

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière: "Sciences Biologiques"

Spécialité: "Microbiologie Appliquée"

Etude comparative de la cinétique de coagulation du lait par la fromase 2200TL et la chymosine libres

Présenté et soutenu publiquement par

- BEKRI Aicha
- SMATEL Malika

Devant le Jury:

- Président: Melle Moulay M.
- Promoteur: Mr. Hadj Said A.
- Co-promoteur: Mr. Houcine L.
- Examineur: Mr Benbeguara M.

Année universitaire: 2017–2018

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

A ma très chère mère Fatma, aucune dédicace ne souffrait être assez

éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices, puisse dieu,

le tout puissant, te préserver et t'accorder sante, longue vie et bonheur

A mes amies : Malika, Nawal, Djahida, Habiba, Naima, Fatima, Amina,

Mokhetaria, Atika ...

A toute la famille de Bekri et Loualaa.

A mon ami Yassine.

A tous ceux qui aiment Aicha

Dédicace

Avec une énorme joie je dédie ce modeste travail aux chères personnes de ma vie. A ma chère mère, symbole de tendresse et d'affection qui m'a donnée le courage et tous ses sacrifices.

A mon cher père, pour le soutien qui m'a apporté durant toute ma vie scolaire et universitaire qui a toujours souhaité me voir dans le bon chemin qui j'ai pu lui offrir ce modeste travail comme un signe de témoignage de ce je lui dois, que dieu nous garde ce père extraordinaire.

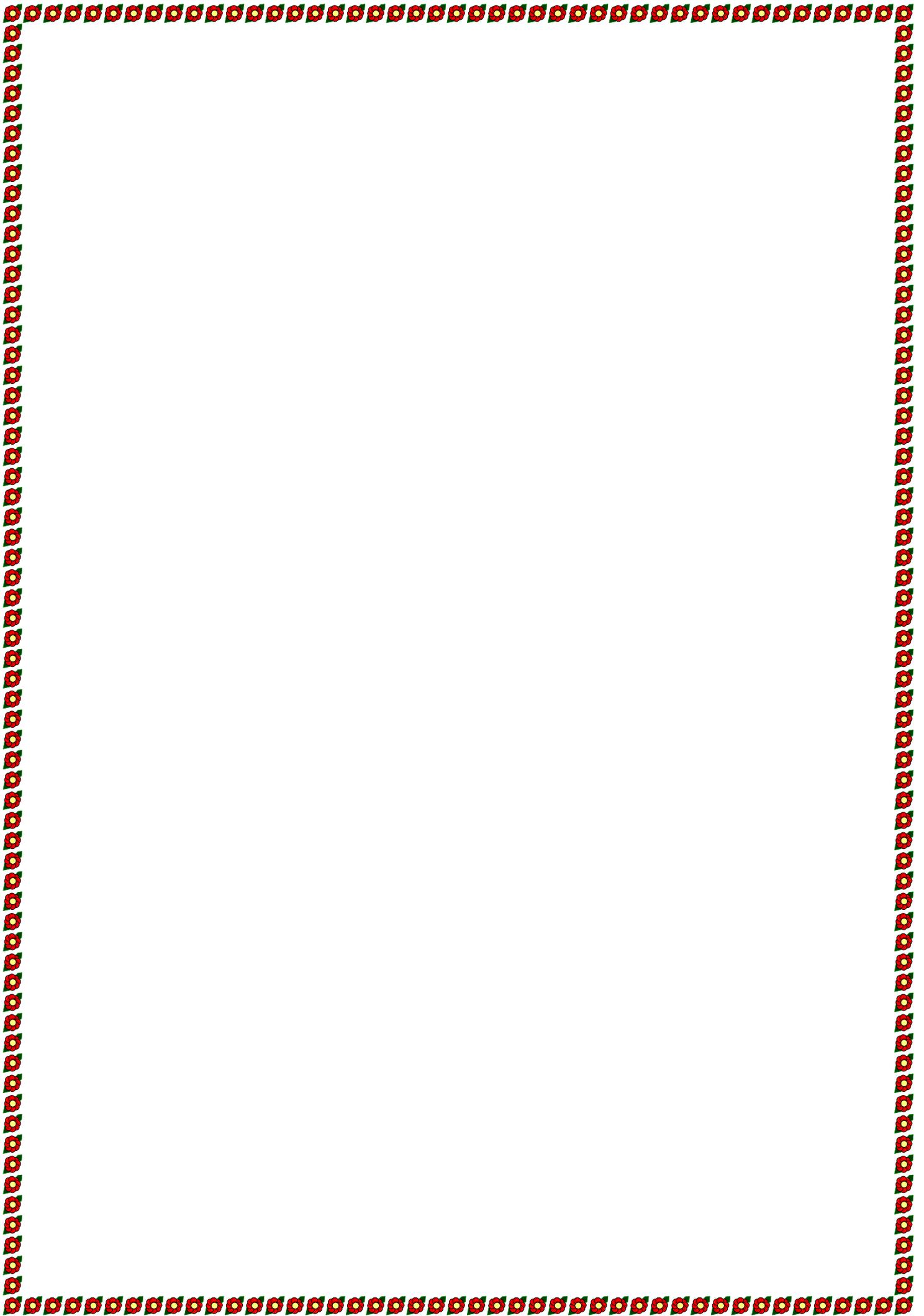
A mes très chères sœurs Fatima, Nacera, Hasiba, Saida.

A mon très cher frère Hocine, Mohamed, Brahim.

A mon ami Mohamed.

A toutes mes chères amies et toutes les étudiants de 2^{ème} années master microbiologie applique au l'université ibn Khaldoun - Tiaret

En fin, pour tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail



Remerciement

Avant toute chose, on remercie Dieu, tout puissant, pour nous avoir donné le courage, et la patience pour faire aboutir ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre promoteur de mémoire, M^r : HADJ SAID pour avoir bien voulu consacré beaucoup de son temps pour la réalisation de ce travail.

A Mr HOCINE pour son aide, sa gentillesse, ses conseils pendant notre période d'étude et pour l'honneur qu'il nous a fait de présider notre jury.

A M^{elle} Moulay Meriem et Mr Benbeguara Mourad, pour leurs conseils et d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos remerciements vont également à tous les techniciens du laboratoire de Technologie alimentaire de la Faculté des Sciences de la nature et de la Vie de l'Université Ibn Khaldoun-Tiaret

Résumé

Le but de ce travail est l'étude de la cinétique de coagulation du lait par deux présures (la chymosine et la fromase[®] 2200TL).

Pour la réalisation de cette étude nous avons utilisé différentes concentrations de lait entier en poudre (100g /l, 120 g/l, 130g/l, 140g/l, 150g/l) et une température de 35 °C et les deux enzymes aux concentrations de 1% et 1,55 % respectivement pour provoquer la coagulation.

Les résultats obtenus montrent que la chymosine possède une activité coagulante décroissante par rapport à la concentration du lait, soit 0,375 à 0,15 UP / ml et un temps de prise compris entre 29 et 45 minutes avec un temps de floculation allant de 240 à 600 secondes. Pour la fromase nous avons obtenu une activité coagulante allant de 55,55 à 20,83 UP/ml et un temps de prise de 25 à 40 minutes avec un temps de floculation variant entre 180 et 480 secondes.

