



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE de TLEMCCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département sciences de la nature et de la vie

Laboratoire de recherche Abou bakr Belkaid

MEMOIRE

Présenté par

Mammar Hanane

Khettab Aafaf

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En toxicologie industrielles et environnementales

Thème

Essai de purification des protéines de lactosérum ovin sur
résine échangeuses d'anions.

Soutenu le : 28/06/2020, devant le jury composé de :

Président	M ^r Chaouch Tarek	MCB	Université de Tlemcen.
Encadreur	M ^r Cherrak Sabri	MCA	Université de Tlemcen.
Examinatrice	M ^{me} Saker Meriem	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

En premier lieu, nous remercions ALLAH de nous avoir donné la volonté et le courage à fin d'achever notre modeste mémoire.

Il est toujours délicat de remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail d'initiation à la recherche.

Nos sincères remerciements s'adressent à notre encadreur Mr Cherrak Sabri pour son soutien et la qualité de ses conseils apportés à ce mémoire, ainsi qu'une grande compétence et beaucoup de gentillesse.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude au doctorant Mebarki Hamza qui nous a soutenues pendant tout notre stage pratique.

Nos remerciements vont aussi les responsables de laboratoires sans oubliant nos collègues qui ont contribué à créer une ambiance de travail agréable et propice à la coopération et au partage d'expériences.

Nous tenons à remercier les membres de Jury : Mm Saker Meriem et Mr Chaouch Tarik pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

Mon cher père, un homme qui a vécu pour sa famille.

« J'espère mon père que tu es fier de moi »

Ma chère mère, une femme qui a sacrifié sa vie pour ces enfants.

« J'espère ma mère que je serai toujours à la hauteur de tes attentes »

A mon frère Omar ; mes deux sœurs Nesrine et Rania.

A mon fiancé Hicham

A mon cher binôme Hanane ainsi qu'à toute sa famille

A ma chère copine Ahlam

*Merci et bon courage à toutes mes amies d'étude de la spécialité toxicologie
industriel et environnementale, je dis à vous tous pardon est bon chance.*

*Je remercie tous ceux qui par leurs encouragements, leur aide, leurs conseils
ou leurs critiques, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

KhettabAafaf.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

À mes très chers parents, pour leur patience, leur amour,

Leur soutien, et leur encouragement.

À mes deuxièmes chers parents Kadri et Karima.

À mes frères : Mohamed El Hassan El Hossayne et Yakoub.

À mon futur mari Youcef

Qui m'a toujours soutenu et voulait mon succès.

À mes tantes mes oncles cousins et cousines.

À toute la famille. Mammour Mellouk et Belasri.

**Et bien sûr à ma copine de mon chemin, ma sœur Aafaf qui est toujours à
côté**

de moi dans les rires que dans les larmes

À ma chère copine Ahlem et tout la promo toxicologie industriel

Mammour Hanane

Liste des abréviations

-BOD : demande biologique en oxygène

-pH : potentiel d'Hydrogène

-EST : extrait sec total

-MG : matière grasse

-ANP : azote non protéique

- α 1-CN : α 1-caséine

- α 2-CN : α 2-caséine

- β -CN : β -caséine

- κ -CN : κ -caséine

- β -Lg : β -Lactoglobuline

- α -La : α - Lactalbumine

-SA : sérum albumine

-Pp: protéase peptone

-Lf: lactoferrine

-LP: lacto-peroxydase

-GG: globules gras

- μ m: micromètre

-AG : acides gras

-AGs : acides gras saturés

-AGCC : acides gras à court chaîne

-AGI : acides gras insaturés

-AGM : acides gras mono insaturés

-KDA: kilo dalton

-Nd : non déterminée

-CE : commission d'enzymes

-V/V : volume/volume

-M : molaire

-CV : colonne volume

-SDS : dodécyl sulfate de sodium

-DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl

Liste des tableaux

Tableau 01. Composition chimique moyenne du lait de brebis analysé dans plusieurs régions du monde (composition de plusieurs sources).....	08
Tableau 02. Paramètres physiques de la matière grasse du lait de brebis (Assenât, 1985)...	12
Tableau 03. La composition des différents types de lactosérum (SamahIkram ,2018 ; Fick Michel, 2016).....	18
Tableau 04. Caractéristiques et proportions des principales protéines de lactosérum.....	19
Tableau.05. Exemples de protéases utilisées en industrie (Sundes et al 2017).....	28

Liste des figures

Figure.01. Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums (Alais, 1984).....	17
Figure.02. Le lactose (laitranslactose.com).....	12
Figure.03. Composition en sels minéraux pour 1 Kg de lactosérum(ThalisBussière, Jérémy Chatras, 2016).	21
Figure.04. Composition en vitamines pour 1Kg de lactosérum. (ThalisBussière, Jérémy Chatras, 2016).	21
Figure.05. Classification de protéase (Kumar et al, 2008).....	26
Figure.06. Piégeage du radical libre DPPH (parejp et al.2002).....	35
Figure.07. Pourcentage d'inhibition de 30µl du lactosérum ovin brut.....	43
Figure.08. pourcentage d'inhibition de 30µl de surnageant du lactosérum ovin du premier pic. (Après 3 heures d'incubation à 50°C).....	44
Figure.09. pourcentage d'inhibition de 50µl de surnageant du lactosérum ovin du premier pic (après 3 heures d'incubation à 50° C).....	44
Figure.10. pourcentage d'inhibition de 70µl de surnageant du lactosérum ovin du premier pic (après 3 heures d'incubation à 50°C).....	45
Figure.11. pourcentage d'inhibition de 30µl de surnagent du lactosérum ovin du premier pic (après 4 heures d'incubation à 50°C).....	45
Figure.12. pourcentage d'inhibition de 50µl de surnageant du lactosérum du premier pic (après 4 heures d'incubation à 50°C).....	46
Figure.13. pourcentage d'inhibition de 70µl de surnageant du lactosérum ovin premier pic (après 4 heures d'incubation à 50°C).....	46
Figure.14. pourcentage d'inhibition de 30µl de surnageant du lactosérum ovin du deuxième pic (après 3 heures d'incubation à 50°C).....	47

Figure.15. pourcentage d'inhibition de 50µl de surnageant du lactosérum ovin du deuxième pic (après 3 heures d'incubation à 50°C).....	47
Figure.16. : pourcentage d'inhibition de 30µl de surnageant du lactosérum ovin du deuxième pic (après 4 heures d'incubation à 50°C).....	48
Figure.17. pourcentage d'inhibition de 50µl de surnageant du lactosérum ovin du deuxième pic (après 4 heures d'incubation à 50°C).....	48
Figure.18. : pourcentage d'inhibition de 70µl de surnageant du lactosérum ovin du deuxième pic (après 4 heures d'incubation à 50°C).....	49

Liste des photos

Photo.01. solution de coloration.....	34
Photo.02. le lait ovin a coagulé.....	38
Photo.03. la caséine.....	39
Photo.04. les différentes couches apparaissent après la deuxième centrifugation.....	39
Photo.05. Culot de caséine précipitée.....	40
Photo.06 et 07. Lactosérum ovin pur.....	40
Photo.08. présentation graphique d'élution des protéines du lactosérum ovin.....	41
Photo.09. la migration des protéines.....	41
Photo.10. gel après coloration par l'instant Blue TM	42

Table des matières

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

Partie bibliographie

Chapitre I. <i>Le lait ovin</i>.....	05
I.1. Définition légale du lait.....	06
I.2. Caractéristiques des laits de brebis et leurs facteurs de variation.....	06
I.2.1. Paramètres physico-chimiques.....	06
I.2.1.1. pH et acidité.....	06
I.2.1.2. Point de congélation.....	06
I.2.1.3. Densité.....	07
I.2.1.4. Composition chimique.....	07
I.2.1.4.1. Lactose.....	08
I.2.1.4.2.. Matières azotées.....	09
I.2.1.4.3. L'azote non protéique.....	09
I.2.1.4.4. L'azote protéique.....	09
I.2.1.4.5. Caséine.....	10
I.2.1.4.5.1. Aspects quantitatifs.....	10
I.2.1.4.6. Protéines solubles.....	11
I.2.1.4.7. Matière grasse.....	11
I.2.1.4.7.1. Composition et variabilité.....	11
I.2.1.4.7.2. Les globules gras.....	12
I.2.1.4.7.3. Profil en acides gras.....	13
I.2.1.4.8. Matières minérales.....	13
I.2.2. Facteur de variation de la composition du lait.....	14
Chapitre II. <i>Le lactosérum ovin</i>.....	15
II.1. Définition du lactosérum.....	16
II.2. Différents types de lactosérum.....	16

