus autocatalytique accéléré par les ions H^+ ⁽²⁸⁾. L'activité protéolytique de l'enzyme, qui est sécrétée à l'état d'un précurseur inactif, est accrue considérablement à la suite d'une hydrolyse partielle dans le milieu acide stomacal.

Propriétés de la présure

La chymosine hydrolyse la caséine, et possède une double activité :

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

Comme toutes les enzymes, l'activité protéolytique de la présure est fortement influencée par les facteurs de milieu qui conditionnent à la fois l'état du substrat et son environnement : le pH, la température, la concentration en présure et la concentration en calcium.

- *Influence du pH* : Le pH optimum d'activité coagulante de la présure sur le lait est voisin de 5,5. Au pH du lait frais (pH 6,65), l'activité est modérée. En fromagerie, on a intérêt à acidifier le lait jusqu'à pH 6,4 – 6,5 ; l'activité croît sensiblement, mais cette baisse de pH n'est pas compatible avec tous les types de fabrication, notamment celle des fromages à pâte cuite.

- *Influence de la température* : La température optimum d'activité de la présure se situe à 40–42° C ; en dessous de 20° C, l'activité devient faible. L'inactivation thermique totale de l'enzyme se produit à 65° C.

En fromagerie classique, les températures du lait au moment de l'emprésurage se situent dans la fourchette 20–40° C, et le plus souvent entre 30 et 35° C ; dans cette gamme, des variations faibles de température influencent beaucoup la vitesse de coagulation. Le technicien peut maîtriser facilement, par un contrôle strict de la température, la vitesse et l'importance de l'action de la présure.

- *Influence de la concentration en présure* : Il existe une règle approximative de proportionnalité entre la dose de présure et l'inverse du temps de floculation : plus la dose est forte, plus le temps est court.

- *Influence de la concentration en calcium* : La présence d'ions Ca^{++} est indispensable au déroulement de la phase secondaire. Toute cause susceptible de faire baisser la teneur de ces ions dans le lait entrave la coagulation; ces causes peuvent être :

- naturelles : il existe des laits dits “lents”, très pauvres en calcium, dont le rapport $\frac{\text{Calcium}}{\text{Azote}}$ est inférieur à 0,20 (dans un lait normal ce rapport est égal à 0,23) ;
- artificielles : un traitement thermique sévère insolubilise le calcium ; il est nécessaire de restaurer la charge en ions calciques par un rapport de CaCl_2 lorsque ces laits sont destinés à être coagulés par la présure. L'apport de calcium soluble modifie des équilibres salins vers les formes insolubles, la taille des micelles croît par incorporation de phosphate colloïdal et compense la réduction de la dimension des micelles consécutive à l'insolubilisation des sels par traitement thermique.

L'addition de CaCl_2 provoque en outre une légère baisse de pH favorable à l'action de la présure. Ce phénomène résulte d'un échange entre ions H^+ fixés sur les protéines et le calcium incorporé.

- *Autres protéases 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. Seules les pepsines porcines et bovines présentent un intérêt industriel.

→ La pepsine porcine est une protéase à caractère plus acide que la chymosine, son activité est bonne en milieu acide, mais décroît fortement au-dessus du pH 6,3 ; au pH du lait frais, la coagulation n'apparaît pas. Divers traitements de corrections (augmentation du temps de maturation, de la concentration en CaCl_2) permettent de compenser partiellement cette aptitude coagulante réduite pour la fabrication de fromages à pâtes molles et pâtes pressées non cuites. Ces méthodes ne sont pas applicables aux pâtes cuites. Mélangée à la présure, la pepsine porcine apparaît être d'une utilisation plus large, notamment dans les pays anglosaxons pour la fabrication de fromages acides.

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

La pepsine du poulet a été également expérimentée avec succès dans nombreux pour la fabrication de fromages locaux. ⁽²⁹⁾

b. Les protéases 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. Parmi les espèces européennes, 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, Portugal) ⁽³⁰⁾

D'autres extraits coagulants ont été obtenus à partir de plantes tropicales : les plus connus sont les ficines, extraites du latex du figuier, la papaine, 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 précédemment signalés. L'activité coagulante est d'autre part très variable car elle est fortement influencée par l'état de maturité de la plante et par les conditions de collecte et de stockage. De ce fait, l'emploi de ces protéases coagulantes est toujours resté limité aux aires locales de production. ⁽³¹⁾

Les études menées précédemment sur l'extrait du fruit *Balanites aegyptiaca*, ont permis d'identifier et de caractériser deux enzymes coagulantes selon leur mécanisme d'action.

La protéase aspartique

Les protéases aspartiques sont largement caractérisées et répandues chez les animaux, les plantes, les parasites et virus. ⁽⁸⁰⁾ Elles sont activées à pH acide, et sont spécifiquement inhibées par la pepstatine. Les protéases aspartiques disposent de deux résidus d'acide aspartique qui sont responsables de l'activité catalytique. Donc elles sont capables de couper la liaison Phe105 – Met106 de la caséine kappa bovine comme la chymosine. ⁽⁸¹⁾

La sérine protéase

Les sérine protéases sont l'un des plus grands groupes d'enzymes protéolytiques impliqués dans de nombreux processus de régulation. Dans les plantes, elles sont largement réparties entre les différents groupes taxinomiques.⁽⁸²⁾

Le mécanisme de catalyse des sérine protéases fait appel à une sérine qui est particulièrement réactive. La chymotrypsine catalyse l'hydrolyse du lien peptidique d'une protéine, coupant sur le côté C-terminal des acides aminés à chaînes latérales aromatiques ou hydrophobes (Phe, Trp et Tyr).

c. Les protéases d'origine microbienne

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 l'activité protéolytique généralement très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure. La protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière. Du cheddar préparé par la protéase de *Bacillus subtilis* présentait une saveur acceptable ; cependant, le rendement était très faible suite à une protéolyse excessive.^(32, 33)

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.).⁽³⁴⁾

5. La coagulation mixte

La coagulation mixte est réalisée par l'action conjointe des enzymes coagulantes et de l'acide lactique. Cependant la formation du coagulum se fait généralement sous l'action dominante des enzymes. Cette coagulation nécessite des températures variant de 28 à 32 °C. Les coagulums obtenus ont une teneur en matière sèche comprise entre 42 et 55%, un degré de minéralisation limité (0,2 à 0,3% de Ca), un pH bas entre 4,2 et 4,5⁽³⁵⁾.

CHAPITRE 3 : LA FROMAGERIE

Le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi-dure, dure ou extra-dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine ne dépasse pas celui du lait (REFERENCES CODE ALIMENTARUS / CODEX STAN 283-1978).

Le fromage est le produit obtenu par coagulation du lait suivie d'un égouttage du coagulum dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans tout le globe. La définition « fromage » est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origines exclusivement laitières (lait, lait partiellement ou totalement écrémé, babeurre) utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage. ^(36,37)

3.1 Les principes généraux de la fromagerie

Tout les laits n'ont pas la même aptitude à la transformation fromagère, car ils présentent un certain nombre de caractéristiques différentes (composition en caséines, en matière grasse, qualité hygiénique, pH,...etc.). Afin de s'affranchir des variations de la teneur en protéines des laits, les industriels ont la possibilité de régler le taux protéique des laits à l'aide de différentes techniques : élimination de l'eau par évaporation, concentration par filtration ou par ajout de caseinates. ⁽³⁸⁾

D'une manière générale, le fromage frais commercialisé est fabriqué soit à partir de lait de vache ou de lait de chèvre

La fabrication du fromage comprend trois étapes principalement:⁽³⁹⁾

- emprésurage ou coagulation du lait ;
- égouttage ou déshydratation du gel aboutissant à un caillé;
- affinage ou digestion enzymatique du caillé.

Cette dernière étape n'existe pas dans le cas des «fromages frais» consommés après égouttage. Ces trois étapes sont généralement précédées d'une phase préalable de préparation du lait, l'épuration physique du lait, la standardisation qui concerne les matières grasses et protéiques, l'assainissement du lait et le rééquilibrage en ion.

3.2 La technologie de fabrication des fromages

La diversité des procédés fromagers (types de lait, de coagulation, d'égouttage, cuisson, flore et type d'affinage) permet d'obtenir des produits présentant des caractéristiques texturales et gustatives très différentes. Il existe huit grandes familles de fromages : pâte fraîche, pâte molle, pâte persillée, pâte pressée, pâte dure, pâte filée, les fromages de lactosérum et enfin les fromages salés conservés en saumure. ^(40, 41)

1. *Les fromages issus de la coagulation de la présure*

Ce sont les fromages à pâte pressée. Ils se caractérisent par une coagulation à caractère présure dominant, obtenue par l'utilisation de doses élevées de présure (de 25 à 40 ml de présure au 1/10 000 pour 100 litres de lait) dans des conditions de température favorables à l'action de l'enzyme (de 32 à 40 °C). En outre, le caractère lactique reste très limité par la mise en œuvre de lait fraisensemencé avec de faibles doses de ferments acidifiants (de 0,5 à 1 litre pour 100 litres de lait). Le temps de floculation est court (de 10 à 30 minutes). Ainsi, le calcium et le phosphore restent intégrés dans la « charpente » de phosphoparacéinate de calcium, de sorte que le caillé présente un degré de minéralisation élevé (Ca = 0,6 à 1,2 pour 100 g; P = 0,3 à 0,8 pour 100 g) et, de ce fait, est souple, peu friable et apte à l'égouttage mécanique.

2. *Les fromages frais*

Les fromages frais sont traditionnellement des fromages à égouttage lent, fabriqués à partir de laits ou de crèmes propres à la consommation humaine. Ils résultent de la coagulation à prédominance lactique du lait, combinant souvent l'action des ferments lactiques à celle de la présure. Ces fromages se caractérisent par l'absence d'affinage après les étapes d'égouttage et de moulage. Tous les fromages frais ont une DLC (date limite de consommation) de 24 jours ⁽⁴²⁾. Les fromages frais regroupent des produits très variés en termes de matière grasse (entre 0 et 60% par rapport à l'extrait sec), la matière sèche totale est supérieure à 15%. Ils doivent renfermer une flore vivante au moment de la vente au consommateur ^(43, 44)

Types de fromages frais

Les fromages frais présentent une grande diversité selon le degré d'égouttage du coagulum, la teneur en matière grasse du lait mise en œuvre et les caractéristiques organoleptiques. Les diverses technologies employées permettent de distinguer les catégories de fromages suivantes. ^(45, 46)

- *Les fromages blancs moulés* : Le caillé garde son individualité à l'état de blocs ou de grains. Ces fromages sont généralement moulés à la louche tel que le fromage de type faisselle ou compagne.
- *Les fromages blancs frais à structure homogène* : Ce type comporte les fromages à extrait sec faible et texture onctueuse comme les fromages blancs battus ou lissés et les fromages à extrait sec plus élevé et texture tartinable comme les petits suisses et les « demi-sel » (souvent aromatisés : ail, fines herbes, poivre...etc.).

3.3 Les principaux problèmes en technologie fromagère

La fabrication fromagère repose sur l'utilisation de deux ingrédients complexes et variables : le lait et les ferments. Quant à la présure, son efficacité diminue avec le temps ou dépend des paramètres du milieu. Ces trois facteurs sont à la base même des problèmes de fromagerie auxquels il faut ajouter la complexité, le nombre et la durée des étapes de fabrication ⁽⁴⁷⁾.

L'existence de bactériophages capables de tuer les bactéries lactiques constitue un problème important pour l'industrie fromagère. Le risque le plus élevé d'infection phagique se situe lors de la préparation des ferments, puis lors de l'ensemencement du lait de fromagerie avant la coagulation. Quand les phages deviennent trop abondants dans les ateliers, ils perturbent la fermentation du lait, entraînant une désorganisation de la production. Dans les cas extrêmes, la fabrication peut même devenir impossible, rendant nécessaire un arrêt des fabrications pour une désinfection complète ce qui entraîne des pertes économiques très significatives. ⁽⁴⁸⁾

3.4 Valeur nutritive des fromages

Les fromages sont considérés comme meilleurs aliments en raison de leur valeur nutritive car ils contiennent les protéines sous différentes formes, les matières grasses, le calcium et le phosphore. C'est un aliment à la fois très nutritif pour l'adulte et de croissance pour le jeune, du fait de la présence des protides de valeur biologique élevée et du complexe phosphore-calcium-vitamine D. La teneur en matière grasse du fromage varie fortement tout comme celle des vitamines liposolubles et est comprise entre 40 et 50%.⁽⁴⁹⁾

La valeur biologique des protéines du fromage est un peu inférieure à celle des protéines du lait. Les fromages sont capables dans une large mesure de remplacer le lait, ainsi pour 500ml de lait, il faut approximativement 70g de fromage à pâte dure, 90g de fromage à pâte molle ou 120g de fromage frais.⁽⁵⁰⁾

La qualité des fromages dépend d'un grand nombre de facteurs, liés à la fois à la technologie de fabrication et aux caractéristiques chimiques et microbiologiques de la matière première mise en œuvre^(51, 52).

3.5 La Qualité des fromages

Les composantes de la qualité des fromages sont multiples :

Qualité hygiénique : les matières premières et les aliments qui en sont issus doivent être dépourvus de microorganismes pathogènes, de toxines, de résidus chimiques ou de composants indésirables générés par les procédés.

Qualité nutritionnelle : la concentration relative et la nature des différents nutriments ne doivent si possible pas être trop éloignées des recommandations des nutritionnistes.

Qualité sensorielle : les qualités organoleptiques conditionnent l'appétence et le plaisir que procure la consommation du produit, elles intègrent la couleur, la texture, l'odeur, la saveur et l'arôme.

Ces différentes composantes qualitatives peuvent être appréhendées et évaluées par des méthodes biologiques (analyse microbiologique), physicochimiques (texture, composition) et par des méthodes sensorielles (saveur-arôme)⁽⁵³⁾.

CHAPITRE 4 : DESCRIPTION DE L'ARBRE DE *BALANITES AEGYPTIACA* ET SON FRUIT : LES DATTES DU DESERT

4.1 DESCRIPTION ET BIOLOGIE

Le *Balanites aegyptiaca* (Figure 2) est un arbre épineux à multibranches qui peut s'élever jusqu'à 10 m de hauteur, et 30 à 35 cm de diamètre. Il a une cime arrondie, dense (mais toujours vu à travers) avec de longs gros rameaux; son tronc a une écorce de couleur grise, profondément fissurée longitudinalement. Ses feuilles de couleur vert foncé sont composées et disposées en spirale sur les pousses. ⁽⁵⁴⁾

La floraison varie, Il n'y a pas de temps précis pour la floraison dans le Sahel, bien que la floraison a prend très probablement lieu pendant la saison sèche. La floraison au Nigeria varie entre Novembre et Avril avec la possibilité des fruits de mûrir entre Décembre et Janvier, et parfois plus tard, à partir de Mars jusqu'à Juillet. Ailleurs, la fructification et la production de feuillage se produisent pendant la saison sèche. La pollinisation est probablement réalisée par des insectes comme les fleurs sont parfumées, et la structure des fleurs facilite l'activité des insectes. La première fructification est à 5-8 ans, le rendement de l'arbre peut aller jusqu'à l'âge de 25 ans. Le fruit prend apparemment au moins 1 an à mûrir.

4.2 ECOLOGIE

Le *B. aegyptiaca* dispose d'une large répartition écologique; cependant, il atteint son maximum de développement comme un arbre individuel dans les zones de faible altitude, les zones alluviales, dans le terre sableux et dans des zones avec un accès difficile à l'eau tels que les fonds de vallée, les berges au pied des pentes rocheuses. Il est intolérant à l'ombre et préfère la savane pour la régénération naturelle.

Limites biophysiques

Altitude: 0-2 000 m,

La température annuelle moyenne: 20 à 30 °C,

La pluviométrie annuelle moyenne: 250-1200 mm

Type de sol: Très peu exigeant quant au sol; au Sahel très commun sur les sols sableux, pierreux, argileux et alluviaux. Grande amplitude écologique. En Afrique orientale jusqu'à 1500 m d'altitude. Indique le surpâturage.



Figure 2 : Arbre de *Balanites aegyptiaca*

4.3 LE FRUIT : LES DATTES DU DESERT

Le fruit ; pulpe, graines oléagineuses (Figures 3 et 4) est mangé comme un bonbon et vendu sous le nom de "datte sauvage". Il est légèrement laxatif, fibreux, huileux et contient de la gomme; son goût est doux amer (40% de sucre et 7% de saponine); tombé au sol, il est apprécié du bétail, particulièrement des chèvres. Les noyaux (50% du poids du fruit) contiennent 40% d'huile, ils sont comestibles ou transformables en savon. Les noyaux moulus donnent une sorte de tourteau huileux. C'est pourquoi le *Balanites aegyptiaca* est souvent réduit à des buissons de quelques m de haut près des villages.