L'étude comparative de la cinétique de coagulation du lait indique que la fromase[®]2200TL donne une coagulation rapide qui commence dès les premières minutes (environ 5 minutes) par contre dans le cas de la chymosine, la coagulation est lente et n'apparaît qu'après 15 minutes.

Mots clés : lait entier, présure, chymosine, coagulation, fromase[®]2200TL, cinétique

ملخص

الغرض من هذا العمل هو دراسة مقارنة لحركة تخثر الحليب من قبل اثنين من الإنزيمات. لتحقيق هذه الدراسة استخدمنا تركيزات مختلفة من مسحوق الحليب الكامل من 100 غم /لتر - 120 غم/لتر - 130 غم/لتر - 140 غم/لتر - 150 غم /لتر . ودرجة حرارة 35 درجة مئوية واثنين من الإنزيمات fromase chymosine و بتركيزات 1 % و 1.55% على التوالي لتحريض تخثر الحليب .

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن chymosine لديه نشاط تخثر متقلص نسبة إلى تركيز الحليب أي 0.375 إلى 0.15 UP /ml ووقت محدد يتراوح بين 29 و45 دقيقة مع وقت التلبد يتراوح من 240 إلى 600 ثانية بالنسبة لـ fromase حصلنا على نشاط تخثر يتراوح من 55.55 إلى 20.83 UP/ml ووقت محدد من 25 إلى 40 دقيقة مع وقت التلبد يتراوح بين 180 و480 ثانية .

تشير الدراسة المقارنة لحركة تخثر الحليب إلى أن fromase يعطي تخثرا سريعا يبدأ في الدقائق الأولى (حوالي 5 دقائق) بينما في حالة chymosine يكون تخثر الحليب بطيئا ولا يظهر إلا بعد 15 دقيقة

الكلمات المفتاحية : حليب كامل ، المنفحة ، chymosine ، تخثر الحليب ، fromase ، حركية التخثر .

Liste des abréviations

Do: Densité optique

Da: Dalton

FAO: Food and Agriculture Organization

UP: Unité présure

t_c : Temps de coagulation

B.S.A : Bovine Sérum Albumine

Introduction

Le lait, par ses grandes qualités nutritionnelles, a toujours été considéré comme un produit noble. En effet, c'est un aliment indispensable dans la vie de l'être humain, et dès les premiers jours de sa vie (**Veisseyre, 1975** et **Clement, 1978**).

Son instabilité biologique et physico-chimique constitue un facteur limitant de son utilisation en l'état (**Mahaut, 2000**). L'un des moyens les plus anciens de sa conservation, c'est de le transformer en fromage (**Boughllout, 2007**). Dans l'industrie fromagère, la coagulation est une étape essentielle, qui nécessite l'emploi d'agents coagulants, notamment la présure (**Belhamiche, 2005**). Un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne, ont la propriété de coaguler le lait. La présure animale (mélange de chymosine et de pepsine, sécrétée dans la caillette des jeunes ruminants nourris au lait), est l'enzyme coagulante la mieux connue (**Eck et Gillis, 1997**). Elle ne couvre qu'approximativement 30% de la production fromagère à l'échelle mondiale, car la disponibilité des caillettes des veaux non sevrés du lait, devient limitée (**Famelart, 1982**). Ce manque a suscité la recherche de succédanés de présure de différentes origines, parmi les enzymes de remplacement celles d'origine microbienne, utilisées à l'échelle industrielle.

Nous avons utilisé dans ce travail des présures industrielles d'origine animal (chymosine) et fongique (fromase[®] 2200 TL), pour étudier leurs cinétiques de coagulation du lait reconstitué à partir d'une poudre de lait entier « Célia », et ce dans le but de comparer entre leurs paramètres de coagulation.

1. Définition du lait

Le lait est défini comme « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée ». Il doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires (**Jeantet et al., 2008**).

2. Coagulation du lait

La coagulation du lait, qui se traduit par la formation d'un gel, résulte des modifications physicochimiques intervenant au niveau des micelles de caséine. Les mécanismes proposés dans la formation du coagulum diffèrent totalement suivant que ces modifications sont induites par acidification (lactosérum acide) ou par action d'enzymes coagulantes (lactosérum doux) (**Gillis, 1997**).

2-1. Coagulation par voie enzymatique

Elle consiste à transformer le lait de l'état liquide à l'état de gel par action d'enzymes protéolytiques, le plus souvent d'origine animale.

On distingue trois phases :

- phase primaire ou enzymatique: elle correspond à l'hydrolyse de la caséine k au niveau de la liaison phénylalanine (105) et méthionine (106) (**Horne, 2002**) .
- phase secondaire ou d'agrégation des micelles déstabilisées : à pH 6,6, elle commence lorsque 80 à 90% de la caséine k est hydrolysée (**Brule et al., 1997**).
- phase tertiaire ou phase réticulation : elle conduit à la formation du gel (**Schuck et al., 2008**).

2.2. Coagulation par voie acide

La coagulation acide consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique, par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par acidification chimique (injection de CO₂ ou addition de gluconodelta lactone) (**Dalgleish, 1982**).

2.3. Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification, la multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibre spécifique est à l'origine de la grande diversité des fromages à pâtes pressée non cuite (**Jeantet *et al.*, 2006**).

3. Facteurs de coagulation

Plusieurs facteurs influent sur la coagulation tels que concentration en enzyme, la température, le pH, la teneur en calcium, la composition en caséines la dimension des micelles, et les traitements préalables du lait tels que le refroidissement, traitement thermique et l'homogénéisation (Schuck *et al.*, 2008).

4. Enzymes coagulantes

➤ présure :

La présure est une enzyme qui se produit en jus gastrique, c'est l'agent de caillage le plus commun qui provient généralement de sources animales, mais aussi par la culture de certains microorganismes.

La dénomination « présure » est réservée à l'extrait soit liquide, soit pâteux soit pulvérisé ou comprimé après dessiccation, provenant de la macération des caillettes de jeunes bovidés tenus exclusivement au régime du lait (**Desmazeaud, 1981**).

La présure de veau est la préparation coagulante traditionnellement utilisée pour la coagulation du lait en vue de la fabrication du fromage. La majorité des fromages de petites quantités sont produits à partir de l'estomac de chevreau (**Ramet, 1985**).

D'un point de vue biochimique, la présure est une enzyme protéolytique appartenant au groupe des endopeptidases ayant la faculté d'hydrolyser les protéines au milieu de la chaîne, c'est une substance organique qui renferme un mélange de deux fractions actives : la chymosine et la Pepsine, avec une prédominance de la chymosine (**Lenoir *et al.*, 1985**).

La chymosine est la véritable enzyme de coagulation du lait, c'est une holoprotéine secrétée sous forme de prochymosine inactive leur activation en chymosine active se fait spontanément dans la caillette aux pH inférieur à 5 par l'hydrolyse de l'extrémité NH₂ terminale de la molécule. Son poids moléculaire est de 30 700 Da., sa stabilité est maximale

entre pH 5,0 et 6 avec un pH optimal d'activité proche de 5,5 et une température optimale d'activité de 42 °C l'activité décroît rapidement ; elle est affaiblie à température ambiante (20-25°C) et inhibée à pH 8 et au voisinage de 0°C et vers 65°C (Eck et Gillis, 1997).