II.2.1.Lactosérum acide.....	17
II.2.2. Lactosérum doux.....	17
II.3. Composition biochimique du lactosérum.....	18
II.3.1. Composition en protéines.....	19
II.3.2.Composition en lactose.....	20
II.3.3.Composition en sels minéraux et vitamines.....	20
II.4. Utilisation de lactosérum et de ses dérivés.....	22
Chapitre III. Les protéases.....	23
III.1. Définition.....	24
III.2. Sources.....	24
III.2.1. Protéases animales.....	24
III.2.2. Protéases végétales.....	24
III.2.3. Les protéases microbiennes.....	24
III.2.3.1. Protéases bactériennes.....	25
III.2.3.2. Protéases fongiques.....	25
III.2.4. Protéases virales.....	25
III.3. Classification et nomenclature.....	25
III.3.1. Exopeptidases.....	26
III.3.1.1. Aminopeptidases.....	26
III.3.1.2. Carboxypeptidases.....	26
III.3.2. Endopeptidases.....	27
III.3.2.1. Protéases à sérine.....	27
III.3.2.2. Protéases à acide aspartique.....	27
III.3.2.3. Protéases à cystéine.....	27
III.3.2.4. Protéases métallique.....	27
III.4. Applications.....	27
III.4.1. Industrie alimentaire.....	28

III.4.1.1. Industrie laitière.....	28
III.4.1.2. Industrie boulangère.....	28
III.4.1.3. Fabrication de produits à base de soja.....	29
III.4.2. Autres industries.....	29
III.4.2.1. Production des détergents.....	29
III.4.2.2. Gestion des déchets.....	29
III.4.2.3. Médicaments et produits pharmaceutiques.....	30
III.4.2.4. Recherche scientifique.....	30

Matériels et méthodes

I. Préparation du lactosérum.....	32
II. Dosage des protéines par la méthode du Biuret.....	32
II.1.Principe.....	32
II.2. Protocol.....	32
III. Concentration de l'extrait par l'acétone.....	33
IV. Chromatographie sur colonne DEAE sépharose pH 6.4.....	33
V. SDS-PAGE.....	33
V. Principe	33
V.1.Protocol.....	34
VI. Protéolyse.....	34
VI.1. Principe.....	34
VI.2. Protocol.....	35
VII. Détermination de pouvoir antioxydant par DPPH.....	35
VII.1. Principe.....	35
VII.2. Protocol.....	36

Résultats et discussion

1. Préparation de lactosérum.....	38
2. Résultat de chromatographie sur colonne DEAE sepharose.....	40

3. Résultats de SDS-PAGE.....	41
4. Activité antioxydant.....	43
4.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	43
Conclusion.....	51
Références bibliographiques.....	53
Annexes.....	58

Résumé

Le lactosérum est la phase aqueuse du début de la fabrication du fromage qui est séparée du caillé. Il représente environ entre 85 et 90% du volume total du lait et conserve environ 55% des éléments nutritifs du lait.

Dans la présente étude, le lactosérum est obtenue à partir des essais qui sont réalisés sur le lait ovine; quatre centrifugations ont été réalisés nous ont permis d'obtenir le lactosérum ovine pur. Nous avons procédé par la suite à une hydrolyse du lactosérum par une protéase microbienne afin de fractionner les protéines issues des deux pics isolés après chromatographie échangeuses d'anions afin d'obtenir éventuelles des peptides à pouvoir antioxydant plus élevés

D'après les résultats obtenus, Les profils de l'activité anti-radicalaire révèlent que le lactosérum testé possède une activité dose dépendante.

On peut dire que l'activité antiradicalaire du lactosérum ovine brut est élevée et que l'activité des hydrolysats de lactosérum préparés à partir de protéase ne présente pas d'intérêt particulier. Ceci peut être dû à une hydrolyse trop poussée des protéines et à la formation de peptides de trop faible activité.

Mots clé : lactosérum ovine/Chromatographie échangeuse d'anions/hydrolyse/pouvoir antioxydant

ملخص

مصل اللبن هو الطبقة المائية التي يتم فصلها عن اللبن الرائب في بداية صنع الجبن، يمثل ما بين 85 و 90% من اجمالي حجم الحليب و يحتفظ بحوالي 55% من العناصر الغذائية في الحليب.

في هذه الدراسة تم الحصول على مصلى اللبن من خلال تجارب اجريت على حليب الاغنام. اربعة عمليات طرد مركزي استخدمت سمحت لنا من استخلاص مصلى لبن الاغنام نقي، ثم شرعنا في تحلل مصلى اللبن مع البروتيز الميكروبي بعد تجزئة البروتينات بعملية كروماتوجراف على عمود من اجل الحصول على بيبتيديات محتملة مع قوة مضادة للاكسدة اعلى

وفقا للنتائج التي حصلنا عليها، اكتشفنا بان مصل اللبن المختبر له نشاط يعتمد على الجرعة كما يمكننا القول بان النشاط المضاد للاكسدة في مصل لبن الاغنام الخام مرتفع و ان نشاطه المحضر من البروتيناز ليس له اهمية خاصة و قد يكون هذا بسبب لتحلل المائي المفرط للبروتينات و تكوين بيبتيديات ذات نشاط منخفض للغاية.

الكلمات المفتاحية: مصل لبن الاغنام/ كروماتوجراف تبادل الانيون /التحلل المائي/القوة المضادة للاكسدة

Abstract:

Whey is the aqueous phase at the start of cheese making which is separated from the curd, it makes up about 85 to 90 % of the total milk volume and retains about 55 % of the nutrients in milk.

In the present study, a biochemical characterization of whey was obtained from tests, which are carried out on sheep milk. Four centrifugations were carried out. This allowed us to obtain pure sheep whey, the latter subjected to chromatography on a DEAE sepharose column in order to purify the proteins they contain, followed by electrophoresis step on Acrylamide gel in the presence of SDS PAGE in which proteins also migrate through. Which Instant Blue™ can identify after their coloration.

A proteolysis of the two best peaks was carried out laying 4 hours for each of them at the end of this experiment a free radical DPPH is added to the supernatant to determine the antioxidant power and the absorbance measured by spectrophotometry at 515 nm.

Keywords: sheep whey/ separate column chromatography /proteolysis/antioxidant power.

Introduction Générale

Introduction générale

Le secteur de l'élevage ovin occupe une place prépondérante sur le plan socioéconomique mondial, puisqu'il assure une large partie de la production de viande, de lait et de cuir.

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation, ainsi qu'un cours de la traite.

Le fromage est un aliment obtenu à partir du lait coagulé ou de produits laitiers, comme la crème, après un égouttage suivi ou non de fermentation et éventuellement d'affinage (fromage affinés).

En effet, l'industrie laitière est l'une des plus polluantes par le rejet des quantités importantes de lactosérum. Ce dernier est un sous-produit issu essentiellement de la fabrication fromagère, il est obtenu suite à la coagulation des caséines sous l'action de la présure (lactosérum doux), ou suite à l'acidification du lait (lactosérum acide) (Morr, 1989). Traditionnellement, l'opération qui suit l'étape de coagulation consiste à séparer la phase coagulée du reste du lait au cours d'une opération d'égouttage. La fraction liquide ainsi recueillie s'appelle le lactosérum, son pH est compris entre 5 et 6,5. Il représente entre 85% et 90% du lait mis en œuvre (Kosikowski, 1979 ; Mereo, 1980). Du fait de sa richesse en éléments nutritifs tels que lactose, protéines solubles, vitamines hydrosolubles, matières grasses et les éléments minéraux qui le rend un excellent milieu de culture pour les microorganismes, et ce qui fait de ce produit un facteur de pollution redoutable (Agnes N, 1986). En effet, sa DBO est de l'ordre de 40 à 50 g d'oxygène/litre de lactosérum. L'exploitation de ce liquide nutritif permet non seulement de récupérer les éléments nobles de lait pour les ramener dans les industries alimentaires. Mais aussi de limiter les risques de pollution.

Les protéines du lactosérum peuvent être dénaturées par coagulation acide à l'aide de microorganismes acidifiants ou par coagulation enzymatique par ajout d'enzymes protéolytiques (présure). Ces deux méthodes sont souvent complémentaires dans des proportions variables qui permettent de différencier les caillés lactiques des caillés type présure donnant des gels à caractère très différent se fait par hydrolyse de la caséine kappa

situé en périphérie de la micelle. L'attaque enzymatique se fait sur la liaison peptidique 105 (phénylalanine)-106 (méthionine) qui libère une partie hydrophile de la caséine kappa et une partie restante hydrophobe la para caséine kappa rattachée à la micelle (Abbas, 2012).

La protéolyse est l'événement le plus complexe et le plus important des trois événements primaires, qui se produisent dans la plus part des variétés des fromages. Elle est principalement responsable du changement de texture et apporte une contribution significative pour les propriétés organoleptique (Saoudi, 2012).

L'objectif visé par ce travail est d'extraire le lactosérum du lait ovin, puis purifier les protéines qu'il contient, pour l'utilisation en industrie pharmaceutique et alimentaire.

Pour ce fait nous avons réalisé cette étude qui comprend trois parties :

-Une partie consacrée à une étude bibliographique présentant des généralités sur les matières premières (le lait ovin, procédé d'obtention et importance du lactosérum et son utilisation).

-Une deuxième partie, qui consiste en :

- Une présentation du matériel, les méthodes de préparation et les analyses des matières.
- L'interprétation des résultats obtenus.
- Enfin une conclusion.

Première partie :
Partie bibliographique

Chapitre 1: le lait ovin

I.1 Définition du lait :

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune. Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β carotène et de sa matière grasse, d'une saveur douceâtre et d'un pH légèrement acide (6,6 à 6,8) (Alais, 1984).