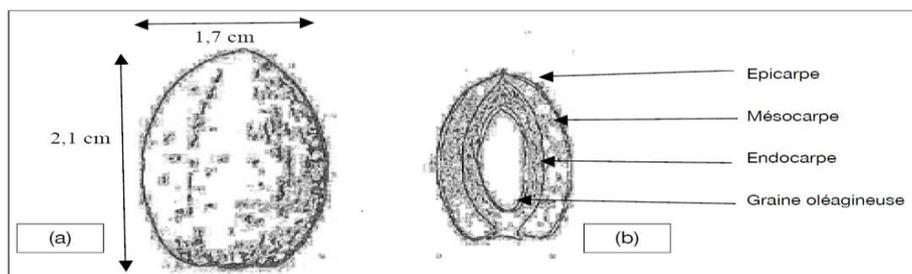


Figure 3 : Schéma du fruit de *B. aegyptiaca*

On note pour le fruit un bon apport glucidique, un apport intéressant et assez équilibré en protéines avec 21.8% d'acides aminés essentiels et un apport faible en lipides. ⁽⁵⁵⁾

Tableau 6 : Valeur nutritionnelle du fruit en % de matière sèche

matière sèche	protéine brut	fibres brutes	cendres	lipides	glucides	calcium	potassium
66,3	11,1	10,2	8,1	1,7	68,9	0,16	0,4

Tableau 7 : Apport protéique du mésocarpe du fruit

Acides aminés essentiels	Arg	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Tyr	Val
Teneur en % de protéines brutes	3,7	1,0	2,8	4,3	2,7	1,6	2,7	3,0	2,2	3,1



Figure 4 : Fruit de *Balanites aegyptiaca*

4.4 UTILISATION

Il est surtout utilisé pour l'alimentation et en médecine par les populations locales et pour l'alimentation du bétail ⁽⁵⁶⁾.

En médecine, le liquide obtenu en pressant le fruit est utilisé traditionnellement pour stimuler la production du lait maternel, il est légèrement laxatif et sert aussi de remède anti-inflammatoire, antiseptique et possède une activité antivirale.

Son bois de couleur jaune clair à jaune brun est dur, lourd, résistant aux insectes et recherché pour les manches d'outils, les coupes et les pieux. C'est un excellent bois de feu et de charbon. Les branches servent aux clôtures. On plante l'arbre dans les haies et les clôtures vives. Dans des conditions extrêmes, il protège encore contre le vent et l'érosion.

Les feuilles sont quant à elles séchées et réduites en poudre utilisable dans différentes sauces ou en fourrage.

Une émulsion des fruits fournit un poison contre les escargots d'eau douce, qui servent d'hôte intermédiaire à la bilharzie, contre les larves de ce parasite, ainsi que contre les mouches Cyclops, vecteurs du ver de Guinée (*Dracunculus medinensis*). On peut ainsi décontaminer les points d'eau, car l'arbre n'est pas toxique pour l'homme et les animaux domestiques.

Distribution Géographique : Tout le Sahel et la savane voisine au Sud, Egypte, Soudan, Afrique orientale, Arabie Pakistan, Inde.

Les pratiques locales d'utilisation de *B.aegyptiaca* pour épaissir le lait permettent de penser que les fruits de cette plante peuvent intervenir dans la fabrication des fromages en coagulant le lait ⁽⁵⁸⁾. Les résultats précédemment obtenus ont permis d'identifier et de localiser la partie possédant le principe actif dans la graine, d'extraire ce principe et de fabriquer des fromages puis de faire des essais de toxicité sur des souris et à procéder au test d'acceptabilité à travers des analyses sensorielles.⁽⁵⁹⁾

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE 1 : METHODES DE PREPARATION

1.1 Macération et extraction de l'extrait à pH basique

La macération et l'extraction de l'extrait ont été effectuées en Tampon Tris – HCl 50mM EDTA 1mM, β -mercaptoéthanol 3mM pH 8,1.

Environ 200g de fruits ont été macérés durant une nuit à 4°C. 500ml de jus ont été recueillis et concentrés par ultrafiltration frontale jusqu'à obtenir 20ml d'extrait brut concentré.

Le schéma ci-dessous illustre les manipulations qui ont été effectuées dans les différents tampons après la concentration de l'extrait brut

200g de fruits + Tampon Tris – HCl 50mM EDTA 1mM, β -mercaptoéthanol 3mM pH 8,1

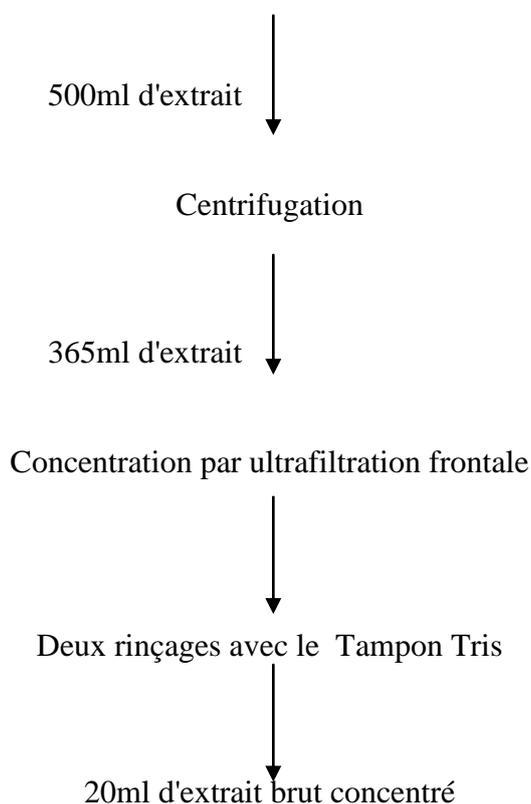


Figure 5 : Diagramme d'extraction à pH basique

1.2 Macération et extraction de l'extrait à pH acide

Le tampon d'extraction utilisé pour l'extraction de l'extrait coagulant est le tampon Phosphate de sodium pH 6. L'homogénat d'environ 400ml est centrifugé à 6000g pendant 10 minutes à 20°C puis le surnageant recueilli constitue l'extrait brut qui est ensuite concentré par ultrafiltration frontale et utilisé pour les différentes analyses.

Illustration des manipulations qui ont été effectués pour en tampon Phosphate de sodium pH 6 extraire l'extrait.

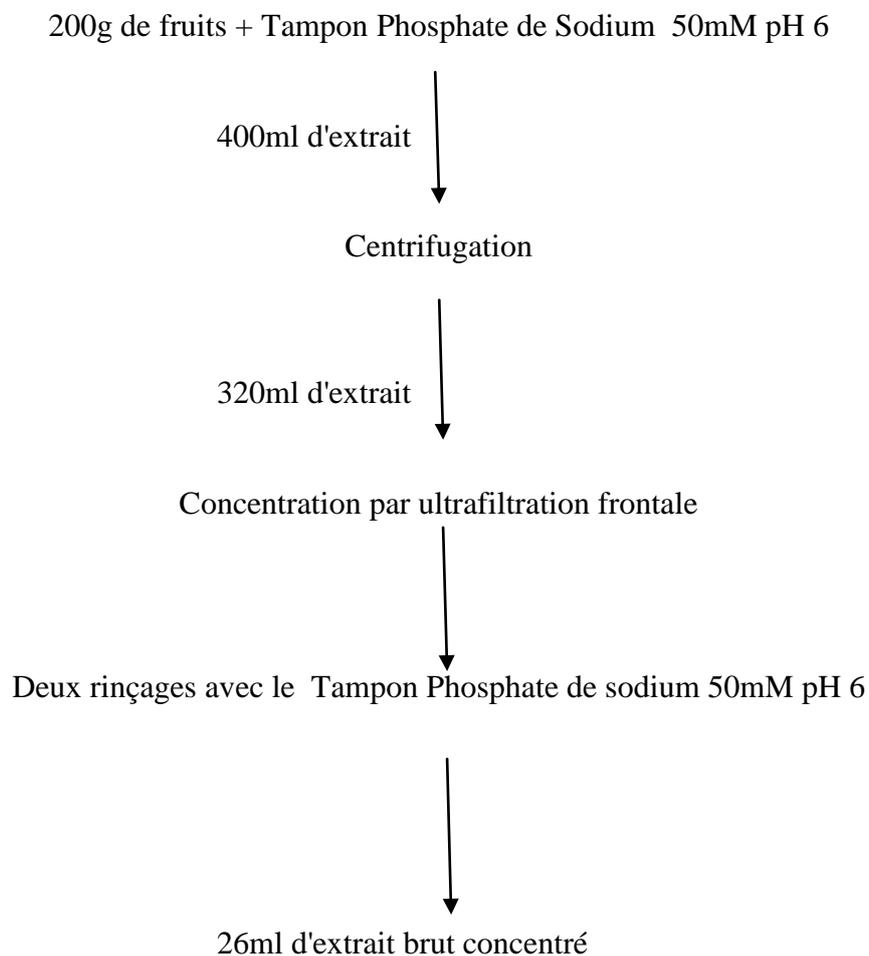


Figure 6 : Diagramme d'extraction à pH acide

1.3 Ultrafiltration frontale

L'ultrafiltration a été réalisée par voie frontale basée sur l'utilisation de la pression. Cette technique permet de concentrer et de clarifier l'extrait en rajoutant régulièrement la solution tampon utilisée pour l'extraction.

Elle a été réalisée grâce à une cellule Amicon ayant une membrane (Millipore) dont le seuil de coupure est de 10000Da et soumise à une pression de 1 Bar sous agitation. L'eau, les ions et les polyphénols sont partiellement éliminés et les protéines sont retenues par la membrane.

1.4 Purification par chromatographie d'échanges d'ions

L'extraction des protéines ou la purification des extraits bruts a été réalisée par la chromatographie d'échanges d'ions sur colonne Q-sepharose Fast Flow dont le principe est décrit dans l'annexe (6). Cette étape a été réalisée à l'aide des appareils Pharmacia Biotech® et ÄKTA®. La résine utilisée est le Q-Sepharose Fast Flow.

- *La purification à pH basique*

La colonne a été équilibrée et lavée en tampon Tris-HCl 50mM EDTA 1mM β -mercapto-éthanol 3mM pH 8,1 durant quelques heures, ensuite 9 ml d'échantillon sont injectés dans la colonne. A pH basique l'élution a été effectuée par plateaux de concentrations en NaCl à savoir 0,15 mol/l, 0,4 mol/l, et 1mol/l.

Les paramètres de l'appareil pendant la chromatographie : le débit a été réglé 0,2 à 0,5 ml/min et la vitesse de déroulement de papier variait de 0.1 à 0.25 cm/min.

- *Purification à pH acide*

La purification en milieu acide a été réalisée en tampon phosphate de sodium 50mM pH 6. 9 ml d'échantillon sont injectés dans la colonne, les premières molécules éluées de la colonne sont celles qui ne sont pas absorbées sur la phase stationnaire (fraction 1). Ensuite, les molécules fixées au gel sont éluées en ajoutant une concentration croissante de NaCl.

Après la sortie du pic 1, les fractions 2 et 3 sont éluées en concentration croissante en NaCl (gradient de concentration) de 0 à 0,35 mol/L. La fraction 4 a été éluée en concentration NaCl 1 mol/L.

1.5 Techniques analytiques

a. Analyses

Détermination de l'activité coagulante

Le pouvoir coagulant des protéases est déterminé par la mesure de l'activité coagulante, cette activité s'exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme employé coagule le lait. La mesure de l'activité coagulante est réalisée grâce au Test de Coagulation ou mesure du temps de coagulation du lait effectué selon la méthode officielle française de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique : station de recherches en technologie et analyses laitières : 12g du lait en poudre sont dissous en fiole jaugée de 100ml avec 0.147g de Chlorure de Calcium (CaCl_2).

Dans des tubes à hémolyse, 200 μL de chaque échantillon ont été mélangés avec 1 ml du lait reconstitué puis incubés à 37 °C dans un bain marie. La durée de coagulation est le temps compris entre le début d'incubation et la formation d'un film de coagulation contre les parois du tube à hémolyse.

Dosage des protéines

La concentration des échantillons en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford comme décrite dans l'annexe (). Dans un tube à essai 100 μl d'échantillon sont mélangés avec 5 ml de solution de Bradford diluée au 1/5. En milieu acide, le Bleu de Coomassie se lie de manière non covalente aux protéines, cette réaction permet la lecture d'absorbance à 595 nm.

b. Électrophorèse

➤ *Electrophorèse en SDS-PAGE*

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu SDS (Sodium Dodecylsulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis ou SDS-PAGE) a été réalisée selon la méthode de Laemmli ⁽⁶⁰⁾ dont le principe est basé sur la séparation des molécules selon leur taille et leur charge électrique dans un champ électrique. Les échantillons (protéines) sont dénaturés à l'aide du SDS et du β - mercaptoéthanol pendant 3 minutes à 95 °C. La migration des échantillons à travers les gels de concentration et de séparation est effectuée à une intensité constante de 35 mA avec voltage limité à 500V. Le gel est coloré avec une solution de bleu de Coomassie (R250) dans un mélange méthanol : acide acétique : eau (5/1/4), puis décoloré dans une solution d'éthanol-acide acétique-eau (2/1/7)

➤ *Electrophorèse en Native – PAGE*

Cette méthode est basée sur la séparation des protéines en fonction de leur charge et est réalisée sans la présence du SDS et le β -mercaptoéthanol. De ce fait la structure tertiaire des protéines est donc conservée.

Les protéines sont condensées dans un gel de concentration puis la migration se fait dans un gel d'acrylamide à 10% sans gradient. La révélation est effectuée dans une solution d'acide trichloroacétique 12.5% et du bleu de Coomassie G250, ensuite le gel est décoloré dans la solution d'éthanol-acide acétique-eau (2/1/7).

➤ *Electrophorèse en SDS-PAGE sur gel en présence de Caséine*

Cette technique à été réalisée sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE contenant la solution de caséine à 0.8% dans les mêmes conditions que le gel en SDS-PAGE selon la méthode de ⁽⁶¹⁾. Après la migration, le gel a été rincé dans deux bains de Triton X 100 pendant une heure à température ambiante afin d'éliminer le SDS, ensuite il a été incubé dans le Tampon Phosphate 50 mM pH 6 pendant deux heures à 37 °C de sorte que les protéases dénaturées au SDS recouvrent leur structure tridimensionnelle et leur activité enzymatique. La coloration et

décoloration ont été effectuées dans la solution Bleu de Coomassie et dans la solution acide acétique-éthanol-eau respectivement.

➤ ***Electrophorèse en Native - PAGE sur gel en présence de Caséine***

Cette technique apporte des informations sur le poids moléculaire des protéases. Le gel est préparé dans la solution de caséine à 0.8%, après la migration il est incubé dans le tampon phosphate pH 6 pendant deux heures puis décolorés dans la solution TCA 12.5% (Acide Trichloroacétique - Bleu de Coomassie G 250) pendant au moins 4 heures. Puis il décoloré dans la solution acide acétique-éthanol-eau.

➤ ***Electrophorèse à pH acide et neutre en Native – PAGE***

Pour détecter l'activité enzymatique de la protéase aspartique, des essais d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à pH acide (4.5) ont été réalisés (Annexes 8.5 et 8.6). Le tampon utilisé dans le gel de séparation était le tampon KOH – Acide acétique. La migration des échantillons est effectuée en tampon β -alanine – acide acétique.

L'électrophorèse en pH neutre est un système discontinu sur gel de polyacrylamide en utilisant comme tampon MOPS, l'ion prépondérant est l'ion K^+ et l'ion secondaire est l'histidine. La technique utilisée est celle décrite par Davies ⁽⁸⁰⁾, avec le pH du gel de séparation 6.8.

Les échantillons ont été dilués avec du tampon glycérol puis déposés dans les puits. Les paramètres d'électrophorèse utilisés étaient en mode courant constant, commencé à partir de 68 V (environ 12mA). Le gel est coloré dans la solution de Bleu de Coomassie R250 et décoloré dans la solution acide acétique-éthanol-eau (1/2/7).

➤ ***Electrophorèse à pH Acide sur gel de Gélatine***

Dans la préparation du gel de polyacrylamide à 10% (p/v), 1% de gélatine a été ajouté au mélange. Après migration électrophorétique, le gel est incubé pendant 2 heures dans le tampon Phosphate pH 6. Le gel est coloré dans la solution de Bleu de Coomassie R250 et décoloré dans la solution acide acétique-éthanol-eau (1/2/7).

c. Etudes des propriétés enzymatiques

➤ *Mesure de l'activité enzymatique avec l'azocaséine*

La mesure de l'activité enzymatique a été réalisée selon la méthode de Sarath *et al.* ⁽⁶²⁾ en utilisant la Sulfanilamide-azocaséine ou azocaséine à 2 % comme substrat (figure 7). Le Sulfanilamide, agent colorant, est libéré lors de l'hydrolyse de la caséine et présente un maximum d'absorbance à 440 nm.