➤ **Fromase[®] 2200 TL**

La fromase[®]2200 TL, enzyme coagulant le lait, obtenue par culture d'une souche sélectionnée de *Rhizomucor miehei* est maintenant bien connue des professionnels de la fromagerie du monde entier.

Depuis son apparition sur le marché en 1972, la fromase, protéase acide, s'est imposée comme pouvant remplacer la présure avec peu ou sans modification de la technologie, ni des qualités des fromages.

Si sur un certain nombre de paramètres comme le pH la teneur en calcium ionique, le comportement de la fromase[®]2200 TL est très proche de celui de la présure animale, son activité et sa stabilité vis-à-vis de la température sont nettement supérieures

1. 1. Objectif du travail

Notre travail a pour objectif :

- Etude de la cinétique de coagulation du lait par deux enzymes (la chymosine et la Fromase[®] 2200 TL).
- Faire une comparaison entre la cinétique des deux enzymes ainsi que leurs paramètres de coagulation pour déterminer celle qui convient le mieux pour la coagulation de lait.

1.2. Lieu et période de travail

Le travail expérimental s'est déroulé au niveau des laboratoires (biochimie et technologie alimentaire) de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de L'université Ibn khaldoun de Tiaret. Pendant une période allant du : 26 / 02/ 2018 au 19 / 04/ 2018.

1.3. Matériels et méthode

1.3.1. Matériels

1.3.1.1. Matériels biologiques

- **Le Lait:** Nous avons utilisé le lait reconstitué à partir d'une poudre de CELIA à 25% en protéine (**Annexe 01**)
- Chymosine, proviennent de GIPLAIT Tiaret et la fromase[®]2200TL disponible au niveau de laboratoire de la technologie alimentaire.

1.3.1.2. Matériels, appareillages, verreries et produits utilisés

Le matériel utilisé dans notre expérimentation est présenté dans **le tableau 01**

Tableau 01: Appareillages, verreries, produits chimiques et autres

Appareillage	Verreries	Produit chimiques	Autres matériels
-Étuve(MEMMERT)	- Béchers	-B.S.A.	- Seringues
-Bain marie(MEMMERT)	-Burette	-Réactif de	-Spatule
-Agitateur magnétique thermique (Stuart)	-Eprouvettes graduées	Bradford	-Barreau magnétique
-Balance électrique (Sertorius)	-Pipettes graduées	(annexe02)	-pissettes
-pH –mètre (Hanna)	-Tubes à essai		-papier aluminium
-Réfrigérateur(IRIS)	-Fioles jugées		-papier hygiénique
-Spectrophotomètre (UV)			-Micropipette
-Pompe sous vide			-l'eau minérale
			-papier filtre

1.3.2. Méthodes

1.3.2.1. Protocole expérimental

-Le Protocole expérimental de notre expérimentation est présenté par la **figure 01**.

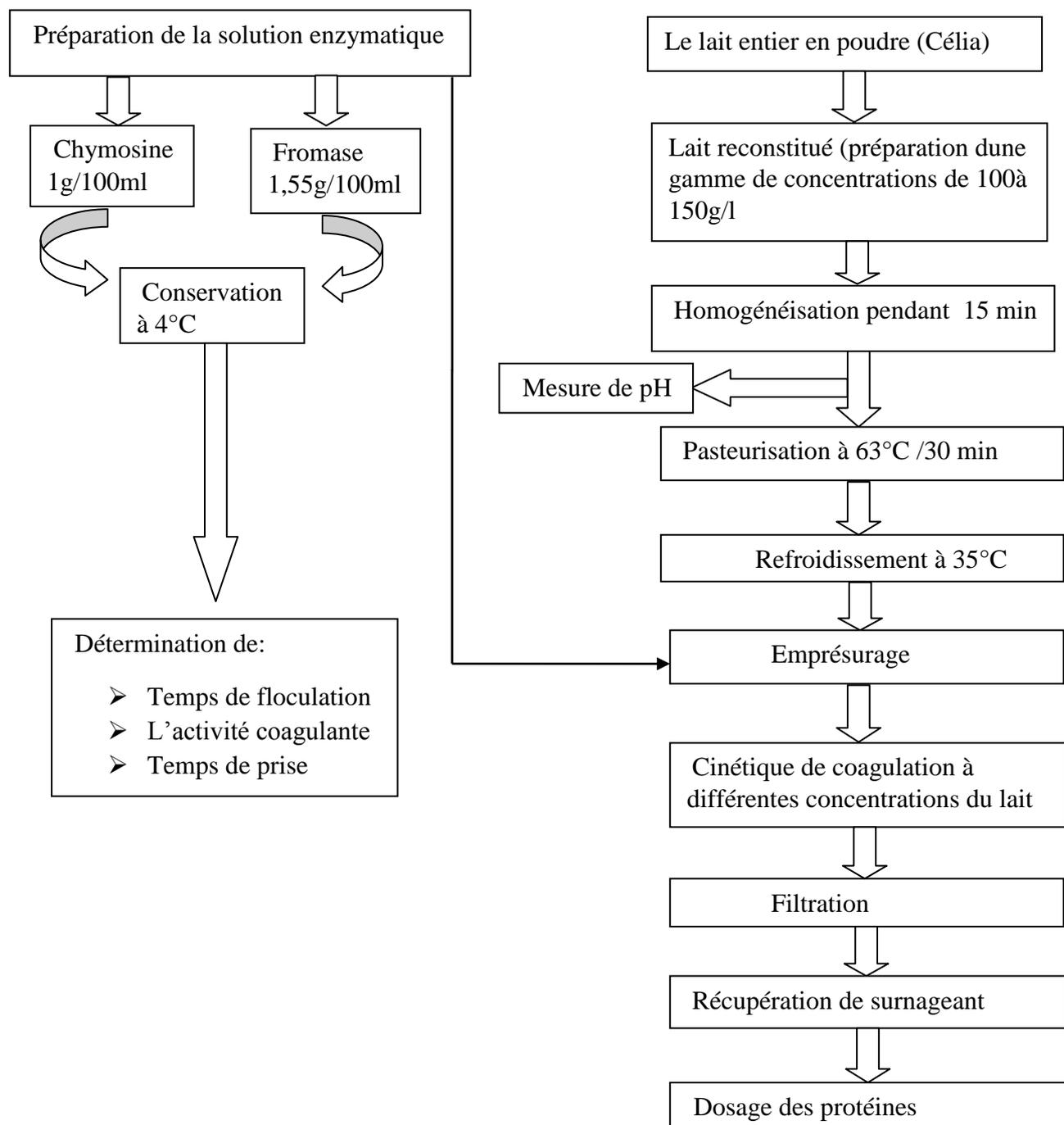


Figure 01 : Protocole expérimental

1.3.2.2. Préparation du lait

Les étapes de préparation du lait sont résumées dans la figure 02 :