I.2. Caractéristiques des laits de brebis et leurs facteurs de variation :

I.2.1 Paramètres physico-chimiques:

I.2.1.1 pH et acidité:

Le pH global d'un lait frais varie d'une espèce à l'autre. Pour le lait ovin, le pH moyen se situe autour de 6,65 Assenat, (1985) et Selon Bencini, (2002). Cette valeur varie de 6,50 à 6,85.

Bien que l'amplitude de variation de cette grandeur soit assez faible pour un lait frais, elle est étroitement liée à la composition de ce dernier, plus particulièrement en phosphate, citrates et caséines (Mathieu, 1998), alors que Chilliard et Sauvart (1987) admettent que le lait de brebis est particulièrement riche en ces constituants, la mesure du pH renseigne beaucoup plus sur la stabilité du lait et celle de ses micelles (Mathieu, 1998). De plus, il a été relevé que les paramètres rhéologiques, en particulier, le temps de gélification et le temps de raffermissement des gels sont fortement corrélés au pH du lait de brebis (De Lacroix-Bucher et al, 1994).

Sur le plan hygiénique, Pirisi et al (2007) considèrent le pH de petits ruminants comme l'un des indicateurs de la qualité du produit ce qui introduit de facto la nécessité de recourir à cette mesure dès l'arrivée du lait dans les laiteries.

L'acidité du lait est influencée par certains facteurs tels que les conditions hygiéniques et climatiques (température) ainsi que le stade de lactation (Pavic et al ,2006).

Il faut cependant distinguer entre l'acidité naturelle, traduisant la richesse du lait en différents constituants de celle développée, due à la formation d'acide lactique (Mathieu,1998).

I.2.1.2. Point de congélation:

Le point de congélation est le paramètre le plus constant. Il est utilisé pour détecter un éventuel mouillage du lait (le point de congélation s'élève) alors que l'hydrolyse du lactose (éventuelle fermentation lactique) provoque son abaissement (Mathieu, 1998), Sa moyenne est estimée pour le lait ovin à -0.570°C (Park et al. 2007).

Autour de cette valeur, des fluctuations plus ou moins importantes ont été relevées:

* -0.564 à -0.570°C (Pavic et al, 2002).

* -0.560 à -0.86°C (Hilali et al, 2011).

* -0,571 à -0,575°C (Gonzal et al, 2005).

Pavic et al (2002) ont constaté une diminution du point de congélation vers la fin de la lactation.

I.2.1.3. Densité:

La densité moyenne du lait de brebis. À 20°C, se situe à 1,036 (Assenât, 1985).Baltadjieva et al (1982) et Rouissi et al (2006) rapportent des valeurs similaires variant entre 1,030 et 1,037. Par contre, Martini et al (2008) rapportent une valeur plus faible égale à 1,030. La densité de lait dépend étroitement de sa composition, particulièrement de sa richesse en matières grassées (Croguennec et al, 2008).

Dans ce sens, la densité varie au cours de la lactation (Assenât, 1985, Kuchtki et al, 2008), de façon plus notable si l'on considère les mois de lactation plus que semaine (Simos et al, 1996).l'écémage augmente la densité du lait par contre le mouillage la diminue (Amiot et al 2002).

I.2.1.4 Composition chimique:

Le lait de brebis, au même titre que le lait de bufflonne, se singularise par des teneurs en lipides et protides (Tableau 01) en moyenne deux fois plus élevées que celles rencontrées dans les laits des autres espèces laitières (humain, bovin ,caprin, camelin...),lui conférant ainsi une très bonne valeur nutritionnelle.

Tableau 01: Composition chimique moyenne du lait de brebis analysé dans plusieurs régions du monde (composition de plusieurs sources).

Constituants (%)				Pays	Références
EST	MG	Protéines	Lactose		
17,8	6,86	5,74	4,59	Grèce	Baltadjievac et al (1982).
19,54	8,10	5,83	4,72	Bulgarie	
17,75-17,96	6,43-6,65	5,64-5,97	4,74-4,95	Grèce	PolychronidouVafooulou (1985).
18,4	7,19	5,69	4,66	France	Assenât (1985).
/	7,4	5,35	4,66	France	Pellegrini et al (1994).
19,74	7,16	6,32	5,27	Uruguay	Kremer et al (1996).
/	6,25-9,60	5,84-8,40	4,26-5,23	Grèce	Simos et al (1996).
19,10	8,46	4,88	4,84	Argentine	Althaus et al (2001).
17,30-18,20	7,10-7,55	4,49-4,86	4,86-5,07	Argentine	Sosa et al (2001).
16,7	5,6	5,2	4,5	Mexique	Ochoa-Cordero et al (2002).
19,11	7,52	5,9	4,55	Croatie	Pavic et al (2002).
17,54	6,61	5,68	4,34	Turquie	Sahan et al (2005).
/	7,06	5,47	4,65	Italie	Bianchi et al (2004).
18,98-19,11	7,49-7,60	6,55-6,40	3,89-4,05	Tunisie	Rouissi et al (2006).
20,26-21,01	8,68-8,72	6,39-6,64	4,21-4,59	Espagne	Jaramillo et al (2008).
15,59-20,68	4,96-7,80	4,69-6,66	4,43-5,00	Tchèque	Kuchtuk et al (2008).
	6,75-7,85	5,51-5,54	3,49-3,61	Tunisie	Maamouri et al (2008).
17,57	6,41	5,77	4,50	Italie	Martini et al (2008).
17,75	5,18	5,15	/	Egypte	Abd Allah et al (2008).
17,25-19,02	5,92-7,5	5,29-5,63	4,41-4,9	Syrie	Hilali et al (2011).
15,71-16,13	6,62-6,84	5,08-5,11		Romanie	Mierlita et al (2011).
	7,7	6,37	4,97	Espagne	Rodriguez et al (2001).
	6,31	6,23	5,12	Turquie	Yilmaz et al (2010).

I.2.1.4.1:Lactose :

Le lactose est le sucre spécifique du lait, il constitue un élément important de sa matière sèche, Selon les valeurs rapportées par la bibliographie, ce glucide est l'un des constituants les plus stables et ne subit que de faibles variations, comparativement aux autres constituants majeurs, En effet, la valeur la plus faible (3,49%) a été enregistrée par Maamouri et al, (2008)

en Tunisie, alors que la plus élevée (5,27%) est rapportée par Kremer et al, (1996) en Uruguay.

Les variations enregistrées à ce niveau sont liées selon Assenât (1985), à de multiples facteurs tels que les conditions climatiques, la conduite du troupeau et la sélection. Cependant, le même auteur signale qu'il peut exister des différences importantes dans la teneur en lactose entre le lait d'animaux pris individuellement.

I.2.1.4.2. Matières azotées:

Les différents constituants azotés du lait sont représentés par la fraction protéique (qui renferme environ 95% de l'azote total du lait) et la fraction azotée non incluse dans les protéines ou azote non protéique (ANP) qui représente environ 5%, Cette dernière est de nature hétérogène car elle comprend de nombreux produits de dégradation du métabolisme de l'animal et de la mamelle (Journet et Remond, 1980).

I.2.1.4.3. L'azote non protéique :

La fabrication de l'azote non protéique (ANP), qui est un des reflets de l'activité métabolique, est constituée de composés divers (acides aminés libres, urée, acide urique, créatine, créatinine, ammoniac...) qui n'ont pas pour la majorité d'entre eux une valeur nutritionnelle (Journet et al, 1975). Cette fraction, du lait existe à des teneurs variables entre les espèces laitières, doit être prise en compte dans les dosages pour la détermination de la teneur en protéines (Grappin, 1992, Mehala et al, 1995). Dans le lait de brebis, la teneur en ANP varie de 0.04% (Pirisi et al, 2001) à 0.8%(Park et al, 2007) bien supérieur à celle par Cerbulis et Farrell(1975) pour le lait de vache (0,028%).

I.2.1.4.4. L'azote protéique :

Les protéines du lait sont des constituants essentiels et vitaux en raison de leur grande valeur nutritionnelle. De leurs propriétés biologiques et de leurs qualités techno-fonctionnelles recherchées (Barlowska et al, 2011). Selon son organisation tridimensionnelle, La fraction protéique du lait peut être scindée en deux grands groupes de protéines :

- La première, qui représente environ 80% des protéines totales est de type micellaire et peu organisée. Ce sont les caséines, qui ont la particularité de précipiter entièrement à leur pH isoélectrique.

- La seconde (environ 20% restant), comprend des protéines relativement organisées, pour la plupart de type globulaires à savoir les protéines du lactosérum

Dans le cas du lait de brebis, le taux de protéines totales est estimé, selon Baltadjieva et al (1982) et Martini et al (2008), à 5,71% (lait collecté en Italie), 5,7 (lait Grecque) et 5,83% (lait Bulgare). Assenât (1985) et Pellegrini et al (1994) ont avancé des valeurs plus faibles (5,35% et 5,51%) pour le lait de brebis collecté en France.

I.2.1.4.5. Caséines :

D'un point de vue nutritionnel, Les caséines constituent une source relativement bon marché d'acides aminés (aa), notamment d'acides aminés essentiels synthétisés par l'organisme, (Holt et Sawyer, 1988). La transformation des caséines en fromage est l'une des plus importantes transformations technologiques dans le domaine des industries agro-alimentaire (Hinrichs, 2004). Les caséines sont actuellement recherchées aussi pour leurs propriétés fonctionnelles que pour les activités biologiques de leurs peptides constitutifs (Cayot et Lorient, 1998).