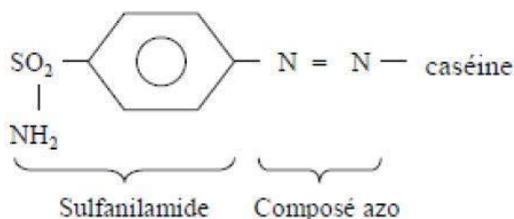


Figure 7 : Le composé Sulfanilamide - azocaséine

Le substrat est une solution d'azocaséine à 2 % préparée dans la solution Tampon Tris-HCl 50mM EDTA 1mM β -mercaptoéthanol pH 8.1 ou dans le tampon Phosphate de Sodium pH 6. La solution doit être clarifiée par centrifugation (12 000g, 10 min). Le substrat et l'enzyme sont ajustés à la température de la réaction. La réaction débute dès que 150 μ L d'enzymes sont ajoutés à 250 μ L de solution de substrat. Le mélange est incubé à 40 °C pendant 1h. Un témoin est préparé en mélangeant 150 μ L de tampon à 250 μ L de substrat. La réaction est arrêtée en ajoutant 1,2 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 %. Un "témoin blanc" doit être préparé en ajoutant dans l'ordre: l'enzyme, le TCA, le substrat. Ce témoin permettra de déterminer l'absorbance au temps zéro. Les tubes sont centrifugés à 8000g pendant 5 minutes. L'absorbance est lue à 440 nm après avoir neutralisé le TCA en ajoutant 1,4 mL de soude 1 M.

➤ *Mesure de l'activité enzymatique avec l'azocaséine inversé*

Cette manipulation a été réalisée de la même façon que la précédente à l'exception du fait que les échantillons purifiés en tampon Tris-HCl 50mM EDTA 1mM β -mercapto-éthanol 3mM pH 8,1 sont manipulés dans la solution Azocaséine - tampon Phosphate de Sodium et

les échantillons purifiés avec le tampon Phosphate de Sodium sont travaillés dans le tampon Tris-HCl 50mM EDTA 1mM β-mercapto-éthanol 3mM pH 8,1

➤ **Détermination de la spécificité de la protéase sur des substrats synthétiques**

• **Le substrat N-Succinyl-dialanyl-Pro-Phe-pNa**

La solution de substrat N-Succinyl-Ala₂-Pro-Phe-pNa, 20mM, est préparée dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO) pur.

Des essais ont été réalisés avec 150 μL d'échantillon, 830 μL de tampon et 20 μL de substrat dans un volume final de 1 mL. Plusieurs pH ont été testés : pH 5 et 5.5 en tampon acétate de sodium 200mM, pH 6, 6.5, 7, et 7.5 en tampon Phosphate de Sodium 50mM et pH 8, 8.5, 9, 9.5 et 10 en tampon Tris-HCl 50 mM EDTA 1mM, β-mercaptoéthanol. L'enzyme coupe la liaison peptidique se trouvant entre la Phénylalanine et la pNa (figure 8) tout comme la liaison peptidique Phe105-Met106 de la κ-caséine présent dans le lait. L'absorbance de la p-nitroaniline libérée est lue toutes les 15 secondes à 410 nm pendant 10 min puis toutes les 5 minutes pendant 45 minutes.

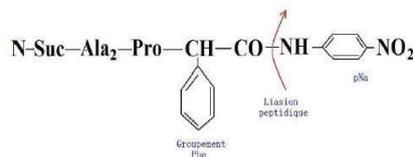


Figure 8 : Formule du substrat N-succinyl-dialanyl-Pro-Phe-pNa

➤ **Détermination du pH optimum**

Le pH optimum a été déterminé à l'aide du substrat N-succinyl-dialanyl-Pro-Phe-pNa avec des tampons préparés à différents pH. Ce sont les tampons Acétate de sodium 200mM, tampon Phosphate de Sodium 50mM et tampon Tris-HCl 50 mM EDTA 1mM, β-mercaptoéthanol 3mM.

CHAPITRE 2 : FABRICATION DES FROMAGES

2.1 Préparation des échantillons

Les fromages ont été préparés avec la présure (fromage de référence) l'extrait végétal des fruits de *Balanites aegyptiaca* et la fraction (Pic 3) issue de la purification par la chromatographie d'échanges d'ions de l'extrait brut concentré en tampon phosphate de sodium.

Environ 200 g des fruits de *Balanites aegyptiaca* ont été pesés puis laissés macérés dans 615 ml de solution de NaCl 5% pendant une nuit à 4 °C. Ensuite les graines ont été triturées et l'extrait obtenu a été centrifugé à 6000g pendant 20 minutes puis filtré à travers le papier filtre. Le filtrat obtenu a été concentré sur membrane Amicon dont le seuil de coupure est de 10 kDa. Après concentration, l' EBC est décoloré au charbon végétal actif (10 %) puis centrifugés à 10000 g, 4°C pendant 1h30 minutes.

2.2 Protocole de fabrication des fromages

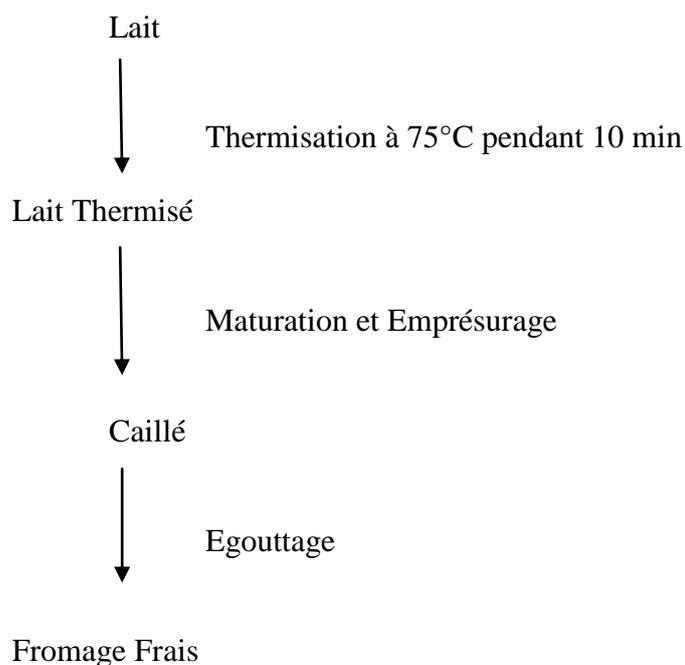


Figure 9 : Diagramme de fabrication des fromages

2.3 Préparation du lait, thermisation et maturation

Le lait utilisé ici a été préparé selon la méthode de l'IDF ⁽⁶²⁾. 36g de lait en poudre de la marque Regilait® ont été dissous dans avec 0.4410g de CaCl₂ dans 300ml de lait qui ont ensuite été pasteurisés puis laissés mûrir par la flore banale pendant 3 heures à la température ambiante.

2.4 Emprésurage

Pour les fromages Présure et Extrait Brut, 100ml de lait thermisé et mûri sont portés à une température de 35 °C etensemencé par 5 mL de présure diluée à 1/1000 (v/v), 8 mL de l'extrait des fruits de *Balanites aegyptiaca* et pour le fromage préparé avec la fraction concentrée issue de la chromatographie d'échanges d'ions avec le tampon Phosphate de Sodium, 50 ml de lait sontensemencés par 6.5 ml de la fraction concentrée. La coagulation des fromages Présure et extrait brut est survenue au bout d'une heure et demie et celle du Pic 3 au bout de 3 heures. Les fromages ont été laissés dans le bain-marie pendant au moins 2 heures pour équilibrer la température.

2.5 Egouttage

Le coagulum est séparé du lactosérum à l'aide d'une gaze compresse stérile et perméable au lactosérum pendant au moins 2 heures d'égouttage à la température ambiante. Le caillé obtenu constitue ainsi un fromage frais et est utilisé pour déterminer quelques paramètres de texture.

2.6 Rendement fromager

Le Rendement fromager est une des données les plus importantes pour une fromagerie. En effet, la quantité de fromage généralement obtenue est faible par rapport à la quantité d'ingrédients mis en œuvre. Le rendement est évalué en établissant le rapport entre la quantité de fromage obtenue et la quantité de lait utilisée. Il est possible d'établir des

rendements basés sur la récupération des composants laitiers, les protéines et la matière grasse. L'humidité finale du produit est le facteur principal du rendement fromager (égouttage), ainsi que la durée d'entreposage du lait ⁽⁶³⁾.

2.7 Mesures Texturales

Les propriétés texturales des fromages obtenus ont été évaluées par la méthode Texture Profile Analysis (TPA). Les analyses de texture ont été réalisées avec un texturomètre TApplus (Lloyd Instruments), texture analyser équipé et piloté par le logiciel NEXYGEN Plus à partir d'un test TPA (Texture Profile Analysis). Les échantillons (7,5 ±0.5 cm de taille) ont été soumis à deux cycles consécutifs de compression – décompression uniaxiale à l'aide d'une sonde cylindrique de 12 mm de diamètre. Les conditions expérimentales de ce test TPA sont rapportées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Conditions expérimentales du test TPA

Pénétration	4 mm
Vitesse de compression1	8 mm
Vitesse retour1	8 mm
Maintient	0 s
Vitesse de compression2	8 mm
Vitesse retour2	8 mm

Quelques propriétés de texturales (dureté, élasticité, adhésivité, force d'adhésion) ont été calculées sur la base des profils obtenus. Le module d'élasticité des fromages obtenus ont été déterminés selon la loi de Hooke pour un solide élastique linéaire.

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

$$\text{où } \sigma = F/S$$

$$F/S = E \cdot \Delta l/l_0$$

$$\sigma = \text{Contrainte}$$

$$\varepsilon = \text{Déformation}$$

$$F = \text{Force (N)}$$

S = Surface de contact de la sonde (m^2)

E = Module d'élasticité (module d'Young) (Pa)

Δl = Allongement du fromage (m)

l_0 = Hauteur initiale du fromage (m)

2.8 Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle comportait un panel d'épreuve et le questionnaire.

- Le panel : Les dégustateurs étaient au nombre de 8 et étaient constitués d'enseignants, techniciens de laboratoire et d'étudiants. Leur âge variait entre 22 et 62 ans.
- L'épreuve : L'épreuve portait sur le test hédonique.

Pendant ce test, les échantillons des fromages présure, extrait brut et Pic3 Phosphate ont été présentés de façon monadique..... pour apprécier sur une échelle de 1 à 9. Chaque dégustation est suivie d'un gargarisme à grande eau afin d'éviter toute interférence de goût et arôme.

Le questionnaire

Fiche d'analyse sensorielle

Identification	Code		Nationalité	Date et Heure	
	Age		Sexe		
	Profession				
	Consommez-vous du Fromage?				
Régularité	Très souvent	Souvent	Rarement	Jamais	
Échelle	Trois échantillons de fromage vous ont présentés, exprimez votre appréciation de chaque fromage suivant l'échelle ci-dessous:				
	1 Déteste extrêmement				
	2 Déteste beaucoup				
	3 Déteste modérément				
	4 Déteste un peu				
	5 N'aime pas, ne déteste pas				
	6 Aime un peu				
	7 Aime modérément				
	8 Aime beaucoup				
	9 Aime extrêmement				
Paramètres sensoriels	Goût	Arôme	Couleur	Texture	Appréciation générale
Fromage A					
Fromage B					
Fromage C					
	Merci pour votre collaboration				

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Extraction de l'extrait coagulant

a. Rendement d'extraction

Le diagramme de base appliqué pour l'extraction de la protéase coagulant le lait se base sur celui utilisé dans les travaux antérieurs réalisés par Beka *et al.* ⁽⁶⁴⁾ qui a démontré que le tampon alcalin permet d'améliorer l'extraction et l'activité coagulante des sérine protéases et de même pour les protéases aspartiques dans le tampon acide. Ce diagramme consiste essentiellement à une macération du mésocarpe des fruits de *Balanites aegyptiaca* dans une solution de tampon soit à un pH acide ou à un pH alcalin. L'extrait brut obtenu après filtration sur papier filtre du macéras est clarifié par centrifugation puis concentré par ultrafiltration frontale.

Par la suite, la purification des extraits a été réalisée grâce à la chromatographie d'échanges d'ions sur colonne Q – Sepharose Fast Flow. ⁽⁶⁴⁾

Le rendement d'extraction des extraits a été calculé à partir des protéines totales :

$$\text{Rendement d'extraction} = \frac{\text{Protéines (mg) d'EB}}{\text{Protéines (mg) d'EBc}}$$

Pour 200g de fruit de *Balanites aegyptiaca*, le rendement d'extraction est 17 pour l'extrait obtenu en tampon Tris – HCl 50mM EDTA 1mM, β-mercaptoéthanol 3mM pH 8,1 et l'extrait obtenu en tampon phosphate de sodium pH 6 correspond à 16,9 (Tableaux 9 et 10).

L'activité coagulante est exprimée en Unité coagulante. L'unité coagulante a été définie comme étant la quantité d'enzyme permettant la coagulation de 1 ml de lait en 60 minutes à 40°C.

$$\text{Unité coagulante (U)} = \frac{60 \times 1}{\text{tdc (min)}}$$

L'activité spécifique de l'enzyme a été coagulée avec la relation suivante :

$$\text{Activité spécifique} = U \times \frac{1}{[\text{Protéines}]}$$

Et est exprimée en Unité coagulante par milligramme de protéines

Tableau 8 : Extrait obtenu à pH alcalin

	Protéines (mg/ml)	Activité coagulante (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)	Activité totale (U.ml)	Rendement d'extraction
EB	0,30	1.65	1,1	33	17
EB-concentré	5,10	10	0,39	200	

Tableau 9 : Extrait obtenu à pH acide

	Protéines (mg/200g de fruits)	Activité coagulante (U/ml)	Activité spécifique (U/mg)	Activité totale [U.ml(t)]	Rendement d'extraction
EB	0,27	1.9	1,39	49.4	16,9
EB-concentré	4,56	15	0,66	390	

b. Effet du pH

Les résultats rapportés dans les tableaux 9 et 10 montrent que l'extrait concentré en tampon Phosphate de sodium a une activité spécifique deux fois supérieure à celle de l'extrait concentré en tampon Tris-HCl 50 mM EDTA 1 mM, β -mercaptoéthanol 3mMpH 8,1 et un de temps de coagulation plus court (20 minutes). Le milieu acide entraîne des transferts électroniques entre l'Asp125 et l'Asp 32 et, c'est pour cette raison que l'extrait obtenu en tampon phosphate de sodium 50Mm pH 6 présente une meilleure activité coagulante malgré une faible concentration en protéines par rapport à l'extrait obtenu en tampon alcalin car ce transfert électronique augmente l'activité des enzymes.

Les travaux réalisés par Faro *et al.*, ⁽⁸¹⁾ sur un extrait coagulant de cellules en suspension de *Centaurea calcitrapa* extraites en tampon Tris - HCl 50mM EDTA 1mM, β -mercaptoéthanol 3mM pH 8,1 ont rapporté une activité spécifique de l'extrait brut à 2,023

L'analyse électrophorétique des extraits bruts et concentrés en SDS – PAGE (figure 10) permet de visualiser leur contenu protéique. Ce profil électrophorétique montre des bandes de 28, 48 et 65 kDa pour l'extrait obtenu en tampon phosphate de sodium et deux bandes de 28 et 43 kDa dans l'extrait à pH alcalin

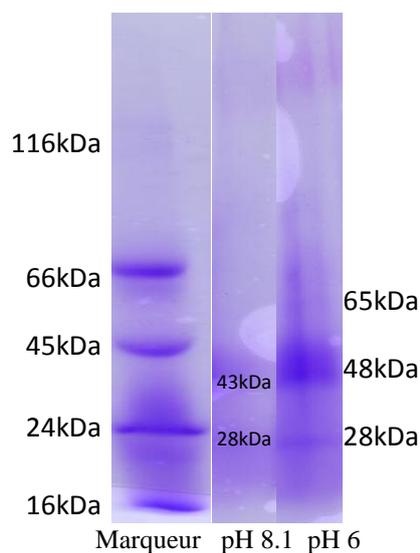


Figure 10 : électrophorèse des extraits en tampon alcalin et acide

3.2 Identification des enzymes coagulantes

Les résultats précédemment obtenus ont permis d'identifier les protéases contenus dans l'extrait du fruit de *Balanites aegyptiaca*.⁽⁵⁹⁾ Ce sont une protéase aspartique et une sérine protéase que nous allons purifier et caractériser avec différentes analyses.

a. Purification de la sérine protéase

➤ Chromatographie d'échanges d'ions

La purification de l'enzyme a été réalisée comme décrite par⁽⁶⁴⁾. Le mésocarpe des fruits de *Balanites aegyptiaca* a été macéré dans le tampon Tris – HCl 50mM EDTA 1mM, β -mercaptoéthanol 3mM pH 8,1 pendant une nuit à 4°C.

L'extrait obtenu a été centrifugé, concentré par ultrafiltration sur membrane de 10 000 Da puis purifié par chromatographie échange d'ions sur Q – Sepharose. Après l'élution par plateaux de concentrations en NaCl, 5 fractions (Pics) ont été obtenus.

La quantification des protéines était réalisée selon la méthode de Bradford (Annexe 5). La sérum-albumine bovine a été utilisée pour la gamme étalon.