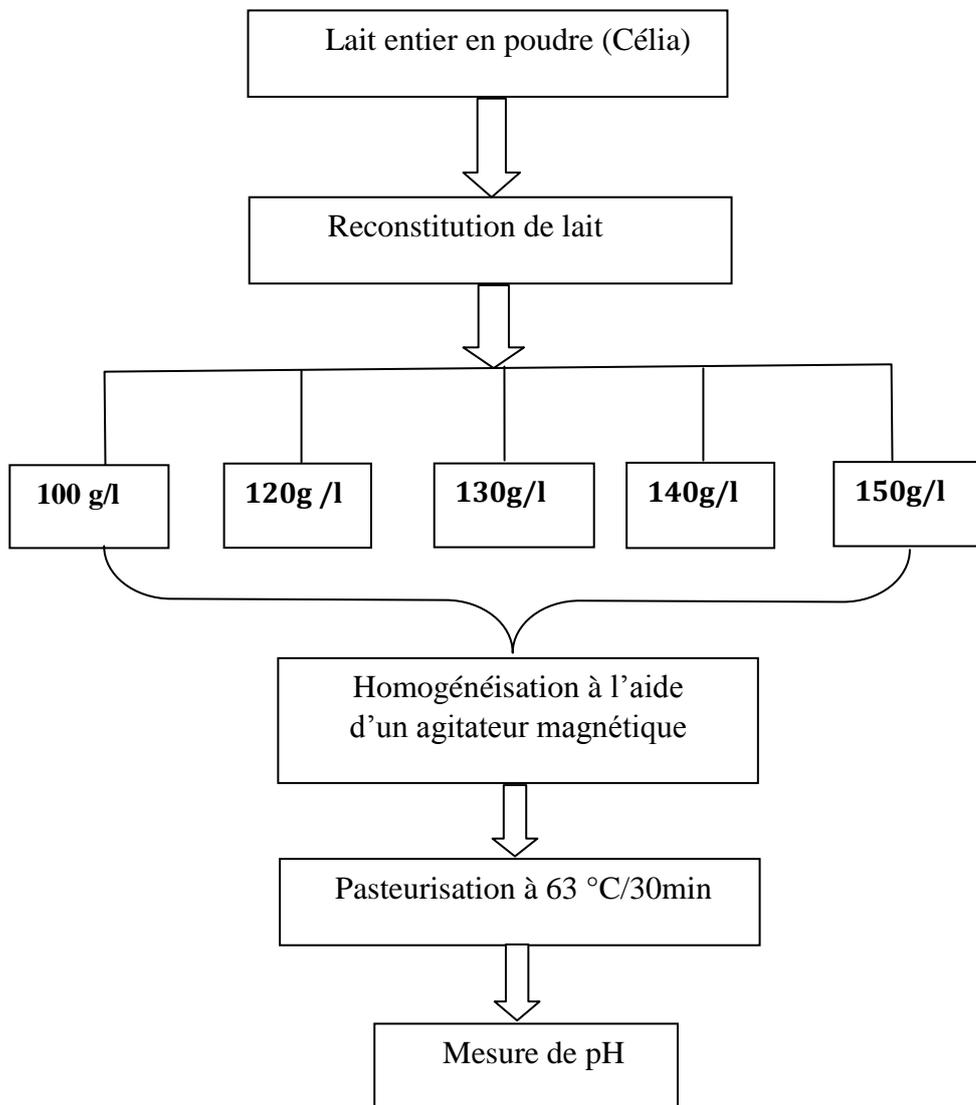


Figure 02 : préparation de lait

1.3.2.2.1. Mesure de pH

➤ **Principe :** La mesure de pH du lait (toutes les concentrations) s'effectue à une température de 20 à 22 °C à l'aide d'un pH mètre.

➤ **Mode opératoire**

La détermination du pH du lait se fait comme suit :

- Mettre un volume de lait (10ml) dans un bécher
- Plonger l'électrode du pH mètre dans le bécher qui contient le lait
- Lire la valeur du pH qui s'affiche sur l'écran.

1.3.2.3. L'activité enzymatique

1.3.2.3.1. Mesure du temps de floculation

Le temps de floculation est le temps d'apparition des premiers flocons visibles à l'œil nu après le contact entre le substrat et la solution enzymatique.

-La mesure du temps de floculation est faite à une température de 35°C avec des concentrations d'enzymes telles que les flocons visibles sur la paroi du tube soit comprise entre 3 et 10 min (**Alais, 1974**)

➤ **Mode opératoire**

9ml de lait (pH =6,6) pour la chymosine et 10ml pour la fromase[®]2200TL est versé dans un tube à essai et est maintenu au bain marie à 35°C pendant 15 minutes, le chronomètre est déclenché lors de l'addition de 1mL de la solution enzymatique pour la chymosine et de 10µL pour la fromase, le tube est ensuite soumis à une légère rotation, le chronomètre est arrêté dès l'apparition des premiers flocons sur la paroi du tube et le temps de floculation est noté (**Alais, 1984**). Le temps de floculation est employé dans le calcul de l'activité coagulante. La quantité d'enzyme retenue est celle qui donne un temps de floculation compris entre 300 et 360 secondes (**GREEN et al., 1984**). Pour cela nous avons fait varier la concentration d'enzyme de 10µL jusqu'à 30µL (fromase) pour déterminer celle qui convient.

1.3.2.3.2. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante est mesurée selon la méthode de Berridge (1945), et modifiée par **Sibouteur *et al.*, (2005)**. Elle est réalisée sur le substrat standard, la technique consiste à ajouter 1 ml d'extrait coagulant à 10ml de substrat puis noter le temps de coagulation à 35 °C.

Une unité d'activité enzymatique ou unité présure (UP), correspond au nombre d'unité de poids ou de volumes de lait qui peuvent être coagulés par 1ml de préparation coagulante.

$$UP = \frac{10 \cdot V}{Tc \cdot Q}$$

Où:

UP: unité présure.

V : volume de substrat utilisé (ml).

Q : volume de la solution enzymatique (ml).

Tc: temps de coagulation (s).

1.3.2.3.3. Détermination du temps de prise

Le temps de prise ou la durée de prise est le point d'apparition des premières gouttelettes du lactosérum sur la surface du gel, le coagulum devient rigide et ne coule plus sur la paroi du tube c'est-à-dire gélification apparente du lait (**luquet et Boudier, 1981 ; Alais, 1974**).

➤ Mode opératoire

9ml de lait pour la chymosine et 10ml pour la fromase[®]2200TL est versé dans un tube à essai et est maintenu au bain marie à 35°C pendant 15 minutes puis additionné de 1ml de la solution enzymatique (chymosine) et de 10 µl (fromase), le tube est laissé jusqu'à la solidification du gel et l'apparition des premières gouttelettes du lactosérum sur la surface du gel, le temps écoulé représente le temps de prise.