I.2.1.4.5.1. Aspects quantitatifs :

Le lait de brebis est plus riche en caséines que le lait des autres ruminants (vaches, chèvres, chamelles notamment) (Cayot et Lorient, 1998), Leur taux, se situe entre 3,38% (Rassu et al, 2007) et 7,75% (Potocnik et al, 2011) avec une valeur moyenne de 4,50% (Baltadjieva et al, 1998, Assenât, 1985, Pellegrini et al, 1994).

Les caséines du lait ovin constituent 74,1(Pelmus et al, 2012) à 83% (Park et al, 2007) des protéines présentes. Comme dans le lait de référence. Elles regroupent plusieurs protéines dans les caséines α_1 , α_2 , β et κ . sont majoritaires.

Ces fractions caséiques se distinguent les unes des autres par leur taille et leur composition en acides aminés (Leonel et al, 2001), Elles sont retrouvées dans le lait essentiellement sous formes de particules sphériques dites micelles de dimensions légèrement réduites par rapport à celles du lait de chèvre (193 vs 260 nm, Park et al, 2007).

La teneur en caséine α_2 semble être inférieure à celle de la caséine α_1 (ou α_1 -CN), d'après Assenât (1985), La caséines β (ou β -CN) est la fraction la plus abondante avec des teneurs qui varient entre 33,72(Pelmus et al, 2012) et 37-42,3% (Moatsou et al, 2004) par rapport aux caséines totales.

Concernant la caséine κ (κ -CN), bien qu'elle détient le rôle clé dans la coagulation du lait par la présure (Cayot et Lorient, 1998), elle est présente dans le lait ovin mais avec des teneurs faibles (7,3%, Assenât, 1985, 9,1-10,8%, Moatsou et al, 2004), Notons que quelques fragments peptidiques (caséine γ), provenant de l'hydrolyse enzymatique de la caséine β par la plasmine, peuvent s'associer en micelles (Croguenne et al ; 2008).

I.2.1.4.6. Protéines solubles :

Les protéines solubles ou protéines du lactosérum varient de 0,95% (Pellergrini et al, 1994) à 1,44% (Baltadjieva et al, 1982) et représentent environ 17-25,84% de l'ensemble des protéines du lait de brebis (Assenât, 1985 ; Park et al, 2007 ; Pelmus et al, 2002). Ce pourcentage est similaire à celui rencontré dans le lait de vache (15 à 28%), (Pougheon et Goursaud, 2001).

Ces protéines sont essentiellement représentées par la β -lactoglobuline (β -Lg), l' α -lactalbumine (α -La), les immunoglobulines (Ig), les sérum albumine (SA), les protéases-peptones (Pp), et d'autres protéines mineures telles que la lactoferrine (Lf), la plasmine et la lacto-pexydase (LP)...etc.

La β -Lg est la plus dominante parmi les protéines sériques dans le lait excepté le lait humain et camelin (Barlowska et al ,2011), Elle représente environ 50 à 60% des protéines solubles totales (Assenât, 1985 ; Pelmus et al, 2012).

Le taux d' α -La, dans le lait ovin est selon les auteurs : Potocnik et al (2011) ainsi que Moatsou et al (2005) l'estiment entre 8,97 et 17%, Assenât (1985) rapporte quant à lui un taux égal à 25,1%. Potocnik et al (2011) signale que le lait ovin contient 3,6-5,1% d'albumine sérique et 5,6% de protéases-peptones par rapport aux protéines solubles.

I.2.1.4.7. Matière grasse :

I. 2.1.4.7.1. Composition et variabilité :

Le lait de brebis est réputé pour sa richesse en matière grasse, qui varie largement en fonction de plusieurs facteurs. Certains sont liés à l'alimentation (générique, stade lactation, parité, saison...), Perea et al, 2005; Lock et al, 2005 ; Gargouri, 2005 et Sanz Samelayo et al, 2007).

Tableau 02 : paramètres physiques de la matière grasse du lait de brebis (Assenât, 1985)

Paramètre	Espèce	Brebis	Vache
Point de fusion		29-31 °C	29-34 °C
Point de solidification		12-13 °C	19-24 °C
Indice d'iode ^c		30-35	32-42
Indice de Saponification ^d		230-245	220-232

^a : proportion des acides volatils soluble^o : nombre de doubles liaisons (acides insaturés).

^b : proportion des acides volatils insolubles : grandeur moléculaire moyenne des acides gras.

La matière grasse laitière de la brebis se caractérise par certains paramètres physiques qui la distinguent de celle du lait de vache.

Le taux des lipides varie entre 4,96% (Kichtik et al ; 2008) et 9,60% (Simos et al, 1996). Ces valeurs sont bien supérieures à celle rapportées pour le lait de vache (2,8-4,8%). Selon ce dernier auteur, l'absence de β - carotène dans la matière grasse laitière du lait ovin contribue à la blancheur de ce dernier.

La matière grasse laitière est constituée de triglycérides (98%).

Les di-glycérides, mono-glycérides et les acides gras libres sont naturellement présents en faibles quantité mais leur proportion peut augmenter en cas de lipolyse (Chilliard et Lamberet, 1984 ; Jeantet et al, 2007). De nombreux autres composés sont présents mais à des teneurs beaucoup plus réduites (phospholipides, cholestérol, vitamines) (Amiot et al, 2002).

I. 2.1.4.7.2. Les globules gras :

Comme dans tous les laits, la matière grasse est présente sous forme de globules gras (GG) sphériques en émulsion dont la taille et le nombre varient d'une espèce à l'autre, Le diamètre moyen des GG pour le lait ovin est estimé par Martini et al, (2008) à $5,06\mu\text{m} \pm 0,435$ avec cependant une prédominance des GG large ($\geq 5\mu\text{m}$). Huebner (2012) l'estime par contre à $3,30\mu\text{m}$. Bien inférieur à celui de la chèvre et la vache ($3,49$ et $4,55\mu\text{m}$ respectivement).

La taille des globules gras intéresse aussi bien les physiologistes que les technologies de l'industrie laitière. Les globules gras de dimensions réduites sont plus facilement digérés par attaque enzymatique humaine ou microbienne (Huebner, 2012), alors que les caractéristiques morpho-métriques des globules gras sont liées aussi bien au rendement fromager qu'aux

paramètres de coagulation du lait (Martini et al, 2008) ainsi qu'à la stabilité de l'émulsion laitière (Croguennec et al, 2008).

Le stade de lactation affecte aussi bien le nombre des GG que leur taille (Salariet Martini, 2009). Les propriétés fonctionnelles et le rôle dans la protection contre la lipolyse (Danthine et al 2000).

I.2.1.4.7.3. Profil en acides gras :

La composition en acides gras (AG) influence aussi bien les propriétés technologiques des matières grasses (par leur point de fusion) que les propriétés organoleptiques des produits laitiers (proportions variables d'AG oxydation...) (Schmidely et Sauvart, 2001).

Pour ce lait, le taux des acides gras saturés (AGS), ou l'acide palmitique (C16) prédomine, varie de 59,35%(Lock et al, 2005). Pour le lait bovin, les taux varient respectivement de 60,79 à 39,25 (Alais, 1984).

Le lait ovin se caractérise par sa richesse en acide gras à courte chaîne (AGCC) (de C4 à C10) (8,69 ; Carta et al ; 2009 à 25,94 ; Biondi et al, 2008) contre 9,9% pour celui de la vache (Alais, 1984), Selon Clark (2009), la richesse du lait de brebis en acides gras à court et moyenne chaîne lui confère un caractère organoleptique spécifique qui se caractérise par une saveur piquante et une rancidité que celui de la vache.

Les AGI, ou l'acide oléique prédomine, sont représentés essentiellement par les acides gras mono-insaturés ne (AGM) ; de 19,88% (Mierlita et al, 2011) à 27,7% (Lock et al, 2005). Les acides gras polyinsaturés ne représentent que 2,67 (Carta et al, 2008) à 7,8% (Lock et al, 2005), taux inférieur à ceux du lait de vache estimés à 31,23 (AGMI) et 8,02% (AGPI) (Alais, 1984).

I.2.1.4.8. Matières minérales :

Les sels minéraux correspondant aux matières salines sans les anions organiques, essentiellement les citrates (Mathieu, 1998).

Les minéraux du lait jouent un rôle important sur les plans physico-chimiques, technologique et nutritionnel. Ils interviennent dans la stabilité micelles de caséines (Mathieu et al, 1998), dans le processus de coagulation du lait (Mathieu et al, 2003) et dans la diversité de texture des fromages élaborés (Croguennec et al, 2008). D'un point de vu nutritionnel, le

lait constitue la principale source alimentaire de calcium et de phosphore (Mahaut et al, 2000).

Le lait ovin est plus riche en ses éléments que le lait bovin, caprin et même humain (Gueguen, 1971 ; 2001 : De la Fuente et al, (1997), Croguennec et al, (2008). Le lait de brebis, comme celui de vache, renferme des éléments minéraux présents à l'état de trace, dans ces fractions, certaines proportions sont sous forme colloïdale, d'autres sous forme soluble (cas du potassium et chlorure).