Figure 11 : Chromatogramme de la purification de l'extrait en tampon Tris

Les Pics correspondent à chacun des 5 fractions recueillies et concentrées par ultrafiltration frontale jusqu'à obtenir 5,0ml de volume, ensuite ils ont été analysés. Les résultats de ces analyses sont récapitulés dans le tableau 10.

L'activité enzymatique dans les différentes fractions a été déterminée par dosage spectrométrique avec l'azocaséine comme substrat et elle a été définie à partir de la relation suivante :

$$AE = (\Delta A_{440nm}/\text{min}/\text{mg}) = \frac{\text{Variation d'absorbance}}{\text{Temps d'incubation} \times \text{Quantité de protéines}}$$

Tableau 10 : Résultats des analyses des fractions purifiées à pH basique

	EB	EBc	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Pic 4	Pic 5
pH	5,3	7,88	7,96	8,15	8,0	8,1	8,2
Tdc	180min	30 min	265min	245min	pdc	pdc	350min
Protéines (mg/ml)	0,3	5,1	0,78	0,50	0,11	0,05	0,91
Activité coagulante (U/ml)	1.65	10	1.15	1.25	-----	-----	0.85
Activité spécifique (U/mg)	1,11	0,39	0,29	0,5	-----	-----	0,19
Activité enzymatique*10 ⁻³ (ΔA/min/mg)	ND	5	17	19	24	64	1
Activité enzymatique Inversé *10 ⁻³ (ΔA/min/mg)	ND	19	57	43	31	0	1
Facteur purification	de 1	0,35	0,74	1,28	-----	----	0,48

Les résultats rapportés dans le (tableau 10) montrent que seuls les Pics 1, 2 et 5 présentent une activité coagulante. Il faut aussi noter que, dans les travaux antérieurs similaires réalisés sur le fruit de *Balanites aegyptiaca* ⁽⁵⁹⁾, le Pic 1 ne présentait pas d'activité coagulante d'où l'hypothèse de la présence des autres protéines coagulantes dans cette fraction.

Le Pic 2 présente une activité spécifique trois fois plus élevée que le Pic 5 et deux fois plus que le Pic 1 soit 0.5U/mg, 0.19U/mg et 0.29U/mg respectivement. L'activité enzymatique inversée c'est-à-dire réalisée en avec la solution tampon Tris – HCl 50mM EDTA 1mM, β- mercaptoéthanol 3mM pH 8.1, révèle une activité du Pic 2 nettement supérieure à celle du Pic 5 soit 43.10⁻³ ΔA/min/mg et le double de l'extrait brut.

Des électrophorèses en gel de polyacrylamide en présence de SDS, ont été réalisées sur les cinq fractions afin d'identifier les sous unités protéiques et par la suite déterminer leurs masses moléculaires.

La migration en électrophorèse de l'extrait brut concentré et des fractions a été réalisée parallèlement à celles des marqueurs ou protéines témoins de poids moléculaires variables de 16 kDa jusqu'à 116 kDa (Hémoglobine : 16 kDa, Chymotrypsinogène : 24 kDa, Ovalbumine : 45 kDa, Albumine : 66 kDa et β -galactosidase : 116 kDa).

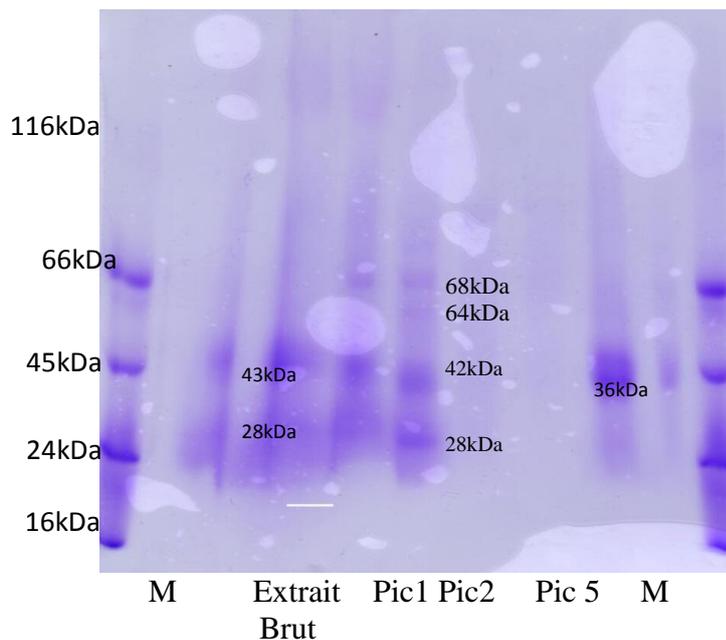


Figure 12 : Electrophorèse en SDS-PAGE

Les résultats obtenus montrent 4 bandes dans le Pic 2. Les bandes de 28, 42kDa sont très prononcées par contre les bandes de 64 et 68kDa sont moins bien prononcées. [REFERENCES Robert] en purifiant l'extrait du fruit de *Balanites aegyptiaca* dans les mêmes conditions a obtenu des bandes de 28, 38, 70, 85 kDa dans le pic 2.

Dans le Pic 5 on observe une bande de 36 kDa, ce résultat confirme la présence d'une protéase aspartique et elle a été inactivée par le pH basique.

La présence des trois bandes (27, 36 et 64kDa) dans le Pic 1 pourrait justifier la présence d'activité coagulante mentionnée précédemment et donc la présence des protéines coagulantes non encore identifiées.

L'électrophorèse réalisée en Native – PAGE, en conditions non dénaturantes permet la migration des protéines en fonction de leurs charges (pHi).

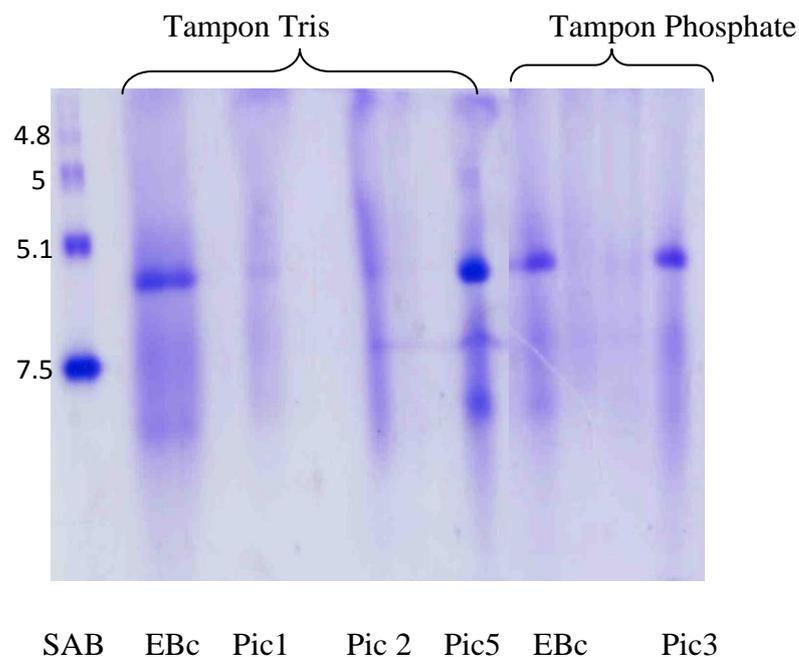


Figure 13 : Electrophorèse Native-PAGE

On observe une bande dans les différents extraits et fractions de tampon Tris et tampon Phosphate ayant un point isoélectrique de 6.

Le Pic 5 - tampon Tris présente plusieurs bandes qui correspondent aux points isoélectriques 5.1, 6 et 7.5

➤ *Détermination du pH optimum de la sérine protéase*

Le pH optimum du Pic 2 (sérine protéase) a été déterminé en utilisant le N-succinyl – dialanyl – Pro – Phe – pNa comme substrat. L'activité protéolytique est maximale à pH 7,5.

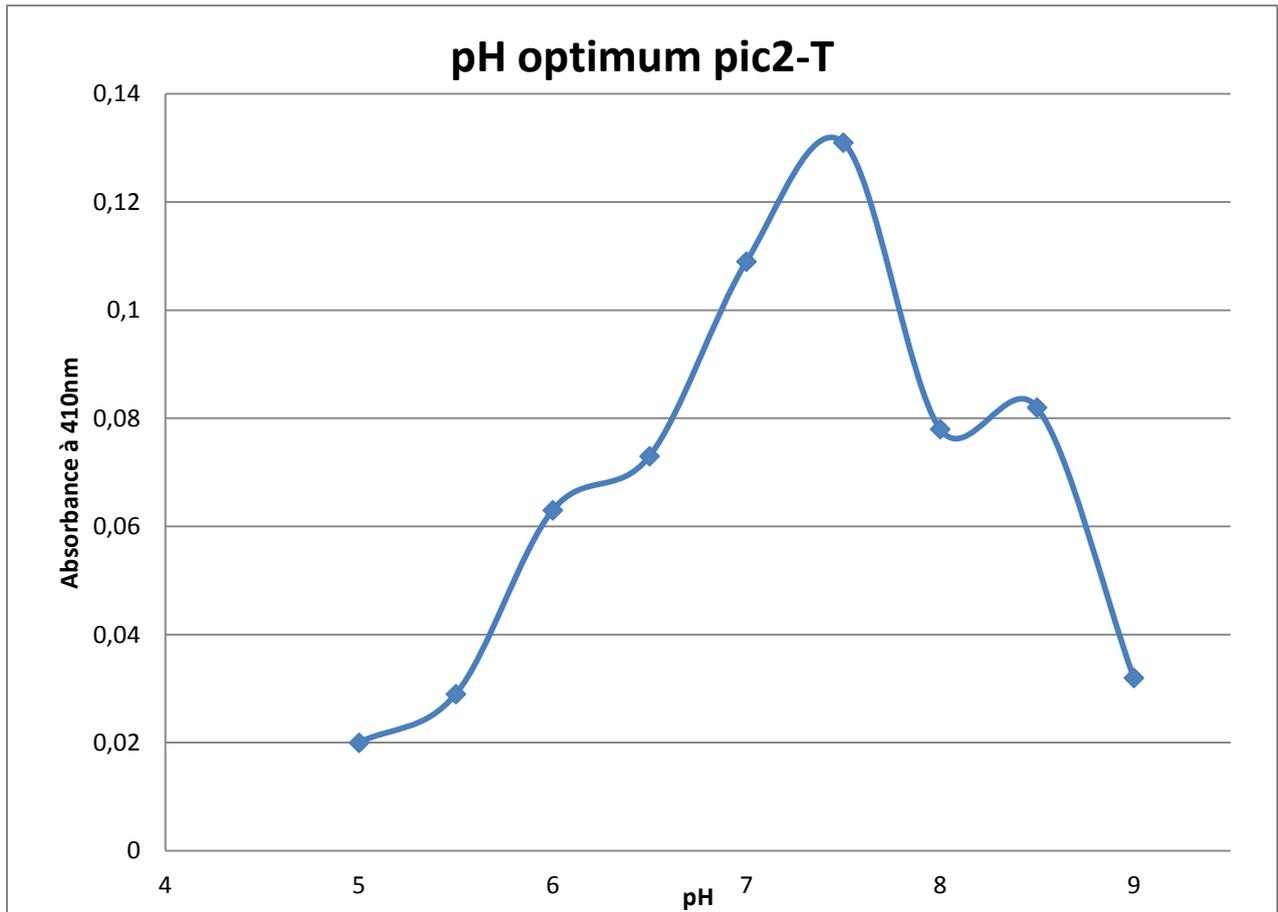


Figure 14 : pH optimum du Pic 2

➤ *Activité du Pic 2 - tampon Tris sur le substrat de protéase à sérine*

Le N-Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa a été utilisé comme substrat pour tester la spécificité de la fraction (Pic 2) contenant la sérine protéase et obtenue par chromatographie d'échanges d'ions sur colonne Q- Sepharose en Tampon Tris pH 8,1.

Le N-Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa est hydrolysé par la chymotrypsine dont la spécificité porte les acides aminés aromatiques notamment la Phénylalanine, la Tyrosine et le Tryptophane (REFERENCES 67)

L'activité obtenue avec ce substrat à pH 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 et 9 (figure 19) suggère que l'extrait coupe la liaison peptidique se trouvant entre la Phénylalanine et la para-nitro-aniline. Ce résultat était prévisible car la coagulation du lait se fait par coupure de la liaison peptidique Phe105-Met106 de la κ -caséine bovine.

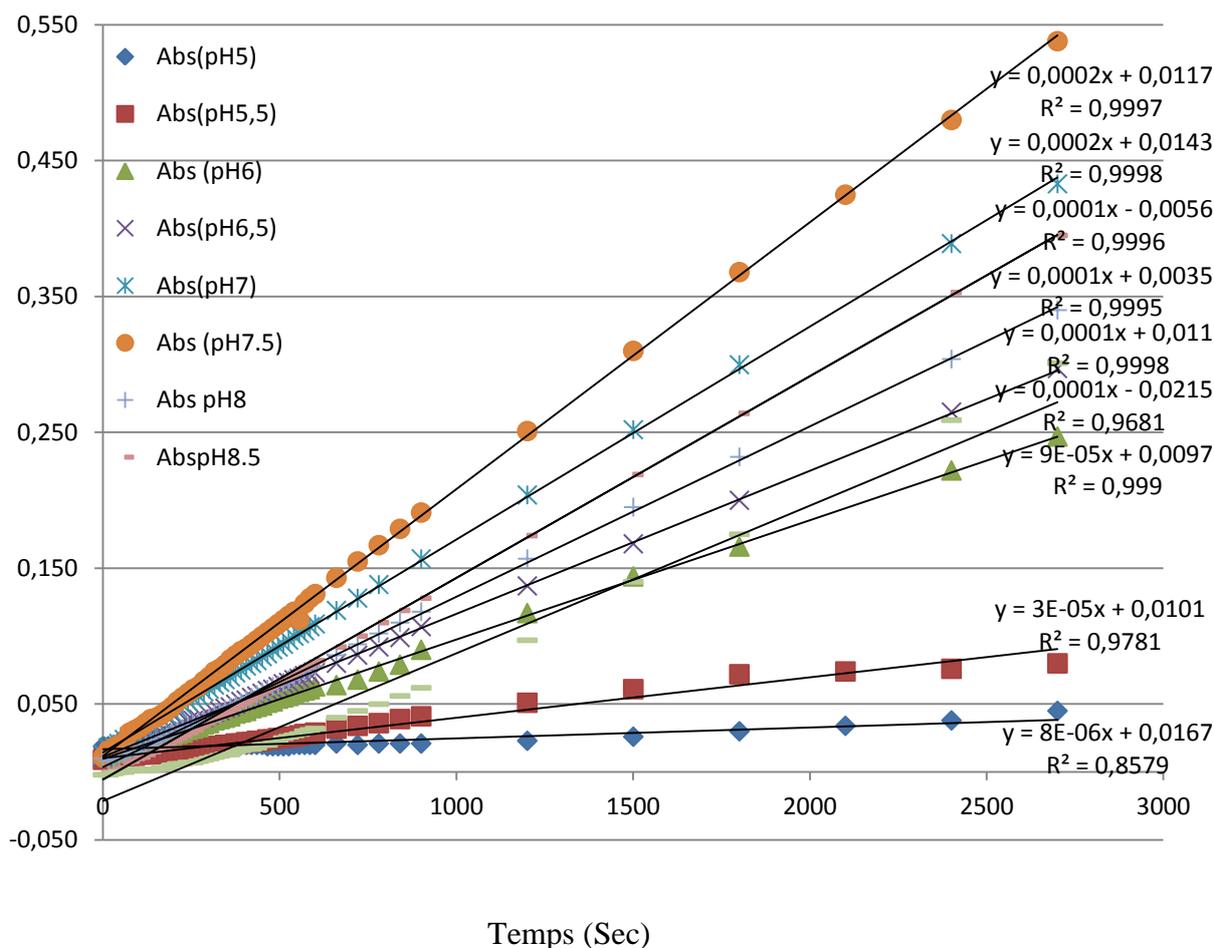


Figure 15: Cinétique d'hydrolyse du N-Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa par la sérine protéase en fonction du pH

La vitesse d'hydrolyse de l'enzyme a été déterminée (tableau 12) grâce à ces courbes et en utilisant la loi de Beer-Lambert. La vitesse initiale a été déterminée grâce à la formule suivante :

$$Vi(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{\Delta\text{Abs}}{\Delta\text{Temps}} \times \frac{1}{\varepsilon \times l \times 10^{-6}}$$

Où ε = coefficient d'extinction molaire de la paranitroaniline avec $\varepsilon = 8250 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l = largeur de la cuve (1cm)

Tableau 12 : Vitesse initiale d'hydrolyse de Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa

pH	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9
Vi (μmol. L ⁻¹ . min ⁻¹)	0.070	0.191	0.630	0.770	1.131	1.420	0.889	1.064	0.816

Ces résultats montrent que l'extrait de *B. aegyptiaca* contiendrait une sérine protéase, or celle-ci hydrolyse le Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa et serait donc spécifique d'une chymotrypsine. Les vitesses d'hydrolyse trouvées en fonction du pH affirment bien que le pH optimum de la sérine protéase de l'extrait du fruit de *B. aegyptiaca* est 7.5

Des essais d'hydrolyse du Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNa ont été réalisés sur la fraction (Pic 5) obtenue par chromatographie échanges d'ions en tampon Tris pH 8,1 et contenant la protéase aspartique à pH 5 et 6, les activités spécifiques étaient mesurables mais faibles de façon significative.

b. Purification de la protéase acide

Des études menées précédemment suggèrent la présence des protéases acides et protéases à sérine, une première extraction réalisée en tampon Tris – HCl 50mM EDTA 1mM, β- mercaptoéthanol 3mM pH 8,1 puis la purification en milieu acide pH 6 n'a pas donné des résultats satisfaisants sur les activités coagulantes et protéolytiques de l'enzyme, c'est pour cette raison qu'une nouvelle extraction et purification par chromatographie d'échanges d'ions sur colonne Q-Sepharose ont été réalisées en tampon phosphate de sodium pH 6 afin de pouvoir identifier et caractériser la protéase acide (la protéase aspartique).

