

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques

Présenté par :

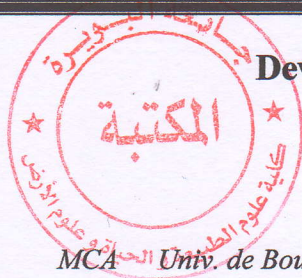
Ouarab Nassima & Hamri Yasmina

Thème

Comparaison des méthodes d'extraction de la pepsine de poulet : Application de l'extrait pré-purifié dans la fabrication du fromage à pâte molle type camembert

Soutenu le : 02/ 07/ 2017

Devant le jury composé de :



Mr Bourmine L.

MCA Univ. de Bouira

Président

Mme Bensmail S.

MAA Univ. de Bouira

Promotrice

Mme Bourfis N.

MAA Univ. de Bouira

Examinatrice

Année Universitaire : 2016/2017

Table des matières

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Introduction.....	01

Chapitre I : partie Bibliographique

I. Généralités sur le lait.....	03
I.1. Définition.....	03
I.2. Composition du lait.....	03
I.2.1. Les caséines.....	04
I.2.1.1. Caséine α_s	06
I.2.1.2. Caséine β	06
I.2.1.3. Caséine κ	06
II. Les enzymes coagulants le lait.....	06
II.1. Définition.....	06
II.2. Les protéases.....	07
II.2.1. Protéases d'origine végétale.....	07
II.2.2. Protéases d'origine microbienne.....	07
II.2.2.1. Protéases d'origine bactérienne.....	08
II.2.2.2. Protéases d'origine fongique.....	08
II.2.2.3. Chymosine produite par fermentation (FPC).....	08
II.2.3. Protéases d'origine animale.....	08
II.2.3.1. La présure.....	09
II.2.3.2. La pepsine.....	09
1) La pepsine bovine.....	09
2) La pepsine porcine.....	10
3) La pepsine de poulet.....	10
II.3. Propriétés des enzymes coagulants le lait.....	12
III. Fabrication des fromages.....	13
III.1. Le fromage.....	13
III.2. Définition.....	13

III.3. Les différentes étapes de fabrication de fromage.....	13
III.3.1. Le traitement thermique du lait.....	13
III.3.2. La coagulation.....	14
III.3.2.1. Coagulation par voie acide.....	14
III.3.2.2. Coagulation enzymatique (Technologie présure).....	14
1) Réaction primaire (phase enzymatique).....	15
2) Phase secondaire	15
III.3.2.3. Coagulation mixte.....	15
III.3.3. L'égouttage.....	15
III.3.4. Le salage.....	16
III.3.5. L'affinage.....	16

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I.1. Matériel.....	18
I.1.1. Matériel non biologiques.....	18
I.2.1. Matériel biologique.....	19
II. Méthodes.....	19
II.1. Extraction de la pepsine.....	19
II.2. Méthodes de purification.....	22
II.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	22
II.2.2. Dialyse.....	23
II.2.3. Paramètres de purification.....	24
II.3. Méthodes de dosage.....	24
II.3.1. Détermination de l'activité coagulante (AC).....	24
II.3.2. Dosage des protéines.....	25
II.3.3. Mesure de l'activité protéolytique (AP).....	26
II.4. La caractérisation des extraits brut et dialysé de la pepsine.....	27
II.4.1. Effet du pH.....	27
II.4.2. Effet de la température.....	27
II.4.3. Effet de la teneur en ion calcium (CaCl ₂).....	28
II.5. Essai de fabrication de fromage à pâte molle non cuite type Camembert.....	28
II.5.1. Définition.....	28
II.5.2. Les étapes de fabrication.....	29

II.5.2.1. Collecte et stockage de lait cru.....	29
II.5.2.2. Standardisation	29
II.5.2.3. Pasteurisation.....	29
II.5.2.4. Maturation et ensemencement.....	29
1) Les ferments d'acidification.....	30
2) Les ferments d'affinage.....	30
II.5.2.5. L'emprésurage.....	31
II.5.2.6. Tranchage, brassage et soutirage de lactosérum.....	32
II.5.2.7. Le moulage-égouttage.....	32
II.5.2.8. Le salage.....	32
II.5.2.9. L'affinage.....	32
II.6. Les analyses physicochimiques.....	34
II.6.1. Test de stabilité.....	34
II.7. Analyses microbiologiques.....	35
II.7.1. Recherche et dénombrement des coliformes.....	35
II.7.2. Recherche et dénombrement des germes totaux (FTAM).....	36
II.7.3. Recherche et dénombrement des staphylocoques.....	36
II.7.4. Recherche des clostridium Sulfito-Réducteurs « CSR ».....	36
II.8. Rendement fromager.....	37
II.9. Les analyses sensorielles.....	37

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Extraction de la pepsine de poulet.....	38
III.1.1. Extraction par macération.....	38
III.1.2. Extraction par sonication.....	40
III.1.3. Influence du temps de sonication.....	43
III.2. Optimisation de la précipitation différentielle.....	43
III.3. Pré-purification de la pepsine de poulet.....	46
III.4. Caractérisation des extraits enzymatiques de la pepsine de poulet.....	48
III.4.1. Effet de la température du lait.....	48
III.4.2. Effet du pH du lait.....	49
III.4.3. Influence de la concentration en CaCl ₂	50
III.5. Essais de fabrication de fromage à pâte molle type Camembert.....	51

Liste des abréviations

III.5.1. Analyses physico-chimiques du lait cru.....	51
III.5.2. L'acidité de lactosérum après caillage.....	52
III.5.3. Analyses physicochimiques des produits finis.....	52
III.6. Analyses microbiologiques du lait et produits finis.....	53
III.7. Rendement fromager.....	53
III.8. Analyse sensorielle.....	54
Conclusion.....	57
Références Bibliographiques.....	59