I.2.2. Facteur de variation de la composition du lait :

La composition du lait cru ovin n'est pas stable et est sujette à de multiples variations. Pour cela, plusieurs facteurs ont été rapportés dans la littérature, Certains sont intrinsèques ou liés à l'animal tel :

- ▶ Race (Haenlein, 2002 ; Tsiplakou et al, 2006 ; Mierlita et al, 2011).
- ▶ Stade de lactation (Sahan et al, 2005 ; Kuchtik et al, 2008, Hejtmankova et al, 2012).
- ▶ Rang de lactation (Gonzalo et al, 1994 ; Piras et al, 2007).
- ▶ Numéro de lactation (Kremer et al, 1996 ; Oravcova et al, 2007).
- ▶ Âge de l'animal (Kremer et al, 1996 : Berger et al, 2004 ; Abdallah et al, 2007).
- ▶ État de santé des mamelles (Biachi et al, 2004 ; Raynal-Ljutovac et al, 2007).

D'autres sont liés à aux facteurs extrinsèques tels :

- ▶ L'alimentation (BocquiretCaja, 2001 ; Pirisi et al, 2001 ; Bovera et al, 2003).
- ▶ Les pratiques de la traite (Nudda et al, 2002 ; Rassu et al, 2007 ; Sinapsis, 2007). Saison (Abdallah et al, 2011).

Chapitre 2: le lactosérum

II.1.Définition du lactosérum :

Le lactosérum également appelé petit-lait ou sérum est un sous-produit issu essentiellement de la fabrication fromagère. C'est un liquide jaune verdâtre, composé d'environ 94% d'eau, de sucre (le lactose), de protéines et de très peu de matières grasses.

Traditionnellement ; le lait est coagulé par ajout de présure ou l'action acidifiante de bactéries lactiques ou par acidification chimique. Il en résulte une agrégation des micelles de caséine de lait, qui donne un gel ou coagulum.

C'est la phase aqueuse du début de la fabrication du fromage qui est séparée du caillé. Le caillé est ensuite traité séparément pour être transformé en fromage (Heslot, 1996).

Le lactosérum est très fermentescible et fragile. Il représente environ entre 85 et 90% du volume du lait et conserve environ 55% des éléments nutritifs du lait (Guimarães et al, 2010 ; Lapointe-Vignola C, 2002).

L'industrie laitière produit de très grandes quantités de lactosérum chaque année on obtient, en effet ; environ 9 litres de lactosérum et 1 kg de fromage à partir de 10 litres de lait.

II.2.Différents types de lactosérum :

Selon le procédé d'obtention, différents types de lactosérum peuvent ainsi être obtenus comme illustré sur la figure (1).

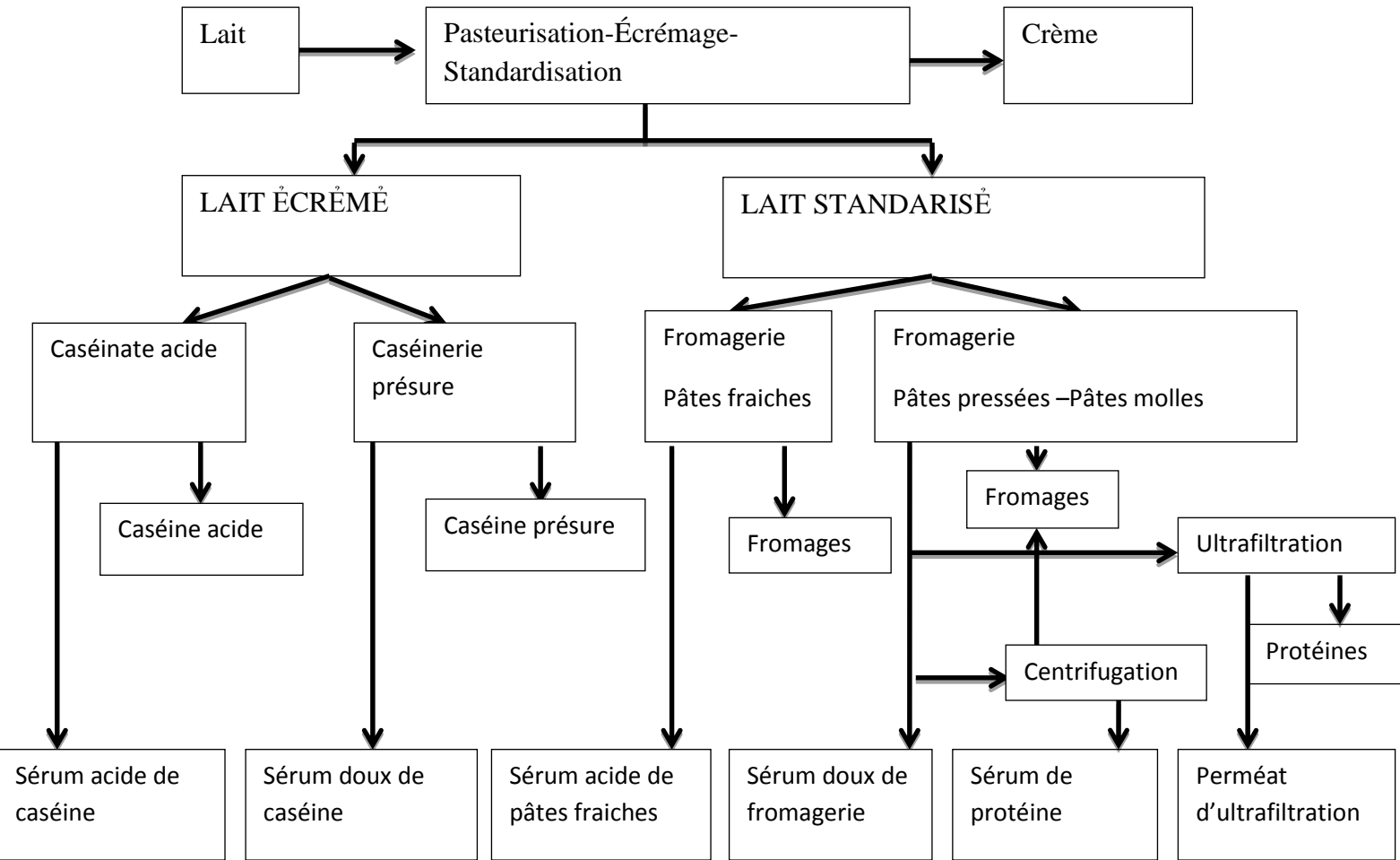


Figure.01: voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums (Alais, 1984)

Ces lactosérums peuvent être classés en deux principales catégories selon l'acidité du liquide obtenue :

II.2.1. lactosérum acide : Il est obtenu après la coagulation du lait par précipitation des caséines à leur pH isoélectrique de 4.6 par ajout d'acide fort ou d'acide lactique (Violleau, 1999). La caséine est combinée à des sels de calcium, l'acidification entraîne sa déminéralisation qui fait passer dans le lactosérum une part importante d'éléments minéraux, notamment le calcium et le phosphore (Sottiez, 1990).

Le lactosérum acide provient de la fabrication des fromages à pâtes fraîches et des fromages à pâtes molles, son pH varie entre 3.8 et 4.6 (Moletta, 2002).

II.2.2. lactosérum doux : lactosérum doux est obtenu après la coagulation de la caséine sous l'action de la présure sans acidification préalable.

Ce type de lactosérum contient une glycoprotéine qui provient de l'hydrolyse de la caséine Kappa par la présure (Sottiez, 1990). Lorsque le lactosérum issu de la fromagerie n'est pas traité avec toutes les précautions nécessaires, la poursuite de la fermentation naturelle augmente son acidité. Le lactosérum doux issu de la fabrication de fromage à pâte pressée cuite ou non cuite (Emmenthal, SaintPaulin, Edam...etc), est de pH variant entre 5 et 6.3. Les lactosérums doux sont généralement déshydratés (Morr, 1989 ; Moletta ,2002).

II.3.composition biochimique du lactosérum

Qu'il soit doux ou acide, le lactosérum est constitué principalement de lactose, de protéines solubles et d'ions minéraux. En fonction des différents paramètres de production utilisés dans les industries laitières, la teneur en caséine résiduelles, en matières grasses et en certains ions minéraux peut varier. La composition des différents lactosérums est décrite dans le tableau ci-dessous (tableau 03).

Tableau.03 : la composition des différents types de lactosérum (SamahIkram, 2018 ; Fick Michel, 2016)

	Lactosérum doux	Lactosérum acide
EST (extrait sec total) %	6.50	6.00
Liquide %	93.5	94
Composition en g/l		
Protéines	6.6	6.1
Lactose	52	44
Lipides	0.2	0.3
Minéraux	5	7.5
Calcium	0.5	1.6
Phosphate	1	2
Sodium	0.53	0.51
Zinc	0.3	2.3

Le lactosérum doux possède un peu plus de protéines et de lactose puisque ce dernier n'est pas fermenté en acide lactique, contrairement au lactosérum acide qui a été produit par fermentation lactique.

II.3.1.composition en protéines

Les protéines de lactosérum constituent 20% de la totalité des protéines contenues dans le lait.

Celles retrouvées dans les lactosérums sont majoritairement la β -lactoglobuline et α -lactalbumine. Ces dernières représentent donc entre 65% et 80% des protéines du lactosérum.