➤ chromatographie d'échanges d'ions

Cette technique a été utilisée pour la purification de l'extrait du fruit de *Balanites aegyptiaca* en tampon phosphate de sodium 50mM pH 6. Le milieu acide permet d'éliminer les impuretés mais aussi améliore l'activité coagulante de l'enzyme par transferts électroniques. L'élution a été réalisée par gradient de concentration en NaCl.

Des essais réalisés en sur colonne Q – Sepharose, chromatogramme figure 15 illustrent l'apparition de trois Pics et tous présentent tous une activité coagulante.

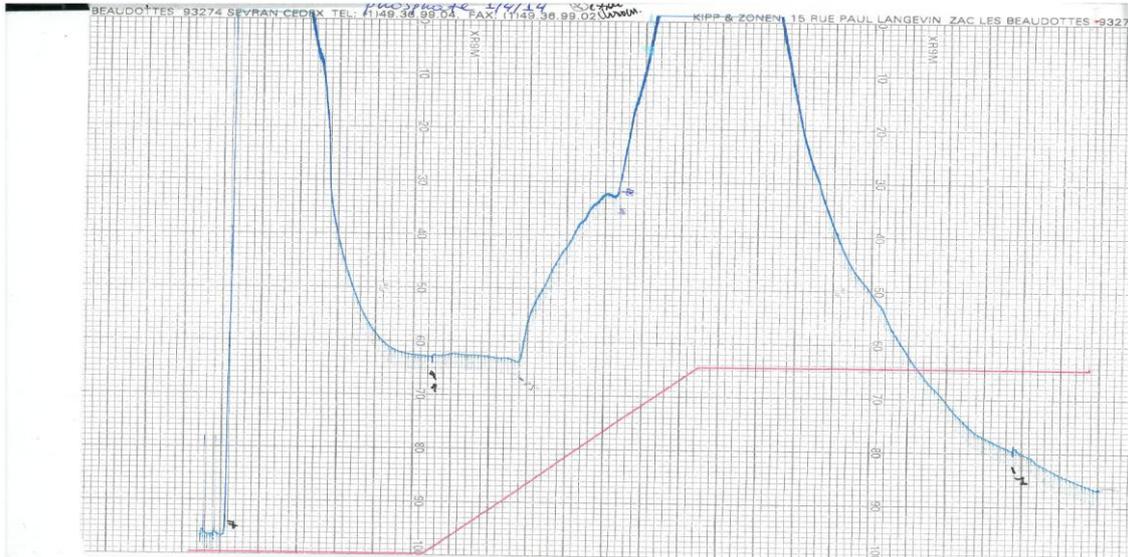


Figure 16 : Chromatogramme de la purification de l'extrait en tampon phosphate pH 6

Le Pic 2 est élué entre 0.15M et 0.40M de NaCl et le Pic 3 par 0.40M NaCl en tampon phosphate de sodium pH 6.

Tableau 11 : Récapitulatif des résultats de l'extraction à pH 6

	EB	EBc	Pic 1	Pic 2	Pic 3
pH	4,98	5,79	5,95	6,37	5,69
Tdc	160min	20 min	355min	200min	40min
Protéines (mg/ml)	0,27	4,56	0,12	0,14	0,35
Activité coagulante (U/ml)	1.9	15	0.85	1.5	7.5
Activité spécifique (U/mg)	1,39	0,66	1,41	2,14	4,29
Facteur de purification	1	0,47	2,13	3,24	6,25

Le Pic 3 présente l'activité spécifique la plus élevée par rapport aux autres fractions (4,29 U/mg), elle est deux fois supérieure à celle du Pic 2, trois fois supérieure que le Pic 1 et six fois plus élevée que l'extrait brut concentré.

Pour pouvoir identifier et confirmer la présence de la protéase aspartique, des électrophorèses en gel de polyacrylamide sur SDS – PAGE, en Native – PAGE en milieu basique et acide ont été réalisées sur les trois fractions.

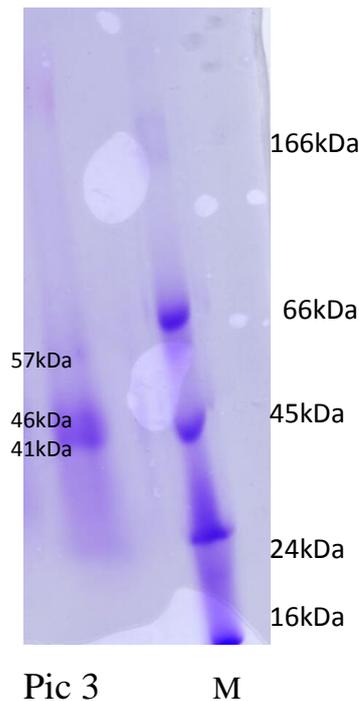


Figure 17 : Electrophorèse en SDS – PAGE

On peut observer la présence de deux bandes très prononcées de 41 et 46 kDa et une bande de 57 kDa moins prononcée dans le Pic 3.

➤ **électrophorèse à pH acide et neutre**

Des essais d'électrophorèses à pH neutre ont été réalisés mais ils ont été infructueux pour la caractérisation et l'identification des deux protéases. Il n'a pas été possible de détecter ou d'observer (Figure non illustrée) la présence des protéases sur les profils électrophorétiques.

L'électrophorèse à pH acide montre des bandes bien distinctes des protéines témoins. Et on observe également des trainées de bleu prononcées dans les extraits bruts de chaque tampon et le Pic 2 tampon Tris pH 8 et Pic 1 tampon phosphate pH 6. Des trainées moins prononcées sont présentes dans le Pic 1 tampon Tris et le Pic 3 tampon phosphate.

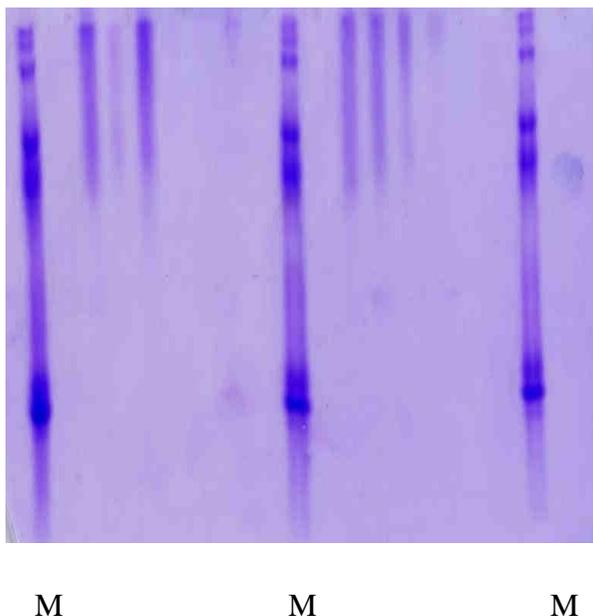


Figure 18 : électrophorèse à pH acide

3.3 Activités enzymatiques de deux protéases

➤ *Révélation de l'activité protéolytique des fractions issues de la chromatographie d'échanges d'ions*

L'activité protéolytique des extraits et fractions ont été confirmées par la digestion de la caséine incorporée dans des gels de polyacrylamide. Les taches blanches correspondent au trou laissé après la digestion de la caséine par les protéases et permettent d'identifier l'activité protéolytique d'une bande obtenue après électrophorèse. ⁽⁶⁵⁾

➤ *Gel à la caséine en présence de SDS-PAGE*

Un gel de polyacrylamide à la caséine en présence de SDS – PAGE a été réalisé pour détecter la présence des enzymes et leur activité protéolytique dans les extraits et les fractions. Après migration et élimination du SDS dans le triton X – 100, le gel a été incubé dans du tampon phosphate 50 mM pH 6 pendant 2 heures à 37°C. Dans les conditions favorables où les protéases sont renaturées après élimination du SDS, elles digèrent la caséine.

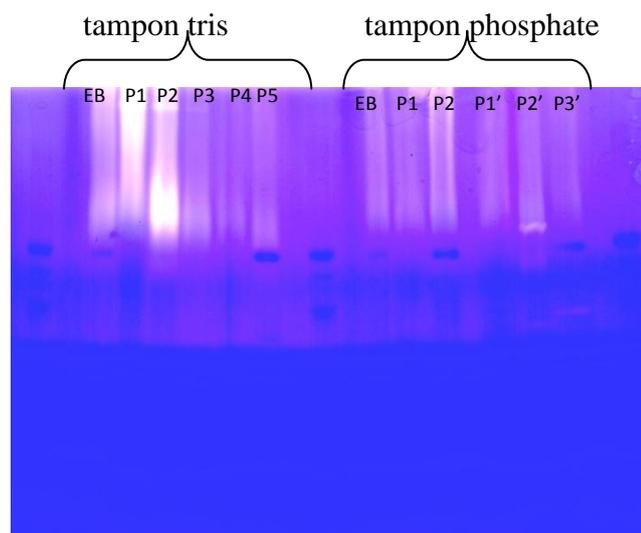


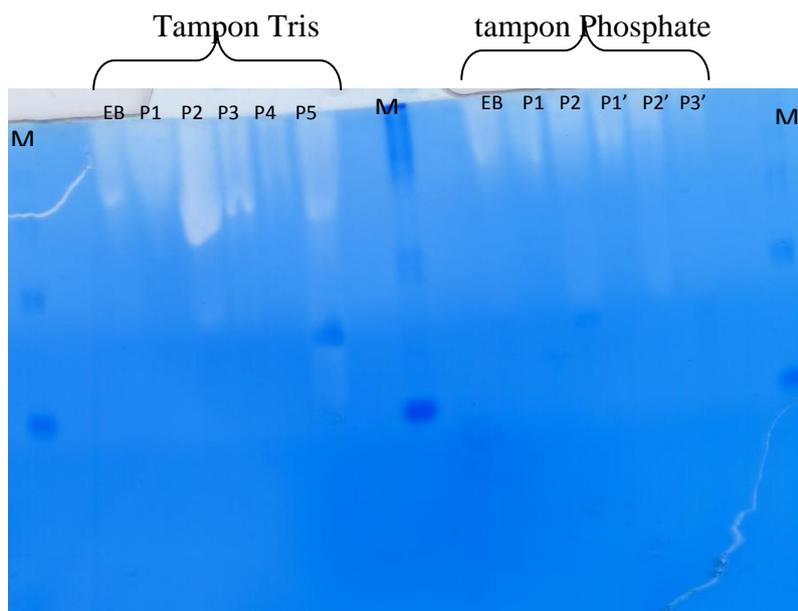
Figure 19 : gel à la caséine en présence du SDS - PAGE

Pour les échantillons obtenus à pH 8,1, la digestion a été très active pour les Pics 1 et 2. On observe des bandes de digestion de 97kDa et 74 kDa dans l'extrait brut. Une bande de 83kDa est observée dans le Pic 2 et une bande de 74kDa dans le Pic 5. Pour les extraits et fractions obtenus à pH 6, la digestion du gel à la caséine a été observée principalement dans le pic 2 avec une bande bleu de 85 kDa. Une fine bande blanche de 48 kDa est observée dans le Pic 3. Ces résultats suggèrent la présence de protéases acides et basiques dans l'extrait du fruit de *Balanites aegyptiaca*.

3.4 Détermination des points isoélectriques

Les points isoélectriques du Pic 2 et du Pic 3 issus de la chromatographie d'échanges d'ions sur Q-Sepharose en tampon Tris pH 8,1 et en tampon Phosphate de sodium pH 6 respectivement ont été déterminés par électrophorèse sur gel à la caséine en Native PAGE pH basique. Le sérum bovin contenant l'albumine, et les α_1 , α_2 , β_1 , β_2 et γ -globulines a été utilisé comme protéines témoins.

Grâce au graphique distance de migration et points isoélectriques des protéines témoins, les points isoélectriques de deux protéases ont été estimés.



M : Marqueurs

Figure 20 : électrophorèse sur gel à la caséine en Native -PAGE

Le pic 2 du tampon Tris (sérine protéase) a un point isoélectrique d'environ 6.8 et le Pic 3 du tampon présente un point isoélectrique de 5.5.

Antao et al.,^[82] ont déterminés un point isoélectrique à 4 pour la protéase aspartique dans les travaux réalisés sur l'extrait de *Cynara scolymus L.*

CHAPITRE 4 : APPLICATION EN FROMAGERIE

L'objectif de ce travail est la production d'un extrait coagulant à partir du mésocarpe du fruit de *B. aegyptiaca* pouvant être utilisé en fromagerie. De ce fait, nous avons utilisé l'extrait brut obtenu par macération dans la solution du NaCl 5% et la fraction (Pic 3) obtenue par chromatographie d'échanges d'ions en tampon phosphate de sodium pH 6. Se basant sur les travaux réalisés par Fontanini et Jones ⁽⁶⁴⁾ la solution NaCl 5% a été utilisée comme milieu d'extraction car elle améliore l'extraction et augmente l'activité coagulante de l'extrait du fruit de *B. aegyptiaca*.

L'utilisation des extraits végétaux coagulant en fromagerie a montré des potentialités et ils peuvent remplacer la présure bovine mais la majorité des fromages fabriqués à partir des ces extraits présentent des désavantages dans la technologie fromagère comme le goût amer, la couleur grise ou la texture pâteuse.

Les caractéristiques sensorielles et texturales des fromages fabriqués à partir de l'extrait brut et du Pic 3 ont été évaluées et comparées avec celles d'un fromage témoin, préparé la présure de référence.

4.1 Essai de fabrication des fromages

L'extrait brut du fruit de *B. aegyptiaca* et le Pic 3 issu de la chromatographie d'échanges d'ions ont fait coaguler le lait. Les coagulums obtenus après égouttage sont comparés à celui préparé avec la présure dans les mêmes conditions.

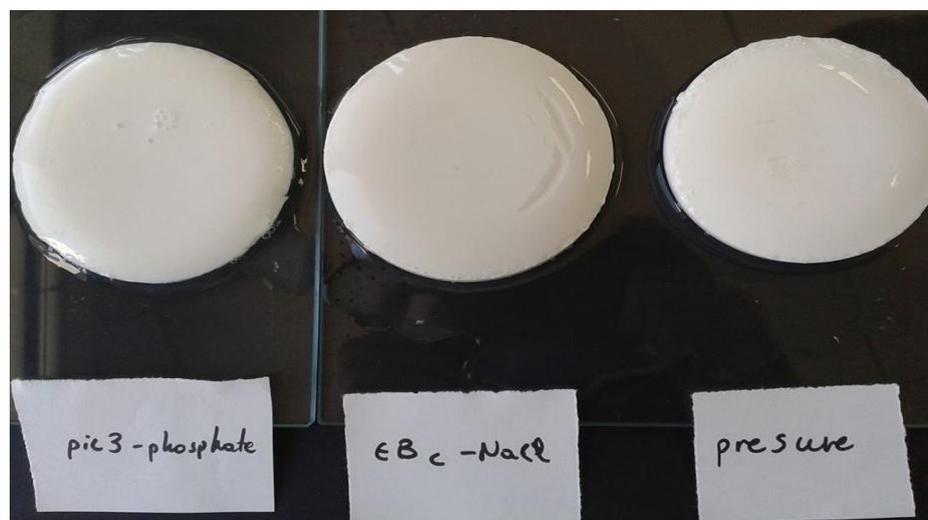


Figure 21 : coagulums obtenus avec le Pic3, l'extrait brut et la présure

L'extrait brut de *Balanites aegyptiaca* a donné des fromages différents de ceux obtenus à la présure et au Pic 3.

Tableau 13 : caractéristiques des fromages

Caractéristiques	Fromage extrait végétal	Fromage Pic 3	Fromage présure
Masse de fromage (g.L ⁻¹)	119,63	52,85	105,65
Extrait sec total (g.kg ⁻¹)	36,33	23,64	68,56
Rendement matière sèche	29,66%	22,13%	20,76%

4.2 Analyses de texturation

Les fromages préparés avec la présure et l'extrait brut ont fait coaguler le lait après 2 heures à 35°C et le fromage obtenu avec le Pic 3 au bout de 3 heures. Ces fromages obtenus ont été soumis au test Texture Profile Analyser (TPA). L'analyse de la texture du fromage avec une machine analyseur de texture universel est un test d'imitation objectif, largement utilisé pour la mesure de la texture du fromage.