Annexes

ESD	Extrait Sec Dégraissé
EST	Extrait Sec Total
FAO	Food and Agriculture Organization
FAOSTAT	Statistiques données par la FAO « Food and Agricultural Organization »
FPC	Chymosine produite par fermentation
H%	Humidité
J.O.R.A	Journal Officiel de la République Algérienne
KDa	Kilo Dalton
MCA	Milk-Clotting Activity
MG	Moisture Grasp
MGM	Microorganism Growth Requirement Modified
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONS	Office National des Sanitaires
PA	Proteolytic Activity
pV	Poids/volume
PCA	Plot Count Agar
PM	Poids Moléculaire
UP	Unité Préure
US	Unité Soxhlet

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier la possibilité de substituer la présure par la pepsine de poulet comme agent coagulant du lait et de comparer l'effet de la pepsine à celui de la présure lors de la production fromagère.

Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé à l'extraction de la pepsine à partir des proventricules, et la caractérisation des extraits enzymatiques obtenus. Pour cela, on a appliqué deux méthodes d'extraction: la macération et la sonication en utilisant plusieurs solutions tampons. Les résultats obtenus indiquent que l'eau est la solution de choix qui répond aux critères recherchés (AC la plus élevée avec la teneur en protéine la plus faible). Cet extrait se caractérise par une $AC=2688,9\pm 3,001$ US/ml, qui augmente jusqu'à 24444,5 US/ml pour l'extrait précipité à 50%, obtenu après une optimisation du salting-out su sulfate d'ammonium.

La pré-purification assure l'obtention d'un extrait dialysé présente meilleur rendement en activité de 446,28% que celui brut et précipité, un rapport AC/AP qui dépasse la valeur de 5370 qui a une grande influence sur la qualité du fromage produit par cet extrait.

Les conditions optimales d'activité coagulante, des deux extrait brut et dialysés, ont été déterminées, et qui correspond à pH 5, une température du lait de 65 à 75°C avec une concentration de $CaCl_2$ dans le lait de l'ordre de 0,05 M.

En dernier, nous n'avons noté que le fromage fabriqué (Camembert) à partir de la pepsine de, présente des bonnes qualités microbiologique, physico-chimiques et organoleptique comparable à celle de la présure commerciale.

Mots clés : pepsine de poulet, proventricules, activité coagulante, sonication, purification, Camembert.

Summary

The aim of this work is to investigate the possibility of substituting rennet by chicken pepsin for milk coagulation and comparing the effect of pepsin to that of rennet in cheese making.

In order to achieve this objective, extraction of pepsin from the chicken proventriculus and characterization of the enzymatic extracts obtained were carried out. For this, two extraction methods were applied: maceration and sonication using several buffer solutions. The results indicate that distilled water is the solution of choice that meets the desired criteria (the highest MCA with the lowest protein content). This extract is characterized by a $MCA=2688.9\pm 3.001$ SU/ml, which increases up to 24444.5 SU/ml for the precipitated extract at 50% obtained after optimization of ammonium sulfate precipitation of the crude extract.

The dialyzed extract obtained after pre-purification has the better yield of 446.28% than the crude and the precipitated extracts, a MCA/PA ratio exceeding the value of 5370, which has a great influence on the quality of the cheese produced by this extract.

The optimum conditions of milk-clotting activity of the crude and dialyzed extracts of pepsin were determined and correspond to pH 5, a milk temperature of 65 to 75°C with a concentration of 0.05 M of $CaCl_2$ in milk.

At least, we noted that the soft cheese kind Camembert prepared by the dialyzed extract of pepsin, has a good microbiological, physico-chemical and organoleptic qualities similar to that obtained by the commercial rennet.

Key words : chicken pepsin, proventriculus, milk-clotting activity, sonication, purification, Camembert.

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو بحث امكانية استبدال المنفحة بببسين الدجاج بغية استعماله لتخثير الحليب و مقارنة تأثيره بالمنفحة في انتاج الجبن .

لتحقيق ذلك، فقد استخرجنا ببسين من proventricules ، و توصيف نوعية الانزيم . لهذا قمنا بتطبيق طريقتين للاستخراج: النقع و الصوتنة باستخدام محاليل متعددة . و تشير النتائج الى ان المياه المقطرة هي الحل المناسب للمعايير المطلوبة (مع اعلى مستوى من نشاط التخثر و ادنى مستوى من البروتينات) . و يتميز هذا العمل من قبل ملل / $AC=2688.9\pm 3009$ US ، و التي زادت الى ملل / 24444 US لهذا قد تم استخراج الراسب بنسبة 50% تم الحصول عليها بعد استخدام السولفات امونيوم ذو salting out .

هذه التنقية تضمن الحصول على افضل عنصر بعد dialyse و يقدر نشاط بنسبة 446.28% ، لمستخلص الراسب و غير الراسب ، AC/AP ان تتجاوز قيمة 5370 ، و التي لديها تأثير كبير على نوعية الجبن التي ينتجها هذا المستخلص .

الظروف المثالية لنشاط التخثر ، كلاهما مستخلص غير راسب و مستخلص dialyse ، و تم تحديده ، و الذي يتوافق مع pH 5 ، درجة حرارة الحليب من 65-75 درجة مئوية مع تركيز $CaCl_2$ في الحليب حوالي 0.05 .

و أخيرا لاحظنا ان الجبن المنتج (الكمبير) من الببسين ، لديه نوعية جيدة الميكروبيولوجية ، الفيزيائية و الكيميائية و الحسية مماثلة لتلك التي منفحة تجارية .

الكلمات الدالة : ببسين الدجاج ، proventricule ، نشاط التخثر ، الصوتنة ، التنقية ، الكمبير .