1.3.2.4. Etude de la cinétique de coagulation du lait à différentes concentrations

Pour étudier la cinétique de coagulation du lait, plusieurs étapes sont suivies, elles sont résumées dans la figure suivante :

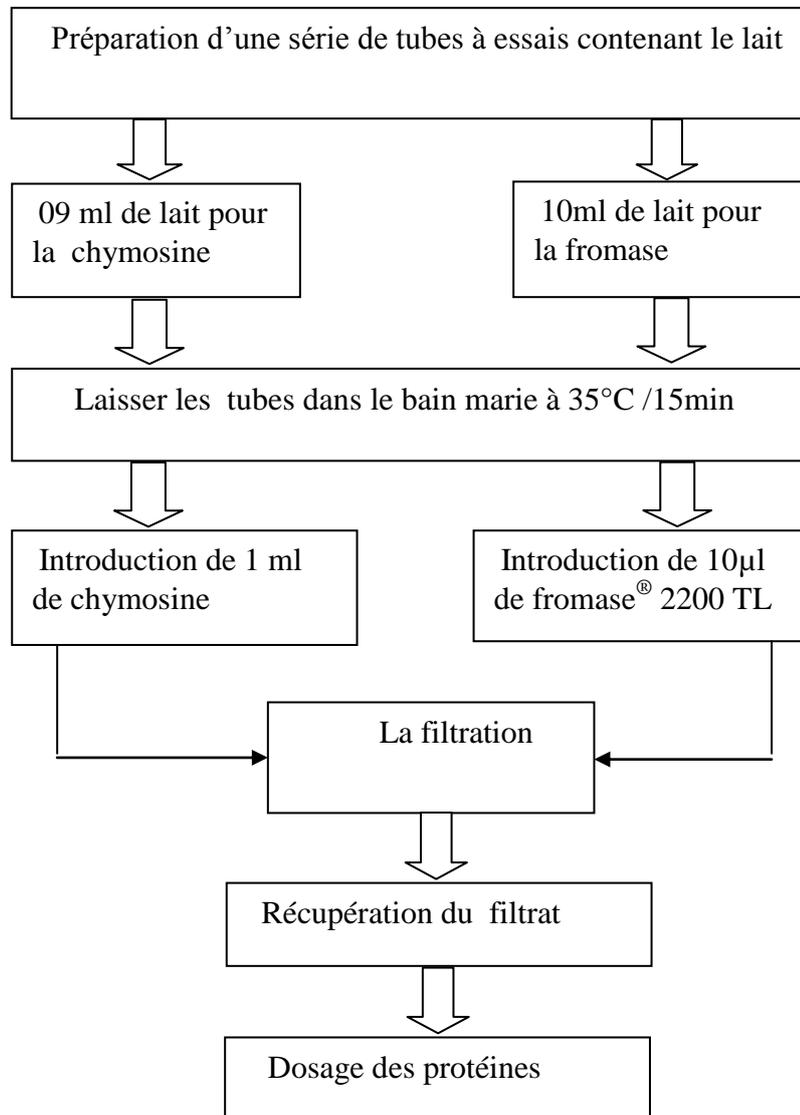


Figure 03 : cinétique de coagulation de lait à différentes concentrations.

3.1. pH du lait

Les résultats obtenus montrent que la valeur du pH de lait est de 6,6. Nos résultats sont les mêmes que ceux obtenus par **Dekki (2016)** ; **Cheftel (1984)** indique que le pH du lait varie entre 6,5 et 6,7.

D'après **Douik et al., (2003)**, le pH du lait varie entre 6,60 à 6,91, en dessus ou en dessous de cette valeur le lait est considéré comme anormal (**Alais, 1984**), en cas d'infection, le pH tend vers l'alcalinité ou l'acidité (**Fontaine, 1992**), donc on peut dire que le lait utilisé est normal.

3.2. Paramètres de coagulation

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau 02 : paramètres de coagulation de la chymosine.

Concentration de lait (g/l)	100	120	130	140	150
Temps de floculation (s)	240	300	360	480	600
Temps de prise (min)	29	32	35	40	45
Activité coagulante (UP/ml)	0,375	0,3	0,25	0,18	0,15

Tableau 03 : Les paramètres de coagulation de la fromase2200 TL.

Concentration de lait (g/l)	100	120	130	140	150
Temps de floculation (s)	180	240	300	420	480
Temps de prise (min)	25	29	30	35	40
Activité coagulante (unité/ml)	55,55	41,66	33,33	23,80	20,83

Le tableau 02 résume tous les paramètres de coagulation de la chymosine, le tableau 03 représente les paramètres de coagulation du lait pour la fromase.

Dans les tableaux 02 et 03, nous remarquons que le temps de floculation augmente (variant de 180s à 600 s) lorsque la concentration en poudre de lait augmente de 100 à 150 g /L, à la température de 35 °C, en présence de l'enzyme respectivement à 1% et 1,55% pour la chymosine et la fromase[®] 2200TL.

Les valeurs de nos résultats sont très loin à la valeur obtenue par **Aissaoui (2016)**, en utilisant une température de 37 °C et une concentration en poudre de lait de 125 g/L, en présence de la présure à 0,5 %, il a trouvé un temps de floculation de 24 min.

Dans les deux tableaux, on peut également noter que le temps de prise varie de 25 à 45 minutes.

Selon **FAO (1990)**, le temps de prise représente environ le double du temps de floculation

à la température de 30 °C et une concentration en poudre de lait de 130 g/l, en présence de la présure à 1%.

Nous remarquons aussi dans les deux tableaux que l'activité coagulante diminue lorsque la concentration du lait augmente, elle varie entre 55,55 et 0,15 UP / ml.

Les valeurs de nos résultats sont très loin de celles trouvées par **Benyahia (2013)**, où l'activité coagulante obtenue est de 44,12 UP/ml à la température de 30 °C et une concentration en poudre de lait de 100 g/L, en présence de la présure à 1%.

3.3. Cinétique de coagulation du lait à différentes concentrations

Les résultats obtenus de l'étude de la cinétique de coagulation du lait à différentes concentrations sont résumés dans les figures suivantes (**Annexe 03**)

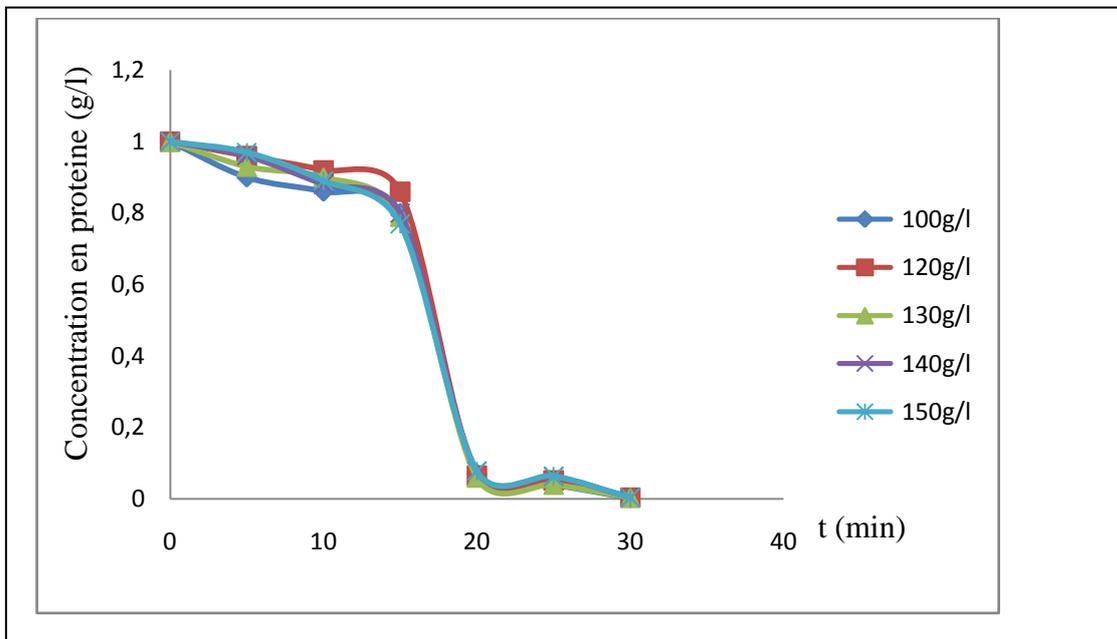


Figure04 : Cinétique de coagulation du lait à différentes concentrations (la chymosine).