Il a été prouvé que les paramètres d'analyse de texture sont en bonne corrélation avec les paramètres sensoriels, la courbe force - temps obtenu lors du test TPA dans une machine d'essai universelle est utilisée pour déterminer les paramètres tels que la dureté, élasticité, la cohésion, adhérence, résistance. (REFERENCES 67, 68)

La durée totale du test est de 2 minutes, la première partie de la courbe correspond à la phase de compression lente (30 secondes) qui permet de visualiser l'homogénéité du fromage. Après la phase de décompression, une deuxième pression est exercée pour montrer l'élasticité du fromage. Le test de TPA n'est pas très approprié pour les mesures des propriétés rhéologiques mais est très efficace pour comparer les échantillons des fromages. ⁽⁶⁹⁾

Les profils d'analyse de texture (non illustrés) du fromage – extrait brut obtenus diffèrent des profils obtenus pour les deux autres fromages, lesquels présentent des nombreuses similarités.

Tableau 14 : Paramètres d'analyses de texture des fromages

Paramètres rhéologiques	Fromage – extrait brut	Fromage – Pic 3	Fromage – présure
Dureté (N)	1.678	0.233	0.292
Cohésion	0.78	0.91	0.99
Force maximale d'adhésion (N)	-0.024	-0.013	-0.009
Adhésivité (J)	3.83×10^{-9}	6.7×10^{-8}	8.705×10^{-8}
Résilience (-)	-6.30	-3.24	-3.82

De ces résultats, on observe une similarité des profils d'analyses des fromages obtenus avec la présure et le Pic 3 par contre le fromage préparé avec l'extrait brut diffère des autres fromages.

Les valeurs de Dureté (la force nécessaire pour atteindre une déformation donnée) obtenues montrent que ces fromages sont des pâtes molles, la dureté du fromage à l'extrait brut (1.678) est nettement supérieure à celles des fromages au Pic 3 (0.233) et à la présure (0.292). Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues par (Robert B) pour les mêmes types de fromages à l'extrait brut et à la présure mais elles sont inférieures à d'autres types de fromage comme le fromage Ibores ⁽⁷⁰⁾, fromage de chèvre Monterey Jack ⁽⁷¹⁾, le fromage mexicain Anejo ⁽⁷²⁾ et la mozzarella ^(73, 74).

Ces valeurs de dureté indiquent les fromages à la présure et au Pic 3 sont moins rigides que le fromage obtenu avec l'extrait brut. Cette différence de valeurs de dureté est en accord avec la variation de la matière sèche des trois fromages, le fromage à l'extrait brut, le plus sec (29,30%) est aussi le plus dur (1.678) alors que le fromage à la présure et au Pic 3, moins sec (22% et 21%) sont les moins résistants (0.233 et 0.292) respectivement.

La cohésion est le degré auquel l'échantillon se déforme avant la rupture, dans le fromage c'est la mesure de la force des liaisons internes des protéines. ⁽⁷⁵⁾ On note une

cohésion nettement supérieure pour les fromages à la présure et au Pic 3 par rapport au fromage obtenu avec l'extrait brut.

La force maximale d'adhésion des trois fromages est extrêmement faible. L'adhésivité est le travail nécessaire pour retirer la sonde de l'échantillon après avoir appliqué une force de compression sur le fromage, c'est la partie descendante du premier pic. L'adhésivité du fromage obtenu avec le Pic 3 (-6.7×10^{-8}) est inférieure à l'adhésivité des fromages à l'extrait brut et à la présure.

La résilience est la capacité du fromage de reprendre la position initiale après l'application d'une force de compression, c'est la mesure de l'élasticité du fromage.⁽⁷⁷⁾ Le fait que la hauteur du deuxième pic de compression ne soit pas équivalente au premier pic de compression, montre que les trois fromages n'ont pas repris leur forme initiale entre les deux compressions. La résilience des fromages à la présure et au Pic 3 est proche en comparant avec celle du fromage obtenu avec l'extrait brut qui est très faible (-6.30).

Ainsi ces résultats corroborent les résultats obtenus durant l'analyse sensorielle des trois fromages, les fromages à la présure et au Pic 3 présentent des ressemblances sur la texture, la couleur et le goût. Les différences observées dans le fromage obtenu avec l'extrait brut peuvent être expliquées par le fait que l'extrait brut coagulant du fruit de *B. aegyptiaca* contient d'autres enzymes coagulantes d'où la nécessité d'être purifié pour espérer son utilisation comme alternative à la présure.

4.3 Analyses sensorielles

La qualité des fromages est largement déterminée par la perception sensorielle qui est un processus complexe. Elle est influencée par plusieurs facteurs tels que le contenu en composés aromatiques, la texture et l'apparence⁽⁷⁸⁾. Les trois fromages ont été soumis à un groupe de dégustateurs pour déterminer leur qualité organoleptique sur un ensemble de caractères. La nationalité, le sexe et la profession des dégustateurs ont été considérés. Les paramètres utilisés les trois fromages sont : le goût, l'arôme, la texture et la couleur. Il faut noter que nous n'avons pas eu un nombre assez significatif des dégustateurs.

Les trois fromages soumis aux dégustateurs étaient les suivants : A = Fromage au Pic 3, B = Fromage à l'extrait brut et C = Fromage à la présure.

Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel Graphpad Prism 5. Les trois fromages ont été comparés pour chaque caractère organoleptique par le test pour des valeurs non paramétrique : One way ANOVA-Kruskal-Wallis et par le test Mann-Whitney U. Nous obtenons les résultats suivants :

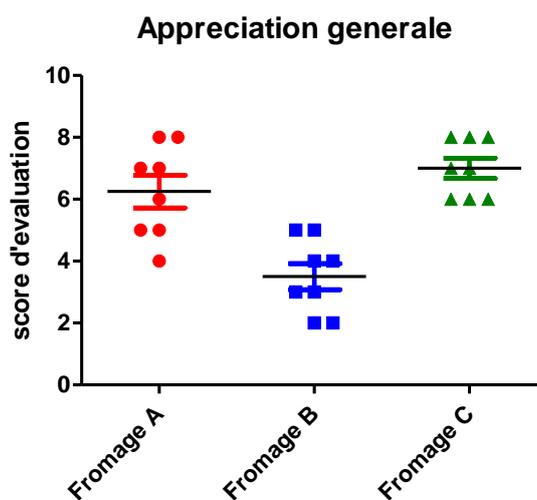


Figure 22 : Appréciation générale

Tableau 15 : Appréciation générale des fromages

Appréciation générale			
	Fromage A	Fromage B	Fromage C
Nombre de valeurs	8	8	8
Minimum	4.000	2.000	6.000
Maximum	8.000	5.000	8.000
Moyenne	6.250	3.500	7.000
Ecart type	1.488	1.195	0.9258
Erreur standard	0.5261	0.4226	0.3273
Lower 95% CI of mean			
	5.006	2.501	6.226
Upper 95% CI of mean			
	7.494	4.499	7.774

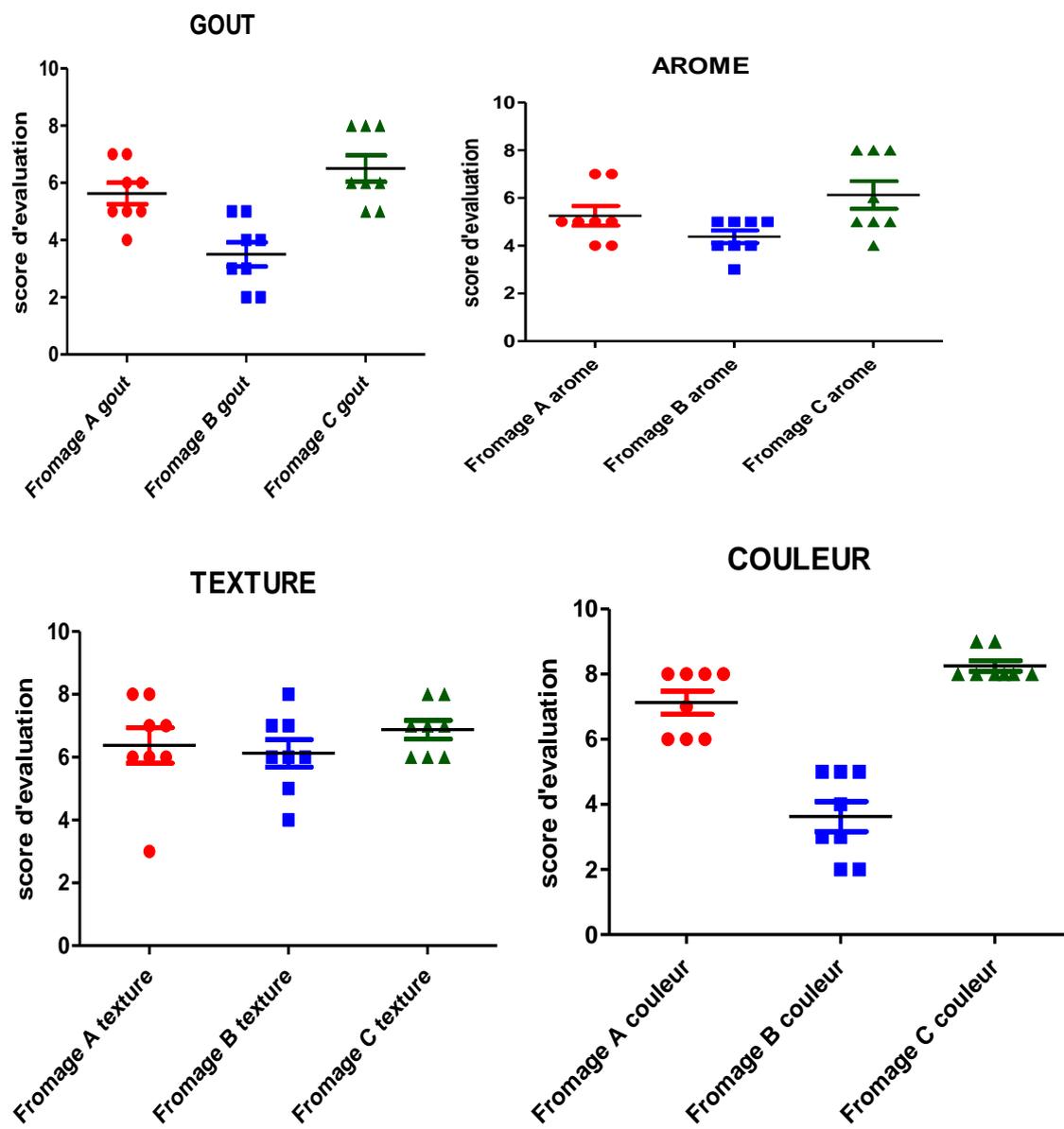


Figure 23 : Appréciation des caractères organoleptiques

Tableau 16 : Statistique Descriptive

	Gout			arome			couleur			texture		
	Fromage A	Fromage B	Fromage C	Fromage A	Fromage B	Fromage C	Fromage A	Fromage B	Fromage C	Fromage A	Fromage B	Fromage C
Number of values"	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Minimum	4.000	2.000	5.000	4.000	3.000	4.000	6.000	2.000	8.000	3.000	4.000	6.000
Maximum	7.000	5.000	8.000	7.000	5.000	8.000	8.000	8.000	9.000	8.000	8.000	8.000
Mean	5.625	3.500	6.500	5.250	4.375	6.125	7.125	4.000	8.250	6.375	6.125	6.875
Std. Deviation"	1.061	1.195	1.309	1.165	0.7440	1.642	0.9910	2.000	0.4629	1.598	1.246	0.8345
"Lower 95% CI of mean"	4.738	2.501	5.405	4.276	3.753	4.752	6.296	2.328	7.863	5.039	5.083	6.177
Upper 95% CI of mean"	6.512	4.499	7.595	6.224	4.997	7.498	7.954	5.672	8.637	7.711	7.167	7.573

L'appréciation du goût des fromages indique que le fromage C a le score le plus élevé (5.625 ± 1.061). Selon le test U de Mann-Whitney, il existe une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre le fromage A et le fromage B et aussi entre les fromages B et C. Le fromage A n'est pas statistiquement différent ($P > 0,05$) avec le fromage présure en termes de goût.

En ce qui concerne l'arôme, les dégustateurs n'ont pas trouvé de différences statistiquement significatives entre les fromages A et fromage B. La même observation est faite entre les fromages A et C. Par contre, Il existe une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre le fromage B et le fromage C.

La couleur du fromage présure n'est pas statistiquement différent ($P > 0,05$) de celle du fromage A. Par contre, il existe une différence significative ($P < 0,05$) entre le fromage A et B et entre le fromage B et C.

Pour la texture, selon les dégustateurs, il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les trois exemplaires.

Finalement, l'acceptabilité générale ne montre pas une différence significative ($P > 0,05$) entre les fromages présure et fromage A. Par contre, il y a une différence entre les fromages A et B et entre B et C.

En conclusion, la purification de l'enzyme coagulant le lait et présente dans le Pic 3 permet d'obtenir un fromage dont les caractéristiques sont très proches de celles du fromage fabriqué grâce à la présure. Cette fraction purifiée pourra donc être utilisée en fromagerie en remplacement de la présure dans les pays producteurs de *Balanites aegyptiaca*

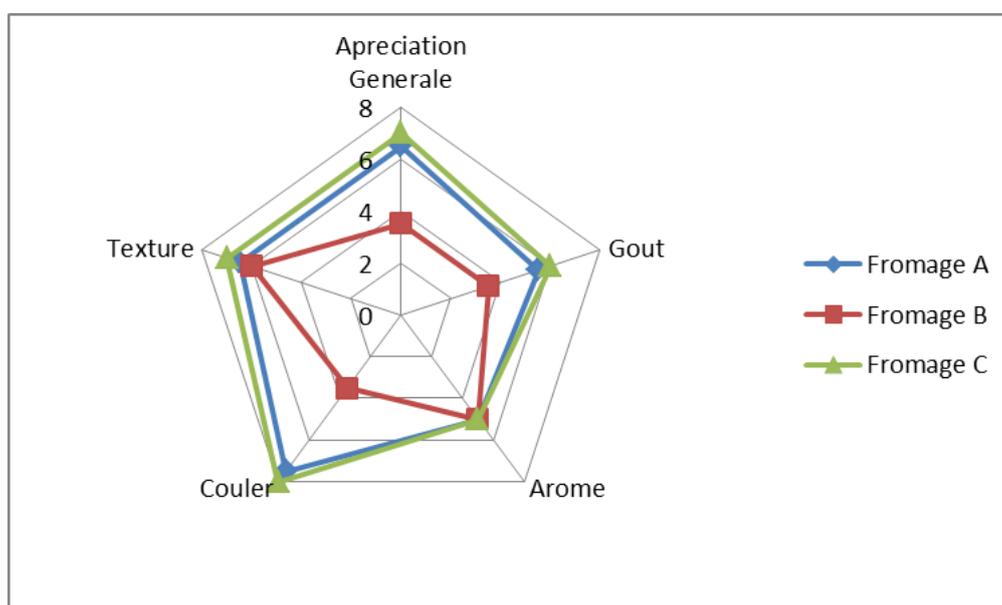


Figure 24 : Préférence générale des fromages

Tableau 17: Test Kruskal-Wallis

	Appréciation générale	goût	arôme	couleur	texture
P-Value	0.0009	0.0013	0.0505	$P < 0.0001$	0.4742

Tableau 18: Test Mann-Whitney U

	Appréciation générale	goût	arôme	couleur	texture
A-B	0.0049	0.0063	0.1534	0.0008	0.5857
B-C	0.0009	0.0018	0.0271	0.0009	0.2267
A-C	0.3295	0.2128	0.2478	0.0182	0.6587

PARTIE 4 : CONCLUSION

De notre étude, résultent les observations ci-dessous :

- L'extraction à pH 8.1 inactive la protéase aspartique, puisque celle-ci est dénaturée à pH basique et c'est la sérine protéase qui est mise en évidence. Le temps de coagulation de l'extrait et des fractions est assez long. Après la chromatographie d'échanges d'ions sur colonne Q- Sepharose Fast Flow, c'est le Pic 2 qui présente une activité coagulante assez élevée et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en SDS – PAGE du même Pic a révélé des sérine protéases de masse moléculaire 28, 42, 64, et 68 kDa, la sérine protéase présente un pH optimum à 7,5.
- Par contre à pH 6, la digestion à la caséine montre que c'est la protéase aspartique qui a été isolée et conservée. On observe une activité coagulante plus élevée et un temps de coagulation plus court pour le Pic 3 obtenue par la chromatographie échangeuse d'ions sur colonne Q – Sepharose. Le profil électrophorétique du Pic 3 sur gel de polyacrylamide en SDS- PAGE illustre des bandes des protéases aspartiques de masse moléculaire 41, 46 et 57 kDa.