Le tableau ci-dessous énumère quelques caractéristiques de ces protéines (tableau04).

Tableau.4 : Principales caractéristiques des protéines du lactosérum (Goodall et al, 2008)

Protéines	Concentration (g/l)	Poids moléculaire (KDA)	Point isoélectrique	Acides aminés AA	% des protéines du lactosérum
β _lactoglobuline	3	18,3	5,35_5,49	162	40_55
α _lactalbumine	1,2	14	4,2_4,5	123	11_20
immunoglobuline	0,6	15	\approx 7	Nd	8_11
Sérum albumine	0,3	69	5,13	582	4_12
Lactoferrine	0,1	\approx 80	7,8_8,0	689	\approx 1

Nd : non déterminée

En outre ces protéines ont des propriétés fonctionnelles très importantes :

Pouvoir moussant, pouvoir émulsifiant, pouvoir gélifiant par coagulation à la chaleur, absence d'eau, gonflement, la solubilité.

La β -lactoglobuline, absente dans le lait humain, possède tous les acides aminés naturels et comporte 58% d'acides aminés indispensables. Elle présente un dipeptide (Glu-Cys) qui peut servir à la synthèse du glutathion, très impliqué dans les réactions d'oxydoréduction cellulaires, et elle peut aussi servir de transporteur pour la vitamine A et la vitamine D.

Du fait de sa forte concentration et de sa composition, elle est la protéine du lactosérum ayant la plus forte valeur nutritive.

L' α -lactalbumine contient également tous les acides aminés naturels et 57% d'acides aminés indispensables. Une stimulation des défenses immunitaire, des propriétés dites « anticancéreuses » et antivirales ainsi qu'un peptide bactéricide sont caractéristiques de cette protéine.

La lactoferrine, quant à elle, est une métalloprotéine qui peut se lier à deux atomes de fer ferrique et permet donc son transport et son absorption. En jouant sur le taux de fer, la lactoferrine peut avoir un rôle antimicrobien (Louis Fontaine, Maelle Gaugler, 2016)

II.3.2.composition en lactose

Le lactose est le composé majeur de l'extrait sec du lactosérum. C'est un diholoside, composé de deux oses, le galactose et le glucose, reliés par une liaison β 1-4, comme illustré ci-dessous (Fig.02).

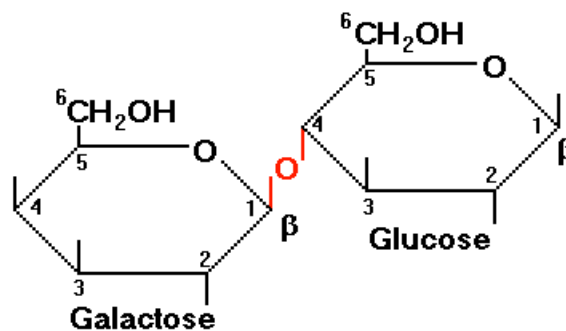


Figure.02 : le lactose (laitsanslactose.com)

II.3.3. Composition en sels minéraux et vitamines

Les sels minéraux principaux présents dans le lactosérum sont : sulfate: chlorures, phosphates, citrates de calcium, sodium, magnésium et potassium. Il est à noter que les caractéristiques du lait sont variables selon les espèces, les races, l'environnement, l'alimentation et les états physiologiques et sanitaires des animaux. Toutefois, on estime qu'en moyenne, un litre de lait est composé de 8,5 à 9 g de sels minéraux dont 1,2 g de calcium et 0,95 g de phosphate. Après réalisation du processus de transformation du lait, le lactosérum doux aura une teneur de 2,5 à 4,7 g de minéraux par litre de lactosérum et le lactosérum acide en contiendra entre 4,3 à 7,2g. Ainsi, le lactosérum contient en moyenne 4,8 g de sels minéraux, soit une réduction d'environ 50% par rapport à la teneur initiale du lait (Bardy, Bentz, 2016)

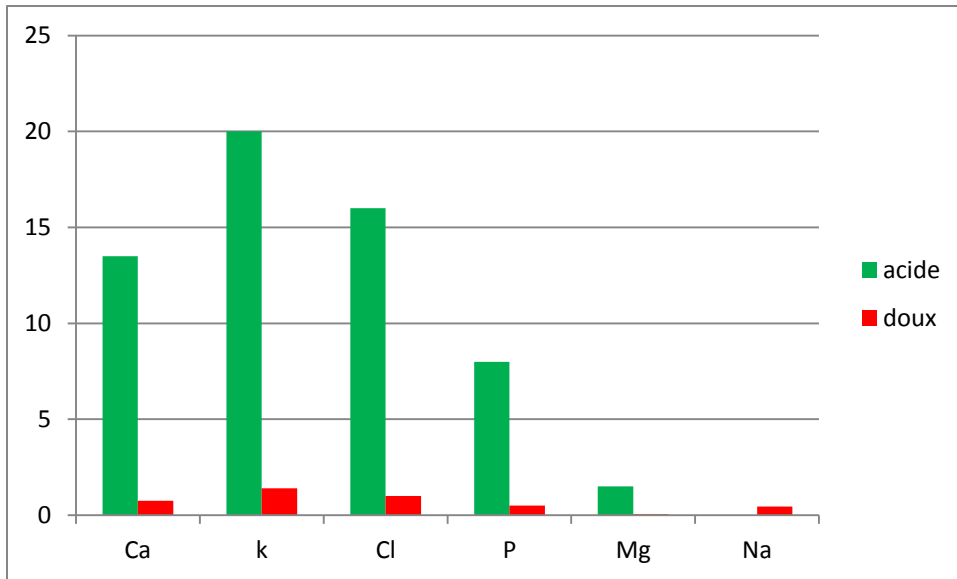


Figure.03 : composition en sels minéraux pour 1kg de lactosérum (ThalisBussière, Jérémy Chatras, 2016).

Le lactosérum contient également des vitamines essentielles pour notre organisme et plus précisément des vitamines B2, B5, B12, B6 et C, qui peuvent être utilisées en industrie pharmaceutique ou alimentaire.

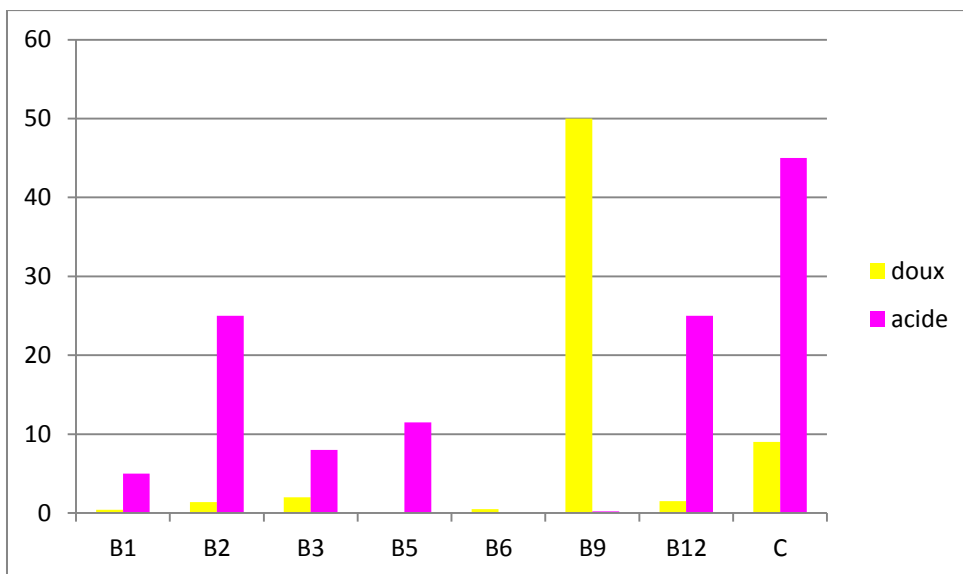


Figure.04 : composition en vitamines pour 1 Kg de lactosérum (ThalisBussière, Jérémy Chatras, 2016)

II.4. Utilisation du lactosérum et de ses dérivés

Le lactosérum est un sous-produit de l'industrie fromagère, lorsqu'il est déversé dans une rivière ; il engendre des effets polluants : les bactéries et autres micro-organismes vivants dans l'eau, attaquent certains constituants du lactosérum (lactose principalement) en consommant l'oxygène de l'eau, ce dernier manquera aux poissons et aux plantes aquatiques qui mourront d'asphyxie.

Ces torts causés à l'environnement pourraient être évités d'autant que le lactosérum est une matière noble dont il y a encore beaucoup à tirer. En effet, on en extrait donc du lactose, mais aussi de l'acide lactique et de riboflavine (vitamine B2)

Le lactosérum est transformé en poudre de lactosérum ou en ses variantes déminéralisées, déprotéinées ou délactosées. Également, il peut être valorisé sous forme de concentrés protéiques, d'isolat de protéines sériques, du lactose ou d'autres fractions (Macwan et al, 2016 ; Kosseva et al, 2009).