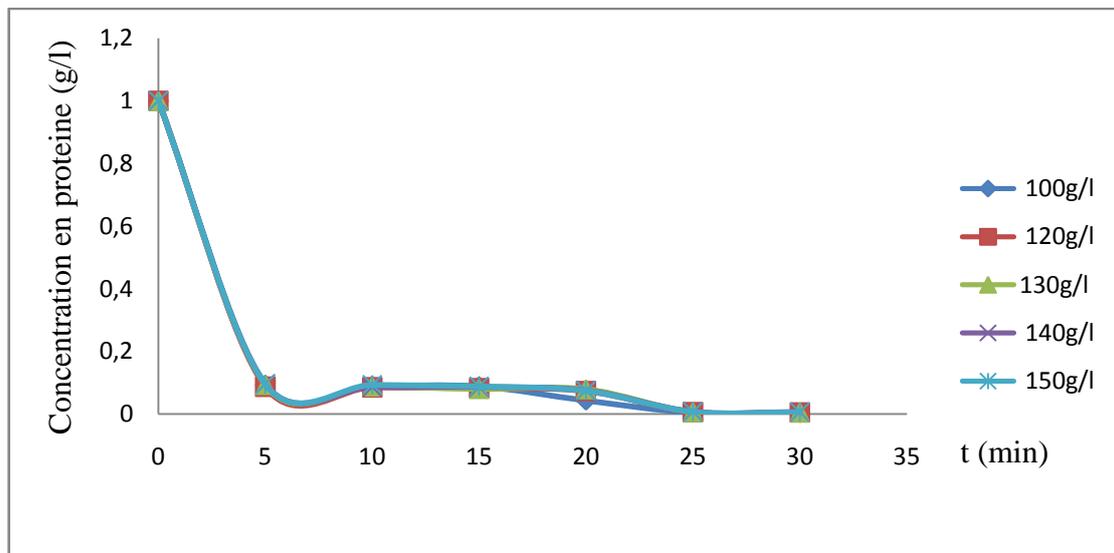


Figure 05 : Cinétique de coagulation du lait à différentes concentrations (la fromase[®] 2200 TL)

Les figures 04 et 05 représentent la concentration en protéines en fonction du temps pour la chymosine et la fromase®2200 TL

-Dans le cas de la chymosine la coagulation du lait n'apparaît qu'après 15 minutes environ quelque soit la quantité de poudre utilisée comme le montre la figure 04,

Par contre dans le cas de la fromase®2200 TL la coagulation du lait commence dès les premières minutes (environ 5 min) pour toutes les concentrations du lait comme l'indique la figure 05. Dans les deux cas nous remarquons que l'effet de la concentration du lait n'apparaît pas.

Selon **Cayot et Denis (1998)**, la coagulation du lait dépend à la fois du type et de la quantité de présure utilisée.

Selon **Lehembre (1986)**, La cinétique de coagulation enzymatique représentée par l'évolution de la concentration en protéines en fonction du temps, pendant la phase de latence ou la contrainte mesurée n'est pas significativement différent de zéro, se déroulent l'hydrolyse enzymatique de la caséines puis, la formation du coagulum se traduit par l'apparition d'une contrainte significativement différente de zéro, à laquelle est associé le temps de latence ou temps de gel.

Conclusion

Cette étude montre que les deux présures utilisées pour la coagulation du lait entier de marque Celia sont d'origine fongique, mais elles proviennent à partir de deux espèces différentes. Elles sont utilisées à l'échelle industrielle pour la fabrication du fromage.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que le pH du lait utilisé varie entre 6,6 et 6,64 comme l'indiquent plusieurs auteurs ; ces valeurs sont convenables aux deux présures pour donner une meilleure coagulation du lait, à la température de 35 °C.

L'étude cinétique de coagulation du lait indique que la chymosine provoque une coagulation plus longue par rapport à la fromase.

L'étude des paramètres de coagulation des deux enzymes industrielles, montre que la fromase possède un temps de floculation et un temps de prise courts par rapport à ceux de la chymosine et que l'activité coagulante de la fromase est supérieure à celle de la chymosine.

En conclusion des résultats obtenus lors de cette étude, en utilisant les doses indiquées par le fabricant des deux présures utilisées, nous avons remarqué que la fromase est mieux indiquée que la chymosine pour être utilisée dans la fabrication du fromage.

Références bibliographiques

- **Aissaoui N. (2016).**Analyses microbiologiques et physicochimiques de Hakka (Présure artisanale) utilisée pour la fabrication du Jben, mémoire de Magistère, Université d'Abou bakr belkaid Tlemcen, p. 51.
- **Alais C. (1974)** .Science du lait, principes des techniques laitières. 3^{ème} édition, Page 805.
- **Alais C. (1984).** Science du lait, principes de la technique laitière 4^{ème} éditions, sepaict, page 818.
- **Belhamiche N. (2005).** Extraction, purification et caractérisation de la coagulase de *Mucor pusillus*, thèse de doctorat, université de Tizi-Ouzou, page 70.
- **Benyahia F. (2013).** Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des pros ventricules de volailles ou profil de la filière lait en Algérie, thèse de Doctorat, Université de Constantine1, p. 66.
- **Boughllout H. (2007).** Coagulation du lait par la pepsine du poulet, mémoire de magistère .Université Mentouri: Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies .Agro-alimentaires .Constantine page 55.
- **Cayot P. et Denis C. (1998)** . Structure et techno-fonction des protéines du lait, ED technologie et documentation, p. 257.
- **Cheftel H. (1984).** Introduction a la biochimie et a la technologie des aliments, vol 01, édition Tech et Doc, *Lavoisier.* , 381.
- **Clement J.M. (1978)** . Dictionnaire des industriels alimentaires, Ed .Masson, Paris, page 172.
- **Dagleish D.G., (1982).** Milk proteins. Chemistry and Physics. In: Food proteins. Fox P.F. Condon J.J. Eds Applied Sci. Publi., London, 155-178.
- **Dekki A. (2016)** . Effet de la température sur les propriétés émulsifiantes du lactosérum doux dé lactosé , mémoire de master ,Université d'ibn khaldoun –Tiaret ,page 35.

Références bibliographiques

- **Desmajeud M.J. (1981).** Principales utilisations des enzymes en industrie laitière : Aspects scientifiques et techniques, IAA : 204.
- **Eck A., Gillis J., C. (1997).** Le fromage. 3ème édition, Lavoisier, paris, page 891.
- **Famelart M.H. (1982).** facteurs physicochimiques de la gélification du lait par la présure . DEA sei. Alimentaires, paris VII paris XIENSIA.
- **FAO (1990).** Guide to specification, milk clotting activity, FAO and Food Nutrition paper, p. 172-178.
- **Fontaine M. (1992).** Vade – mecum du vétérinaire, volume 03, office des publications universitaire, Page 1105.