Les comparaisons concernant quelques caractéristiques physico – chimiques, sensorielles et rhéologiques effectuées sur des fromages fabriqués avec la présure et celles des fromages fabriqués avec l'extrait brut et le Pic 3 obtenu par chromatographie d'échanges d'ions sur colonne Q –Sepharose en tampon phosphate de sodium 50mM pH 6 montrent :

- Un rendement en matière sèche plus élevé pour le fromage obtenu avec l'extrait brut par rapport aux fromages présure et fromages Pic 3.
- L'appréciation du goût des fromages indique que le fromage – présure a le score le plus élevé (5.625 ± 1.061). Le fromage – Pic 3 n'est pas statistiquement différent ($P > 0,05$) du fromage présure en termes de goût mais il existe une différence statistique significative entre le fromage – extrait brut et les deux autres fromages.
- En ce qui concerne l'arôme, les dégustateurs n'ont pas trouvé de différences significatives entre le fromage – Pic 3 et fromage – extrait – brut.
- La couleur du fromage présure n'est pas différente de celle du fromage – Pic 3. Par contre, il existe une différence significative entre le fromage – extrait brut et les deux autres fromages.

- Pour la texture, selon les dégustateurs, il n'y a pas de différences significatives entre les trois exemplaires.

Perspectives

Puisqu'un temps de coagulation assez court et une activité coagulante plus élevée sont observés avec la fraction purifiée obtenue en tampon phosphate de sodium 50mM pH 6, il est préférable de réaliser l'extraction de la protéase aspartique à pH acide car elle est beaucoup plus efficace pour la fabrication des fromages. En plus en technologie fromagère il serait mieux purifier l'extrait pour pouvoir fabriquer un fromage qui aurait des caractéristiques identiques à celles du fromage fabriqué avec la présure.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Dr J.P. Ramet:** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin Méditerranéen, ETUDE FAO PRODUCTION ET SANTE ANIMALES 48
M-26 ISBN 92-5-202169-8
2. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine Collection FAO: Alimentation et nutrition n° 28 ISBN 92-5-20534-6
3. **WEBB, B. H., JOHNSON, A. H.** Fundamentals of dairy chemistry, Fundamentals of dairy chemistry. 1965 pp. ix+827 pp.
4. **Alais, C. & Blanc, B.** 1975. Milk proteins: biochemical and biological aspects. World Rev Nutr Diet 20:67- 147.
5. **Blanc, B.** 1981. Biochemical aspects of human milk - Comparison with bovine milk. World Rev Nutr Diet 36:1-89.
6. **Lentner, C.** 1981. Geigy scientific tables, volume 1: Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition, p. 213-216. **Basel, Ciba Geigy.** 8th ed
7. **Renner, E.** 1989. Micronutrients in milk and milk-based food products. London, Elsevier Applied Science. 311 pages.
8. **Alais, C. & Blanc, B.** 1975. Milk proteins: biochemical and biological aspects. World Rev Nutr Diet 20:67- 147.
9. **Withney, R., Brunner, J.R., Ebner, K.E., Farrell, H.M., Josephoon, R.V., Moor, C.V. & Swaigsgood, H.E.** 1976. Nomenclature of the proteins in cow's milk. Fourth revision. Dairy 59:795-815.
10. **Dalgleish, D.G.** 1982. Milk proteins, chemistry and physics. In P.F. Fox & J.J. Condon, eds. Food proteins p. 155- 178. London , Applied Sciences Publication.
11. **Renner, E.** 1983. Milk and dairy products in human nutrition. München, Volkswirtschaftlicher Verlag. 450 pages.
12. **Alais, C. & Blanc, B.** 1975. Milk proteins: biochemical and biological aspects. World Rev Nutr Diet 20:67- 147.
13. **Adrian, J.** 1973. Valeur alimentaire du lait. Paris, La Maison Rustique.
14. **Bernier, J.J., Adrian, J. & Vidon, N.** 1986. Les aliments dans le tube digestif Paris. 46X pages.
15. **Schmidt, D.G.** 1980. Colloidal aspects of caseine. Neth Milk Dairy J. 34:42-64
16. **Jenness, R.** 1979. Comparative aspects of milk proteins. J. Dairy Res. 46:197-210.
17. **Spik, G., Brunet, B., Mazurier-Dehaine, C., Fontaine, G. & Montreuil, J.** 1982. Characterization and properties of the human and bovine lactotransferrins extracted from the faeces of newborn infants. Acta Paediatr Scand., 71: 979-985.
18. **Renner, E.** 1983. Milk and dairy products in human nutrition. München, Volkswirtschaftlicher Verlag. 450 pages.
19. **Adrian, J.** 1973. Valeur alimentaire du lait. Paris, La Maison Rustique.
20. **Gregory, M.E.** 1975. Water-soluble vitamins in milk and milk products. J. Dairy Res. 42:197-216. Banon S., Hardy J., 1991. Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection, Journal of Dairy Research 58 : 75-84
21. **Green M. L., Grandison A. S.,** Secondary (nonenzymatic) phase of rennet coagulation and postcoagulation phenomena, In : Fox P .F. (Ed), Cheese: Chemistry,

- physics and microbiology, Vol 1 general aspects, Chapman and Hall, London, pp. 101-140
22. **Brulé G., Lenoir J., Remeuf F.,** 1997. La micelle de caséine et a coagulation du lait, In : Eck A., Gillis J.C. (Eds), *Le Fromage*, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 7-41
 23. **Dr J.P. Ramet:** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin Méditerranéen, ETUDE FAO PRODUCTION ET SANTE ANIMALES 48
M-26 ISBN 92-5-202169-8
 24. **Cayot P, Lorient D.,** 1998. Structure et techno fonction des protéines de lait. Technique et documentation. Lavoisier, Paris, 363p
 25. **ALAIS (C.).** 1975 Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Ed. Sepaic, PARIS-F.
 26. **Dagleish D. G.,** 1993 The enzymatic coagulation of milk, In : Fox P.F (Ed), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Vol 1 general aspects*, Chapman and Hall, London, pp. 69-100
 27. **Otani H., Iwagaki M., Hosono A.,** 1991_a. The screening of trees having milk clotting activity. *Animal Science and Technology.* 62 417 – 423
 28. **BOHAK, Z. (1970)** Chicken pepsinogen and chicken pepsin In: *Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes.* Ed.,G. E. Perlmann and L. Lorand, Acad.Press Inc., New York, V. 19, p.347-358, 1042 p.
 29. **Sa FV, Barbosa M.** Cheese-making with a vegetable rennet from cardoon (*Cynara cardunculus*) *Journal of Dairy Res* 1972, 335-343
 30. **Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, van Boekel MAJS.** Dairy technology : Principles of milk properties an d processes. New York : Marcel Dekker Inc 1999
 31. **ERNSTROM, C.A., and 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.
 32. **RAMET, J.P. (1997)** Les agents de transformation du lait; la présure et les enzymes coagulantes In: *Le fromage.* Ed., A. Eck, 3ème ed., Technique et documentation Lavoisier, p.101-107, 539p.
 33. **RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S, AND. DESHPANDE, V. V. (1998)** Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Vol. 62, N°. 3: 597-635
 34. **Vettier N.,** 1998. Contribution à l'étude structural et rhéologique de la coagulation du lait par action conjuguée d'un agent acidifiant et d'une enzyme protéolytique, these, Institut national polytechnique de Lorraine, Nancy, France
 35. **Bourgeois C.M. et Larpent J.P.,** 1996. Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 432-704.
 36. **Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. et Brulé G.,** 2006. Science des aliments : Technologie des produits alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier,* Paris. 2 : 40-55.
 37. **St-Gelais D., Tirard-Coller P., Bélanger G., Couture R. et Drapeau R.,** 2002. Fromage. In : *Science et technologie du lait : transformation du lait (Vignola C.L.). Presses. Int. Polytechnique.* 349-407.
 38. **Randazzo C.L., Torriani S., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. et Vaughan, E.E.,** 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of

- an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Env. Microbiol.* **68** : 1882–1892.
39. **Randazzo C.L., Torriani S., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. et Vaughan, E.E., 2002.** Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Env. Microbiol.* **68** : 1882–1892.
 40. **St-Gelais D., Tirard-Coller P., Bélanger G., Couture R. et Drapeau R., 2002.** Fromage. In : Science et technologie du lait : transformation du lait (Vignola C.L.). *Presses. Int. Polytechnique.* 349-407.
 41. **Mahaut M., Jeantet R. et Brule G., 2000.** Initiation à la technologie fromagère. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 154-180.
 42. **Bourgeois C.M. et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 432-704.
 43. **Luquet F.M. et Corrieu G., 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 3-37.
 44. **Bourgeois C.M. et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 432-704.
 45. **Simon D., François M. et Dudez P., 2002.** Transformation des produits laitiers frais à la ferme. *Educagri.* 73-90.
 46. **St-Gelais D., Tirard-Coller P., Bélanger G., Couture R. et Drapeau R., 2002.** Fromage. In : Science et technologie du lait : transformation du lait (Vignola C.L.). *Presses. Int. Polytechnique.* 349-407.
 47. **Milesi M.M., Candiotti M. et Hynes E., 2007.** Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening. *LWT.* **40** : 1427-1433.
 48. **Schultz M. M., Hansen L. B., Steuernagel G. R., Kuck A. L., 1990.** Variation of milk fat, protein and somatic cells for dairy cattle. *Journal of Dairy Science,* 73, 484-493
 49. **Agabriel C., Coulon J.B., Journal C., Sibra C., Albouy H., 1999.** Variabilité des caractéristiques des fromages saint – nectaire derniers : relations avec la composition du lait et les conditions de production. *LE Lait,* 79, 291 - 302
 50. **Coulon J.B., Delacroix-Buchet A., Martin B. et Pirisi A., 2005.** Facteurs de production et qualité sensorielle des fromages. *INRA. Prod. Anim.* **18** : 49-62.
 51. **Awad S., Ahmed N. et El Soda M., 2007.** Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development. *Food Chem.* **104** : 1192-1199.
 52. **Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. et Brulé G., 2006.** Science des aliments : Technologie des produits alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier,* Paris. **2** : 40-55.
 53. **Charlemagne Gnoula, Véronique Mégalizzi, Nancy De Nève, Sébastien Sauvage, Fabrice Ribaucour, Pierre Guissou, Pierre Duez, Jacques Dubois, Laurent Ingrassia, Florence Lefranc, Robert Kiss, Tatjana Mijatovic,** Balanitin-6 and -7: Diosgenyl saponins isolated from *Balanites aegyptiaca* Del. display significant anti-tumor activity in vitro and in vivo *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 32: 5-15, 2008
-

54. **Bishnu P. Chapagain and Zeev Wiesman, 2007** : Determination of saponins in the kernel cake of *Balanites aegyptiaca* by HPLC-ESI/MS Phytochemical Analysis Volume 18, Issue 4, pages 354–362
-
55. **Kapseu C., Mbofung C.M.F., Kayem G.J., 1997** Fatty acids and triglycerides of fruits oils from *Cyperus esculentus* and *Balanites aegyptiaca*. Sciences des aliments. 17 : 531-537
56. **Baumer M., 1995.** Arbres, arbustes et arbrisseaux nourriciers en Afrique Occidentale, Enda, Dakar, Sénégal 260p
57. **D.G. Libouga, Dominique Vercaigne-Marko, Sana Longa Djangal, Iliassou Choukambou, A.L. Ebangi, Messine Ombionyo, R.G. Beka, T.M. Aboubakar & D. Guillochon** Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca* TROPICULTURA, 2006, 24, 4, 229-238
58. **Beka R. G.,** une alternative végétale en fromagerie : Préparation d'un extrait coagulant à partir des fruits de *Balanites aegyptiaca* ; Etude biochimique et application en fromagerie. Thèse Université de Lille 1 – Université de Ngaoundere
59. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 Nature 1970 ; 270 : 680-5
60. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 Nature 1970 ; 270 : 680-5
61. **IDF 1992** , Bovine Rennets. Determination of total milk – clotting activity. IDF standard (Vol 157). Brussels, Belgium : International Dairy Federation St-Gelais D., Tirard-Coller P., Bélanger G., Couture R. et Drapeau R., 2002. Fromage. In : Science et technologie du lait : transformation du lait (Vignola C.L.). Presses. Int. Polytechnique. 349-407.
62. **Beka R.G., Pernac A – S., Coinon D., Paquier V., Libouga D., Guillochon D., Vecaigne-Marko D.** : Purification et caractérisation d'une protéase coagulant le lait et extraite des fruits de *Balanites aegyptiaca* 20.
63. **Tomar R, Kumar R, Jagannadham M.V** , 2008 A stape serine protease, Wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctora* : purification and biochemical properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 1479-1487
64. **Fontanini et Jones, 2002:** Fontanini D., Jones B. L. , 2002. SEP-1 – a subtilisin –like serine endopeptidase from germinated seeds of *Hordeum vulgare* L. cv. Morex. Planta 215, 885-893)
65. **(Chevanan et al 2006** Effect of calcium and phosphorus residual lactose and salt to moisture on textural properties of cheddar cheese during ripening, Journal of Texture Studies 37 2006, 711-730
66. **Tunick, M.H., Van Hekken, D.L., 2002.** Torsion gelometry of cheese. J. Dairy Sci. 85, 2743–2749.)
-
67. **Tunick, M.H., Van Hekken, D.L., 2002.** Torsion gelometry of cheese. J. Dairy Sci. 85, 2743–2749

- 68. Francisco Jose´ Delgado et al** : Proteolysis, texture and colour of a raw goat milk cheese throughout the maturation, *Eur Food Res Technol* (2011) 233:483–488)
- 69. Y.W. Park**, Rheological characteristics of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research* 68 (2007) 73–87
- 70. CAROLINA HERNANDEZ-MORALES et al**, Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Anejo cheese Vol 63, No 4 November 2010 *International Journal of Dairy Technology*
- 71. Tunick 2000, M.H.**, Rheology of dairy foods that gel, stretch and fracture. *J .Dairy sci.* 1892 - 1898)
- 72. Van Hekken, D.L., et al** 2007 Rheology and melt characterization of low – fat and full fat Mozzarella cheese made from microfluidized milk *LWT*, 40, 89 – 98
- 73. Tunick M.H** 2000 Rheology of dairy foods that gel, stretch and fracture. *J .Dairy Sci.* 1892 – 1898
- 74. Chevanan et al 2006** Effect of calcium and phosphorus residual lactose and salt to moisture on textural properties of cheddar cheese during ripening, *Journal of Texture Studies* 37 2006, 711-730
- 75. Edima, 2007 :Edima H.C.**, 2007. *Carnobacterium maltaromaticum*: caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. 57-66
- 76. Lopez A. , Teixeira G., Libertato Mc., Pais M.S., Clemente A** : New vegetal sources for milk clotting enzymes . *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic* 5 1998
- 77. Thomas J. M., Hodes M.E.**, A discontinuous buffer system for the electrophoresis of cationic proteins at near neutral pH, *Analytical Biochemistry* 118, 194-196(1981)
- 78. Raposo S., Domingos A.**, Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures . *Process Biochemistry* 43, 2008 139-144
- 79. Llorente B. E., Brutti C. B., Caffini N O.**, Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from Globe Artichoke (*Cynara scolymus L.*) *Journal of agricultural and food chemistry* 2004, 52, 8182-8189
- 80. Davies DR.** The structure and function of the aspartic proteinases. *Annual review of Biophysical Chemistry* 1990 ; 19 : 189-215 Dunn BM structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases *Chem Rev* 2002 ; 102 : 4431 – 58
- 81. C. faro, A J Moir and E Pires** specificity of milk clotting enzyme extracted from the thistle *Cynara cardunculus L* action on oxidized insulin and k-casein *Biotech Lett* 14:841 1992
- 82. Antao, C.M., Malcata, F.X** 2005 Plant serine proteases : biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol. Biochem* 43, 637-650
-

ANNEXES

1. Macération

Pour extraire les enzymes, les fruits sont premièrement débarrassés de l'épicarpe et ils sont laissés à macérer une nuit à 4°C dans deux tampons différents :

- Tampon Tris-HCl 50mM contenant 1mM EDTA, β -mercaptoéthanol 3mM pH 8,1. L'EDTA et la β -mercapto-ethanol sont utilisés pour protéger les enzymes contre l'oxydation et la dégradation.

- Tampon phosphate sodium pH 6 à partir de la solution phosphate monosodique 50mM et phosphate disodique 50mM.

Ensuite, les fruits sont triturés pour obtenir le jus du fruit.

2. Centrifugation - Filtration

Le jus est centrifugé à 6000g pendant 10 min à 20°C, afin d'éliminer les insolubles. Le surnageant obtenu est ensuite filtré dans le papier filtre et le filtrat constitue l'extrait brut (EB).

3. Ultrafiltration

L'ultrafiltration frontale est une méthode de séparation de particules en solution dans un fluide par différence de pression (ici 1 bar) à travers une membrane avec une seuil de coupure donné (ici de 10kDa) par effet d'osmose inverse (ce qui correspond au passage d'eau, d'une solution concentrée vers une solution moins concentrée en soluté.