Le lactosérum contient un fort taux d'éléments nutritionnels (lactose, protéines, sels minéraux, matière grasse). Il est donc, rentable de le réutiliser au même titre qu'une matière première. On différencie le lactosérum doux et le lactosérum acide. Ce dernier est le plus souvent utilisé dans l'élevage comme nourriture pour les animaux car il est plus difficile à traiter (la concentration de lactosérum acide donne un produit visqueux et collant) que le lactosérum doux et donc moins pratique lors d'une utilisation pour l'alimentation humaine (Proot, 2001).

Environ 50% de la production mondiale du lactosérum est traitée et transformée en divers produits alimentaires, dont environ 45% sont utilisés directement sous forme liquide, 30% sous forme poudre, 15% en tant que lactose et ses dérivés, et le reste pour la fabrication des concentrés des protéines de lactosérum (kosseva et al, 2009 ; yadav et al, 2015).

Chapitre 3 : les protéases

III.1. Définition

Une protéase (également appelée peptidase ou protéinase) est une enzyme qui effectue une protéolyse, c'est-à-dire qu'elle catabolise les protéines par hydrolyse des liaisons peptidiques qui relient les acides aminés ensemble dans une chaîne polypeptidique. Les protéases représentent la plus grande catégorie d'enzymes et constituent un très grand groupe complexe avec des variations importantes des propriétés physico-chimiques et catalytiques (Kumar et al, 2016).

III.2. Sources

Les protéases sont produites à partir de divers êtres vivants, comme les plantes, les animaux et les micro-organismes (Sunduset al, 2017).

III.2.1. Protéases animales

La trypsine pancréatique, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine sont des protéases d'origine animale. La chymotrypsine, l'une des principales enzymes digestives responsables de l'hydrolyse des protéines alimentaires, est une enzyme coûteuse préparée à partir de l'extrait pancréatique d'animaux, n'est utilisée que pour des applications diagnostiques et analytiques. La pepsine, une protéase acide trouvée principalement dans l'estomac de tous les vertébrés, est utilisée dans les détergents et lessives. La rénine est une autre protéase majeure qui se trouve principalement dans l'estomac des animaux, en tant que précurseur inactif appelé présure, qui est convertie en rénine active par l'action de la pepsine (Kumaret al, 2016).

III.2.2. Protéases végétales

La papaïne, la broméline, les kératinases et la ficine sont quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétale. Mais la production de protéases végétales est un processus qui prend du temps. Le latex des fruits de la *Papayacarica* fournit de la papine tandis que la bromélaïne est obtenue à partir de la tige et du jus d'ananas. Mais ce sont des processus très fastidieux (Kumaret al, 2016).

III.2.3. Protéases microbiennes

Les microorganismes sont les principaux producteurs, en raison de leurs avantages économiques et techniques (Jessika et Harumi., 2018). Ils constituent une part importante des besoins mondiaux en protéases commerciales (Kumaret al, 2016).

L'origine microbienne est préférée pour la production à grande échelle de protéases, en raison de leur croissance rapide, facilité de manipulation et possibilité de production de nouvelles enzymes recombinantes ayant les propriétés désirées. Elles peuvent être extracellulaires ou intracellulaires et leur production est grandement influencée par des

facteurs nutritionnels et physicochimiques, tels que la température, le pH, les sources d'azote et de carbone, les sels inorganiques, l'agitation et la concentration d'oxygène dissous (Kasana *et al.*, 2011).

III.2.3.1. Protéases bactériennes

Les protéases bactériennes ont une plus grande importance commerciale dans les industries de blanchisserie, de l'alimentation, du cuir et de la soie ; en raison de leur capacité de production élevée et de leur activité catalytique. *Alteromonass.*, *Brevibacterium Linens*, *Lactobacterium Helveticus*, sont les principales sources de protéases bactériennes (Kumar *et al.*, 2016).

III.2.3.2. Protéases fongiques

Les protéases fongiques ont attiré l'intérêt des recherches en raison de la grande diversité, de la large spécificité du substrat et de la stabilité dans des conditions extrêmes. Elles sont actives sur une large gamme de pH (de 4 à 11) et présentent une large spécificité de substrat. Cependant, elles ont une vitesse de réaction et une thermo tolérance inférieure aux protéases bactériennes (Jisha *et al.*, 2013 ; Kumar *et al.*, 2016).

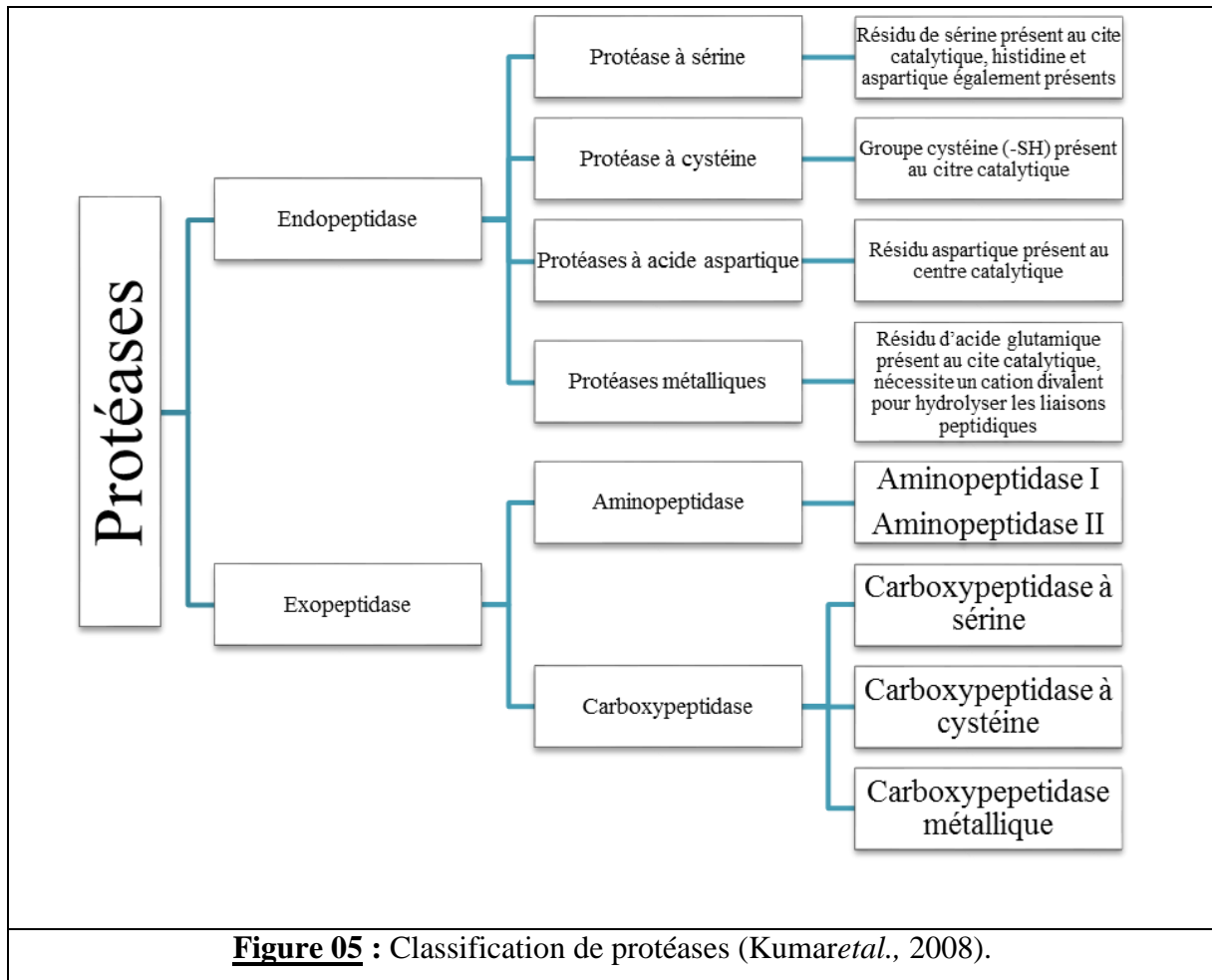
III.2.4. Protéases virales

Les protéases virales ont pris de l'importance en raison de leur implication fonctionnelle dans le traitement des protéines de virus qui provoquent certaines maladies mortelles telles que le SIDA et le cancer. Les protéases à sérine, à cystéine et à acide aspartique sont codées dans divers virus. Toutes les peptidases codées par un virus sont des endopeptidases ; il n'y a pas de peptidases métalliques. Des recherches se sont concentrées sur la structure tridimensionnelle des protéases virales et leur interaction avec des inhibiteurs synthétiques en vue de concevoir de puissants inhibiteurs capables de combattre l'épidémie de SIDA (Rao *et al.*, 1998).

III.3. Classification et nomenclature

Selon la Commission d'Enzymes (CE), les protéases appartiennent au groupe 3 (des hydrolases) et au sous-groupe 4 (hydrolyse des liaisons peptidiques). Mais en raison de leur énorme diversité, la classification des protéases est basée sur leur structure et leur site actif. Mais généralement, elles sont divisées en fonction de leur site d'action (endo ou exopeptidase) (Jessika *et Harumi.*, 2018). Pour faciliter une référence rapide et sans équivoque à une famille particulière de peptidases, Rawlings *et Barrett* ont assigné une lettre de code désignant le type du site catalytique, soit S : Protéase à sérine (EC.3.4.21) ; C : Protéase à cystéine (EC.3.4.22) ; A : protéase à acide aspartique (EC.3.4.23) ; M : protéase

métallique (EC.3.4.24) (Kumaret al, 2008) La figure 05 représente la classification des protéases selon le mode d'action et le site catalytique.