- **Green M.L., Valler M.J. and Kay J. (1984) .** Assessment of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparation .Journal of dairy research, 51: 331- 340.

- **Horne D.S. (2002).** Caseins, micellar structure .In Roginski H., Fuquay.et Fox P.F. (Eds) encyclopedia of dairy sciences (pp. 1902 – 1909) .London .Academic Press.

- **Lehembre N . (1986).** Contribution à l'étude de la cinétique de coagulation mixte d'un lait reconstitue suivie par une méthode rhéologique: effet du calcium et étude multifactorielle de j'influence de la temperature, du pH et de la dose de pressure. ISAA science et technologie alimentaire.INA Paris- Grignon. DAA.ENSA Toulouse.

- **Lenoir J., Lambert G., Schmidt J.L et Tourneur C. (1985).** la maitrise du bioréacteur fromage, futur, Décembre : p.p. 23- 50.

- **Luquet F. M. Et Boudier J.F. (1981).** Lexique des termes utilisés en industrie laitière, 2^{ème} édition, *Lavoisier Tec et Doc .*, page 185

- **Mahaut M., Jeantet R., Brule G. (2000).** Initiation à la technologie fromagère. ED. TEC & Doc. , Lavoisier, paris, page 194.
- **Ramet J.P. (1985).** Le fromage, les variétés de fromages de basin méditerranéen .étude FAO, production et sante animale, Roma, Italien 48, 187.

- **Veisseyre R.J. (1975) .** Technologie du lait, Ed maison rustique, Paris, Page 428.

Annexe 04. Matériel et méthodes



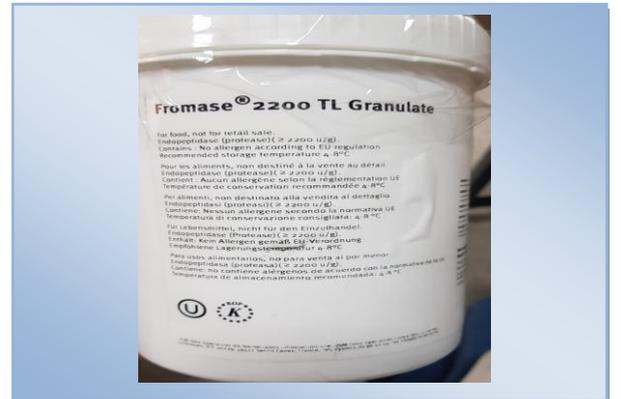
1. Lait entier utilisé (Celia)



2. Chymosine



3. Mesure de la DO
par le spectrophotomètre



4. Fromase® 2200 TL



5. Préparation de lait à différentes concentration



6. Mesure de pH



7. agitation magnétique



8. Filtration

ANNEXES 01

Tableau : 04 caractéristiques de lait en poudre celia

Valeurs nutritionnelles moyennes		Pour 100 g de lait en poudre celia	En % des AJR pour 1 verre (20g de lait en poudre celia)
Energie	kJ	2067	
	kcal	494	
Protéines	gramme	25	
Lipides	gramme	26	
Lactose	gramme	40	
Minéraux	gramme	6,3	
Calcium	gramme	950	24%
Vitamines			
A	µg	619	15%
D	µg	8	32%
B₁	µg	1200	22%
B₂	mg	1,4	20%
B₆	mg	1,5	21%
B₁₂	µg	2	16%
C	mg	60	15%
E	mg	17	28%

ANNEXE 02

1. Dosage des protéines de lactosérum selon la méthode de BRADFORD (BRADFORD, 1976).

1.1. Réactif de BRADFORD

- 10mg de Bleu de Coomassie G-250.
- 5ml d'éthanol à 96%.
- 10ml d'acide ortho phosphorique (H_3PO_4) à 85%.

Ce réactif doit être conservé à 4°C et à l'abri de lumière.

1.2. Solution de B.S.A

- B.S.A à 0,1%.

➤ Mode opératoire

1. Préparation du réactif de BRADFORD

Dissoudre 10mg de Bleu de Coomassie G-250 dans d'éthanol à 96%. Après dissolution complète, ajouter 10ml d'acide orthophosphorique (H_3PO_4). Compléter à 100ml et filtrer le réactif.

2. Préparation de solution de B.S.A

Préparation d'une solution mère de BSA à 0,1 % puis on réalise des dilutions de concentration croissantes selon le tableau suivant :

Tableau 05: Détermination de la concentration de B.S.A.

N°de tube	1	2	3	4	5
Volume de solution mère B.S.A (µl)	0	400	800	1200	1600
Volume d'eau (µl)	1600	1200	800	400	0
Réactifs de BRADFORD (µl)	400	400	400	400	400
DO à595nm	0	0,274	0,335	0,483	0,570
Concentration en B.S.A (g/l)	0	1	2	3	4

- Les tubes sont incubés à température ambiante pendant 5min à l'abri de la lumière.
- Lire les D.O à 595nm des 5 tubes (2, 3, 4, et 5) contre le blanc (tube N°1).
- Le tracé de la courbe d'étalonnage de la D.O en fonction de la concentration en B.S.A

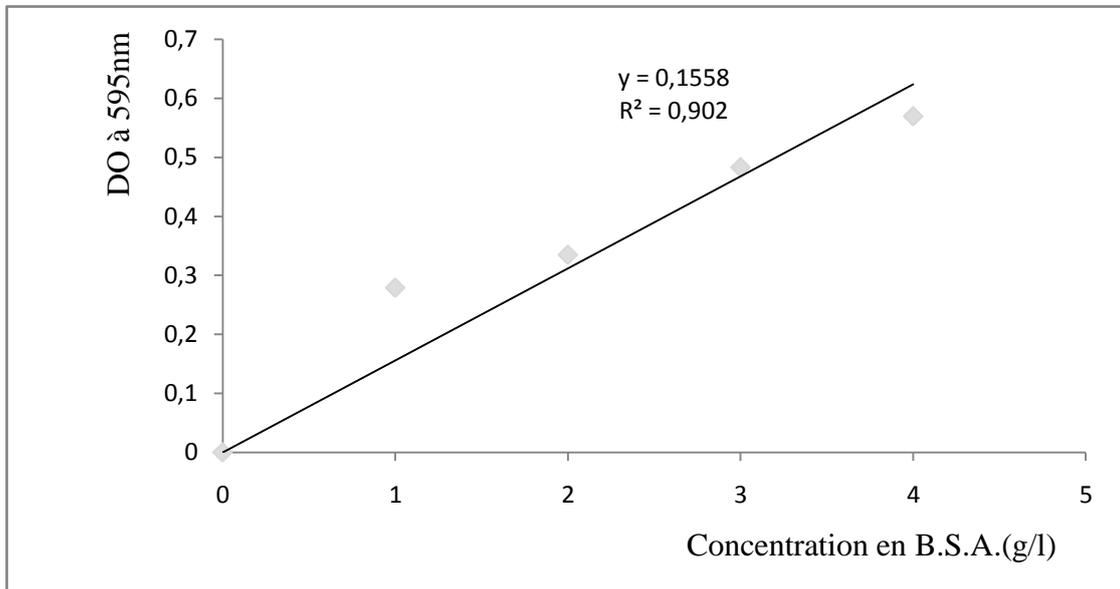


Figure 06 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines selon la méthode de Bradford (BRADFORD ,1976)

ANNEXE 03

3.1. Cinétique de coagulation du lait à différentes concentrations

Tableau 06 : Cinétique de coagulation du lait à 100g/l (Chymosine).