Pour que cela soit possible, il faut donc exercer une pression supérieure et opposée à la pression osmotique exercée par les solutés, d'où l'intervention d'une pompe sur la solution à traiter pour forcer le passage d'eau à travers la membrane, et d'agitation moléculaire.

L'extrait brut est diafiltré en utilisant une membrane de filtration 10000 Da pour retenir les protéines et éliminer les sucres et polyphénols.



Après l'essai de l'ultrafiltration frontale, la membrane doit est rincée et conservée dans l'alcool 20%.

4. Test de coagulation

4.1. Principe

Le test de coagulation est utilisé pour vérifier la présence des enzymes coagulantes. Les résidus de caséines laissent des liaisons libres qui peuvent se lier aux molécules de calcium ionisées présentes dans le lait. De cette manière on observe le déroulement et l'enchevêtrement des micelles et la formation d'un caillé.

4.2. Réactifs

Lait en poudre demi – écrémé Régilait®

Chlorure de Calcium (CaCl₂)

4.3. Mode Opératoire

On travaille sur le lait reconstitué selon la méthode officielle française de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique : station de recherches en technologie et analyses laitières).

12g du lait en poudre sont dissous en fiole jaugée de 100ml avec 0.147g de Chlorure de Calcium (CaCl₂).

Dans les tubes à essai on prépare la gamme suivante :

	Témoin 1	Témoin 2	Echantillon
Lait reconstitué	1ml	1ml	1ml
Eau Distillé	200µl	-	-
Tampon	-	200µl	-
Echantillon	-	-	200µl

Les tubes sont placés au bain marie à 40°C. On mesure le temps lorsqu'on observe la formation d'un film de coagulation sur les parois du tube à essai jusqu'à la formation d'un gel consistant.

5. Dosage des protéines des préparations enzymatiques par la méthode au bleu de Coomassie (Méthode de Bradford)

5.1.1. Principe

La méthode est fondée sur le glissement bathochrome d'absorbance de 465 à 595 nm que présente le Bleu de coomassie lorsqu'en milieu acide il se lie en manière non covalente aux protéines en solution.

5.1.2. Réactifs

Réactif de Bradford (Bleu de coomassie) du commerce à diluer au 1/5.

Solution étalon d'albumine (SAB) à 2mg/ml.

5.1.3. Mode Opérateur

Dans des tubes assez gros pour permettre un pipetage ultérieur à l'aide de la Pipettman, réaliser la gamme suivante :

No tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentration SAB en mg/ml	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.75	1	1.5	2
V de SAB en μ L	0	10	20	40	60	75	100	150	200
V d'eau en μ L	200	190	180	160	140	125	100	50	0

Echantillons :

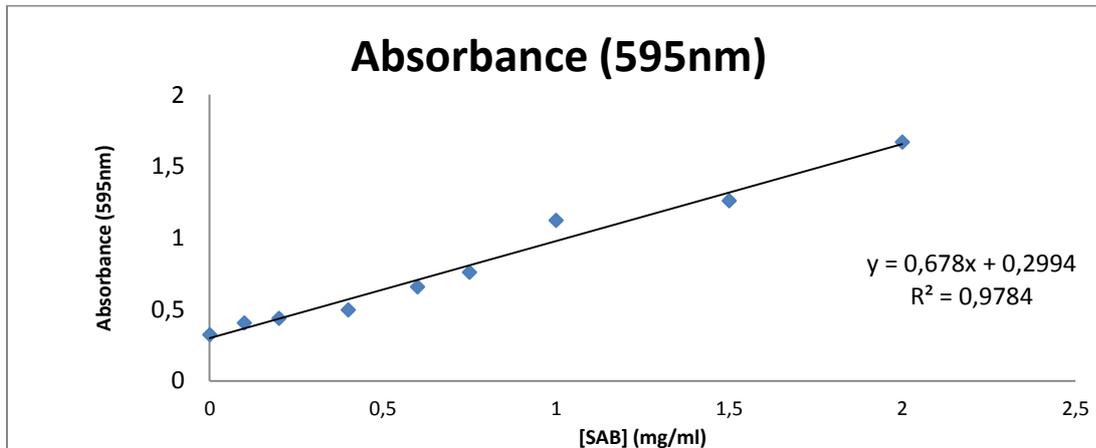
- Transférer respectivement 0.1 ml de chacun des tubes précédents dans *un tube propre*.
- Ajouter 5 ml de réactif de Bradford dilué.
- Lire l'absorbance à 595 nm contre de l'eau.

Les essais sont effectués dans les mêmes conditions sur 100 μ l d'extraits protéiques :

Volume échantillon 100 μ l

Réactif de Bradford 5ml

5.1.4. Calculs



Tracer $DO=f([C])$ puis déterminer la concentration de la solution inconnue en mg par ml.

Calcul de l'activité spécifique : Exprimer celle-ci en U_2 /mg de protéines.

6. chromatographie d'échange d'ions

Après l'extraction, la purification a été réalisée à l'aide de la chromatographie d'échange d'ions en utilisant les appareils de chromatographie pharmacia Biotech® et Akta®. La résine utilisée est le Q-Sepharose.

Mode Opératoire

Tout d'abord, la résine a été équilibrée dans le tampon Tris-HCl 50mM pH8.1 EDTA 1mM β -mercapto-éthanol d'un côté et dans le tampon phosphate de sodium pH 6 de l'autre côté. 9 ml d'échantillon sont injectés dans la colonne. Les premières molécules éluées de la colonne sont celles qui ne sont pas absorbées sur la phase stationnaire (fraction 1). Ensuite, les molécules fixées au gel sont éluées en ajoutant une concentration croissante de NaCl.

A pH 6 dans le tampon phosphate de Sodium, après la sortie du pic 1, les fractions 2 et 3 sont éluées en concentration croissante en NaCl (gradient de concentration) de 0 à 0,35M dans la pompe B. La fraction 4 a été élué en concentration de NaCl à 1M

A pH 8.1 dans le tampon Tris-HCl 50mM EDTA 1mM β -mercapto-éthanol 3mM pH8.1, l'éluion a été effectué par plateaux de concentrations en NaCl à savoir 0.15 mol/l, 0.4 mol/l,

et 1mol/l. Les fractions 2, 3, 4 sont éluées en concentration 15% en NaCl et la fraction 5 est élué en concentration 40% Le débit est réglé de 0.2 à 0.5 ml/min et la vitesse de déroulement de papier variait de 0.1 à 0.25 cm/min.

Un lavage avec de l'éthanol à 20% permet de conserver le gel de tout développement bactérien.

7. Mesure de l'activité enzymatique avec l'azocaseine

Mode opératoire

Le substrat et l'enzyme sont ajustés à la température de la réaction. L'essai est démarré dès que 150µL d'enzyme sont ajoutés à 250 µL de substrat (azocaséine 2%). Le mélange est incubé à 40°C pendant 1h. Un témoin est préparé, en mélangeant 150 µL de tampon à 250 µL de substrat. La réaction est arrêtée en ajoutant 1.2ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10%. Un 'témoin blanc' doit être préparé en ajoutant dans l'ordre : l'enzyme (150 µL), le TCA (1.2ml), le substrat (250 µL). Cet essai permettra de déterminer l'absorbance au temps zéro.

Après l'incubation et l'ajoute de 1.2ml de TCA les échantillons sont mixés au vortex et laissés reposer pendant 15 min. Les essais sont centrifugés à 8000 g pendant 5minutes.

1.2 ml de surnageant sont prélevés et y ajouté 1.4 ml NaOH 1mol/L pour neutraliser le TCA. L'absorbance est lue à 440nm contre un blanc à l'eau distillée.

Calculs

Volume d'échantillon=0.15ml

Δ Absorbance= Absorbance échantillon-Absorbance T0.

Temps Hydrolyse=60 min

Masse des protéines=CV (mg) (la concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford)

Activité= Δ Abs/temps d'hydrolyse/m protéines. (Unités d'absorbance/min/mg)

8. Electrophorèse

8.1. Electrophorèse en SDS –PAGE

Préparation des différents gels

Préparation des tampons

1. Tampon Tris HCl 1.5 M pH 8.8 SDS 0.4%

Tris = 90.086g

VSDS 10% = 20ml

Vf = 500ml

2. Tampon Tris HCl 0.5M pH 6.8 SDS 0.4%

Tris = 30,29g

VSDS 10% =20ml

Vf = 500ml

	Gels de Migration		Gel de concentration
	5%	20%	
Solutions :	Acrylamide 5%	Acrylamide 20%	Acrylamide 5%
Acrylamide – Bisacrylamide 40%	1.25ml	5ml	0.75ml
Tampon Tris pH 8.8 SDS 0.4%	2.5ml	2.5ml	-
Tampon Tris Hcl pH 6.8 SDS 0.4%	-	-	1.5ml
Glycérol	-	1.5ml	
Eau Distillée	6.25ml	1ml	3.75ml
Persulfate d'ammonium (ASP) 10%	50µL	50µL	50µL
TEMED	5µL	5µL	5µL

Tampon de migration	Tris	6.057g
	Glycine	28.82g
	SDS 10%	2ml
	Eau distillée	2l
Tampon gel échantillon	Tampon Tris HCl 0.5 M pH 6.8	6.25ml
	SDS 10%	10ml
	Saccharose	5g
	Bleu de bromophénol	0,05g
	β -mercaptoéthanol	2.5ml
	Eau distillée	50ml
Échantillons pour dépôt	<p>Dans les tubes eppendorf, mettre pour chaque échantillon</p> <ul style="list-style-type: none"> - 50μl d'échantillon - 50μl de tampon gel échantillon <p>Le mélange est chauffé au bain marie sec à 100°C pendant 3 minutes ainsi que les protéines témoins.</p> <p>Les dépôts des échantillons et protéines témoins sur les plaques d'électrophorèse ont été réalisés avec une syringe 25μL qui doit être rincé à chaque injection. Les volumes des échantillons déposés sont 2μL pour l'EBC et les protéines témoins et 25μL des fractions.</p>	

Protéines temoins Les protéines témoins utilisées sont l'albumine bovine, la β -galactosidase, l'hémoglobine, l'ovalbumine et le chymotrypsinogene A. 2mg de chaque protéine témoin sont mélangé et bien homogénéisé dans 1ml de tampon gel échantillon.

Paramètres Mode Constant, courant-intensité 35A, limite voltage 500V, limite puissance free, temps 3h00min, Programme 1 SDS-PAGE.

électrophorèse

Coloration du gel Solution Bleu de Coomassie R250 pendant au moins 1 heure

Décoloration du gel Solution de décoloration : Acide Acétique 10%

8.2. Electrophorèse en Native – PAGE

<u>Gels :</u>	Gel Inferieur (gel de migration)	Gel supérieur (gel de concentration)
	Acrylamide 10% Vf=20ml	Acrylamide 4% Vf= 10ml
<u>Solutions :</u>		
Tampon Tris-HCl 3M pH 8.9	5ml	-
Tampon Tris-HCl 1M pH 6.8	-	1.25ml
Solution Acrylamide-Bisacrylamide 40%	4ml	1ml
Eau distillé	10.6ml	7.4ml
TEMED	10 μ L	10 μ L
ASP 10%	20 μ L	20 μ L

Tampon de migration	Tris-HCl 15mM pH 8.3 Glycine 15mM
Tampon gel échantillon	2ml glycerol, 1ml tampon 1B, 2.5 mg Bleu de Bromophenol
Échantillons pour dépôt	30 μ L d'échantillon et 10 μ L de tampon gel échantillon
Protéines témoins	Sérum de bœuf et SAB : 50 μ L de protéines et 50 μ L tampon gel échantillon

Paramètres électrophorèse	Mode Constant, constant -intensité 35A, limite voltage 500V, limite puissance free, temps 3h00min Programme : 2 Native Page
Coloration	Pendant 4h Solution TCA 12.5% (V_{TCA} 62.5ml pour $V_f=500$ ml) Il faut verser 50ml de la solution de Bleu de Coomassie G250 2.5g/l dans le V_f de TCA et laisser dissoudre au moins 30 min.
Décoloration	Acide Acétique 10%

8.3. Electrophorèse sur gel à la caséine avec SDS

	Gels de migration		Gel de concentration
Solutions :	Acrylamide 5 %	Acrylamide 20 %	Acrylamide 5%
Acrylamide- bisacrylamide 40 %	1.25 ml	5 ml	0.75ml
Tampon tris-HCl pH 8.8 SDS 0.4%	2.5 ml	2.5 ml	-
Tampon Tris – HCl pH 6.8	-	-	1.5ml
Eau distillé	5.25 ml	-	3.75ml
Glycérol	-	1.5 ml	-
Caséine 0.8%	1 ml	1 ml	
ASP 10 %	50 μ L	50 μ L	50 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L	5 μ L

Tampon de migration	Tris-HCl 15mM pH 8.3 Glycine 15mM
Tampon gel échantillon	Cf : électrophorèse en SDS – PAGE
Échantillons pour dépôt	50 µL d'échantillon et 50 µL de tampon gel échantillon
Protéines témoins	Cf : électrophorèse en SDS - PAGE
Paramètres électrophorèse	Mode Constant, courant-intensité 35A, limite voltage 500V, limite puissance free, temps 3h00min, Programme 1 SDS-PAGE
Révélation	Deux Bain de triton à 2.5% (30min chacun) (pour dissoudre le triton il faut chauffer l'eau à 37° C, allumer l'agitateur et après verser le triton)
Incubation	Dans le tampon phosphate de sodium 50mM pH6 pendant 2heures à 37° C
Coloration	Solution Bleu de Coomassie R250 pendant au moins 1 heure
Décoloration	Acide Acétique 10%

8.4. Electrophorèse sur gel à la caséine en Native - PAGE

Solutions	gel de migration	gel de concentration
Acrylamide – Bisacrylamide 40%	4ml	1ml
Tampon Tris – HCl 3M pH 8.9	5ml	-
Tampon Tris – HCl 1M pH 6.8	-	1.25ml
Eau distillée	8.6ml	7.4ml
Caséine 0.8%	2ml	-
Persulfate d'ammonium (ASP) 10%	20µL	50µL
TEMED	10µL	10µL

Tampon de migration	Tris-HCl 15mM pH 8.3 Glycine 15mM
Tampon gel échantillon	Cf : électrophorèse en Native – PAGE
Échantillons pour dépôt	30µL d'échantillon et 10 µL de tampon gel échantillon
Paramètres électrophorèse	Mode Constant, constant-comment-intensité 35A, limite voltage 500V, limite puissance free, temps 3h00min Programme : 2 Native Page
Incubation	Dans le tampon phosphate de sodium 50mM pH6 pendant 2heures à 37° C
Coloration	TCA 12.5% pendant 4heures
Décoloration	Acide acétique 10%
Protéines témoins	Sérum bovine et SAB- 50 µL de protéines et 50 µL tampon gel échantillon

8.5. Electrophorèse à pH neutre

	Gel inférieur (pH 6.8)	Gel supérieur (pH 8)
Solutions :	Acrylamide 10 % Vf=20 ml	Acrylamide 4 % Vf= 10ml
Acrylamide- bisacrylamide 40 %	5 ml	1 ml
KOH 0,5M	2 ml	1ml
MOPS 1.065M	4ml	591 µL
Eau distillé	8.97 ml	5.35 ml
Glycérol	-	2 ml
ASP 10 %	20 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL

Tampon de migration	Pour 1l : 4.6059g MOPS et 15.515g Histidine
Tampon gel échantillon	Glycérol 2ml Tampon MOPS-KOH 1ml un peu de bleu de Bromophenol
Protéines témoins	2mg Chymotrypsinogène 2mg Albumine 2mg Ovalbumine 2mg Hémoglobine
Échantillons pour dépôt	30 µL échantillon 10 µL tampon gel échantillon
Paramètres électrophorèse	Mode constant – courant, 12 mA, Watt Free, 5 h de migration.
Coloration	Bleu de Coomassie R-250
Décoloration	Solution acide acétique – éthanol – eau

8.6 Electrophorèse à pH acide en Native – PAGE

Solutions	Gel inférieur (pH 4,5)	Gel supérieur (pH 6,5)
	Acrylamide 10 % Vf=20 ml	Acrylamide 4 % Vf= 10ml
Acrylamide- bisacrylamide 40 %	5ml	1 ml
glycérol	-	2ml
KOH 0,06M	2.4ml	1.2ml
Acide acétique 100 %	183 µl	34 µL
Eau distillé	12.36ml	5.7ml
ASP 10 %	50 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL

Tampon de migration	31.18g β -alanine 8ml acide acétique Vf=1L
Tampon gel échantillon	10% Glycérol (2ml) 0.002% Bleu de méthylène Tampon gel supérieur dilué au ¼
Échantillons pour dépôt	30 μ L échantillon 10 μ L tampon gel échantillon
Paramètres électrophorèse	Cf gel électrophorèse en Native – PAGE sauf pour courant 20 mA et temps de migration 3.5h