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Dilution	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}
DO à 595 nm	0,390	0,352	0,338	0,315	0,276	0,160	0,102
Concentration en B.S.A (g /l)	2503	2259,3	2169,4	2021	177,1	102,6	6,54
C /C ₀	1	0,9	0,86	0,8	0,07	0,04	0,002

Tableau 07 : Cinétique de coagulation du lait à 120 g /l (chymosine).

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Dilution	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}
DO à 595 nm	0,440	0,423	0,405	0,380	0,287	0,231	0,200
Concentration en B.S.A. (g /l)	2824	2715	2599,4	2439	184,2	148,2	12,83
C /C ₀	1	0,96	0,92	0,86	0,065	0,052	0,004

Tableau 08 : Cinétique de coagulation du lait à 130 g /l (chymosine).

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Dilution	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}
DO à 595nm	0,486	0,452	0,438	0,384	0,300	0,242	0,210
Concentration en B.S.A. (g /l)	3119	2901,1	2811,2	2464,6	192,5	155,3	13,4
C /C ₀	1	0,93	0,9	0,79	0,06	0,04	0,004

Tableau 09 : Cinétique de coagulation du lait à 140 g /l (chymosine).

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Dilution	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}
DO à 595 nm	0,520	0,504	0,458	0,416	0,409	0,329	0,221
Concentration en B.S.A. (g /l)	3338	3234,9	2939,6	2683,8	262,5	211,1	14,18
C /C ₀	1	0,96	0,88	0,8	0,078	0,063	0,004

Tableau 10 : Cinétique de coagulation du lait à 150g/l (Chymosine)

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Dilution	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}
DO à 595 nm	0,550	0,504	0,493	0,425	0,429	0,350	0,225
Concentration en B.S.A. (g /l)	3530	3234,91	3164,31	2727,8	275,3	224,6	14,44
C /C ₀	1	0,97	0,89	0,77	0,078	0,064	0,004

Tableau 11 : Cinétique de coagulation du lait à 100g/L (Fromase)

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Dilution	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}
DO à 595 nm	0,390	0,360	0,359	0,344	0,168	0,139	0,126
Concentration en B.S.A. (g /l)	2503	231	230,42	220,79	107,83	8,9	8,08
C /C ₀	1	0,092	0,09	0,088	0,043	0,004	0,003

Tableau 12 : Cinétique de coagulation du lait à 120g/l (Fromase)

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Dilution	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}
DO à 595 nm	0,440	0,385	0,377	0,362	0,320	0,282	0,258
Concentration en B.S.A. (g/l)	2824	247,1	241,9	232,3	205,3	18,1	16,55
C /C ₀	1	0,087	0,085	0,082	0,073	0,006	0,005

Tableau 13 : Cinétique de coagulation du lait à 130g/l (Fromase)

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Dilution	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}
DO à nm	0,486	0,453	0,423	0,388	0,379	0,285	0,266
Concentration en B.S.A. (g/l)	3119	290,7	271,5	249	244,51	18,29	17,07
C /C ₀	1	0,093	0,088	0,08	0,079	0,006	0,005

Tableau 14 : Cinétique de coagulation du lait à 140g/l (Fromase)

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Dilution	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}
DO à 595 nm	0,520	0,501	0,451	0,443	0,388	0,358	0,331
Concentration en B.S.A. (g/l)	3338	321,6	289,4	284,3	249	24,32	21,24
C /C ₀	1	0,096	0,086	0,085	0,075	0,007	0,006

Tableau 15. Cinétique de coagulation du lait à 150g/l (Fromase)

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Dilution	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}
DO à 595nm	0,550	0,522	0,510	0,484	0,409	0,364	0,344
Concentration en B.S.A. (g/l)	3530	335	327,3	310,6	262,51	23,36	22,07
C /C ₀	1	0,095	0,093	0,088	0,074	0,007	0,006

Résumé

Le but de ce travail est l'étude de la cinétique de coagulation du lait par deux présures (la chymosine et la fromase[®] 2200TL).

Pour la réalisation de cette étude nous avons utilisé différentes concentrations de lait entier en poudre (100g /l, 120 g/l, 130g/l, 140g/l, 150g/l) et une température de 35 °C et les deux enzymes aux concentrations de 1% et 1,55 % respectivement pour provoquer la coagulation.

Les résultats obtenus montrent que la chymosine possède une activité coagulante décroissante par rapport à la concentration du lait, soit 0,375 à 0,15 UP / ml et un temps de prise compris entre 29 et 45 minutes avec un temps de floculation allant de 240 à 600 secondes. Pour la fromase nous avons obtenu une activité coagulante allant de 55,55 à 20,83 UP/ml et un temps de prise de 25 à 40 minutes avec un temps de floculation variant entre 180 et 480 secondes.

L'étude comparative de la cinétique de coagulation du lait indique que la fromase[®]2200TL donne une coagulation rapide qui commence dès les premières minutes (environ 5 minutes) par contre dans le cas de la chymosine, la coagulation est lente et n'apparaît qu'après 15 minutes.

Mots clés : lait entier, présure, chymosine, coagulation, fromase[®]2200TL, cinétique

ملخص

الغرض من هذا العمل هو دراسة مقارنة لحركة تخثر الحليب من قبل اثنين من الإنزيمات. لتحقيق هذه الدراسة استخدمنا تركيزات مختلفة من مسحوق الحليب الكامل من 100 غم / لتر - الـ 120 غم/لتر - 130 غم/لتر - 140 غم/لتر - 150 غم /لتر . ودرجة حرارة 35 درجة مئوية واثنين من الإنزيمات fromase chymosine و بتركيزات 1 % و 1.55% على التوالي لتحريض تخثر الحليب .

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن chymosine لديه نشاط تخثر متقلص نسبة إلى تركيز الحليب أي 0.375 إلى 0.15 UP /ml ووقت محدد يتراوح بين 29 و45 دقيقة مع وقت التلبد يتراوح من 240 إلى 600 ثانية بالنسبة لـ fromase حصلنا على نشاط تخثر يتراوح من 55.55 إلى 20.83 UP/ml ووقت محدد من 25 إلى 40 دقيقة مع وقت التلبد يتراوح بين 180 و480 ثانية .

تشير الدراسة المقارنة لحركة تخثر الحليب الى ان fromase يعطي تخثرا سريعا يبدأ في الدقائق الأولى (حوالي 5 دقائق) بينما في حالة chymosine يكون تخثر الحليب بطيئا ولا يظهر إلا بعد 15 دقيقة

الكلمات المفتاحية : حليب كامل ، المنفحة ، chymosine ، تخثر الحليب ، fromase ، حركية التخثر .