III.3.1. Exopeptidases

Les exopeptidases agissent seulement à proximité des extrémités des chaînes polypeptidiques. Sur la base de leur site d'action à l'extrémité N ou C, elles sont classées en tant qu'amino et carboxypeptidases, respectivement (Rao et al, 1998).

III.3.1.1. Aminopeptidases

Les aminopeptidases agissent à l'extrémité N-terminal libre de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul résidu d'acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide (Rao et al., 1998).

III.3.1.2. Carboxypeptidases

Les carboxypeptidases agissent à l'extrémité C de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul acide aminé ou un dipeptide. Les carboxypeptidases peuvent être divisées en trois groupes principaux, carboxypeptidases à sérine, les carboxypeptidases métalliques et les carboxypeptidases à cystéine (Rao et al., 1998).

III.3.2. Endopeptidases

Les endopeptidases sont caractérisées par leur action préférentielle au niveau des liaisons peptidiques dans les régions internes de la chaîne polypeptidique à l'opposé des extrémités N et C. Les endopeptidases sont divisées en quatre sous-groupes basés sur leur site catalytique : protéases à sérine, protéases à acide aspartique, protéases à cystéine et protéases métalliques (Rao *et al.*, 1998).

III.3.2.1. Protéases à sérine

Ce sont des enzymes qui clivent les liaisons peptidiques dans les protéines, dans lesquelles la sérine sert d'acide aminé nucléophile au site actif de l'enzyme. On les trouve omniprésentes chez les eucaryotes et les procaryotes (Kumaret *al*, 2016).

III.3.2.2. Protéases à acide aspartique

Ce sont des protéases qui utilisent une molécule d'eau activée liée à un ou plusieurs résidus d'acide aspartique pour la catalyse de leurs substrats peptidiques. En général, elles ont deux aspartates hautement conservés dans le site actif et sont actives de manière optimale à pH acide (Kumaret *al*, 2016).

III.3.2.3. Protéases à cystéine

Également connues sous le nom de protéases à thiol, ces protéases partagent un mécanisme catalytique commun qui implique une cystéine à thiol nucléophile dans une triade ou une diade catalytique (Kumaret *al*, 2016).

III.3.2.4. Protéases métalliques

C'est un type de protéases dont le mécanisme catalytique implique un ion métallique. La plupart des protéases métalliques nécessitent du zinc, mais certaines utilisent du cobalt (Kumaret *al*, 2016).

III.4. Applications

Les protéases constituent l'un des groupes les plus importants d'enzymes industrielles et académiques, représentant environ 65 % du marché annuel des enzymes. Elles ont des applications dans les industries alimentaires et des détergents où les protéases alcalines détiennent la plus grande part du marché mondial des enzymes. En raison de leurs applications répandues, de nombreuses industries ont commencé la production au niveau commercial (Sunduset *al*, 2017).

Le tableau ci-dessous présente quelques protéases alcalines appliquées en industrie.

Tableau 05 : Exemples de protéases utilisées en industrie (Sunduset *et al*, 2017).

Nom de protéase	Industrie	Application
Savinase	Détergents	Enlever la tâche à base de protéines
Alcalase	Textile	Dégommage de soie
SEB Tender 70	Viande	Attendrissage de la viande
Peptidase	Alimentaire	Hydrolysats de protéines amères
SEB tremper	Cuir	Trempage
Protéinase K-16	Détergents	Élimination des protéines

III.4.1. Industrie alimentaire

L'utilisation de protéases dans l'industrie alimentaire remonte à l'antiquité. Elles ont été couramment utilisées à diverses fins telles que la fabrication de fromage, la cuisson, la préparation d'hydrolysats de soja et l'attendrissage de la viande (Rao *et al*, 1998).

En raison de leur capacité à décomposer les protéines, les protéases ont été largement utilisées pour la production d'hydrolysats de protéines à haute valeur nutritive. Les protéases sont ajoutées aux aliments et au mélange d'aliments pour une meilleure valeur nutritionnelle (Sunduset *et al*, 2017).

III.4.1.1. Industrie laitière

La principale application des protéases dans l'industrie laitière est la fabrication du fromage (Rao *et al*, 1998). Les protéases alcalines de *Streptococcus cremoris*, *Amycolatasp.* et *Amycolatopsissp.* ont été utilisées pour la production industrielle du fromage. Les bactéries lactiques sont utilisées pour la coagulation du lait, une caractéristique essentielle pour la production du yaourt. Ces bactéries sont dépendantes de leurs enzymes protéolytiques qui hydrolysent la caséine et remplissent leur exigence de source d'azote pour la croissance (Sunduset *et al*, 2017).

III.4.1.2. Industrie boulangère

La farine de blé est une composante majeure des processus de cuisson. Il contient une protéine insoluble appelée gluten, qui détermine les propriétés des pâtes de boulangerie. Des exoprotéinases d'*Aspergillusoryzae* ont été utilisées pour modifier le gluten de blé par protéolyse limitée. Le traitement enzymatique de la pâte facilite sa manipulation et son usage et permet la production d'une plus large gamme de produits. L'ajout de protéases réduit le temps de pétrissage et entraîne une augmentation du volume du pain. Les protéases

bactériennes sont utilisées pour améliorer l'extensibilité et la résistance de la pâte (Rao *et al.*, 1998).

III.4.1.3. Fabrication de produits à base de soja

Le soja est une source nutritionnelle riche, en raison de sa teneur élevée en protéines de bonne qualité. Les protéases ont été utilisées depuis les temps anciens pour préparer la sauce de soja et d'autres produits de soja. Les protéases alcalines et neutres d'origine fongique jouent un rôle important dans le traitement de la sauce de soja. La modification protéolytique des protéines de soja aide à améliorer leurs propriétés fonctionnelles. Le traitement des protéines de soja avec de l'alcalase à pH 8 conduit à des hydrolysats avec une solubilité élevée, un bon rendement en protéines et une faible amertume. L'hydrolysat est utilisé dans des boissons non alcoolisées enrichies en protéines et dans la formulation d'aliments diététiques (Rao *et al.*, 1998).

III.4.2. Autres industries

III.4.2.1. Production des détergents

Les protéases alcalines ont hautement contribué à l'amélioration et au développement des détergents industriels. Ces détergents sont efficaces dans toutes les conditions de pH et de température qui sont utiles pour le nettoyage industriel. Les enzymes utilisées dans l'industrie de blanchissage comprennent les protéases, les lipases, les cellulases et les amylases. Les protéases aident à éliminer toute trace de sang, d'œufs ou de sauce, même dans des conditions de pH élevé. Récemment, des protéases alcalines de *Bacillus cereus*, de *Bacillus pumilus* souche CBS, de *Streptomyces* sp. La souche AB1, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus brevis* et *Bacillus subtilis* AG-1 ont montré une excellente compatibilité avec les détergents en présence de certains stabilisants tels que le CaCl₂ et la glycine. Des souches de *Bacillus* alcaliphiles sont utilisées pour produire une protéase à sérine stable à l'oxydation afin de prévenir la perte d'activité lorsqu'elles sont utilisées dans des détergents (Sundus *et al.*, 2017).

III.4.2.2. Gestion des déchets

Les déchets de l'industrie de volaille et du cuir sont riches en kératine densément chargée et stabilisée par l'hydrogène, les interactions hydrophobes et les liaisons disulfure. Ces déchets de kératine sont dégradés par hydrolyse chimique et mécanique mais ce n'est pas écologique. La dégradation enzymatique à l'aide de protéases alcalines est la meilleure méthode. Les espèces du genre *Bacillus*, *Pseudomonas* sp. MS21, *Microbacterium* sp., *Chryseobacterium* sp. et *Streptomyces* sp. sont largement utilisées comme producteurs de kératinases pour la dégradation des plumes. Des kératinases fongiques sont

aussi obtenues à partir d'*Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium indicum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium sp*, *Trichophyton sp*, *Aspergillus terreus*, *Scopulariopsis sp.*, *Fusarium oxysporum* (Sunduset al, 2017).

III.4.2.3. Médicaments et produits pharmaceutiques

Diverses protéases sont utilisées en médecine pour leur fonction native, elles sont largement utilisées dans le diagnostic et le traitement des caillots intravasculaires en cas d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral, de thrombose veineuse profonde, etc, par l'action hémolytique des protéases à sérines. Ou bien pour des fonctions complètement artificielles (par exemple pour la dégradation ciblée de protéines pathogènes). Les protéases sont aussi utilisées comme agents immunostimulateurs (Kumaret al, 2016).

Les protéases sont largement utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour la préparation de médicaments tels que les onguents pour le débridement des plaies. Elles sont également utilisées dans les nettoyeurs pour les prothèses dentaires et les lentilles de contact (Najafi et al, 2005).

Les enzymes protéolytiques sont très importantes dans la digestion car elles dégradent les liaisons peptidiques dans les aliments protéiques pour libérer les acides aminés nécessaires à l'organisme (Gajju et al. ,1996).

III.4.2.4. Recherche scientifique

Les protéases jouent un rôle important dans la recherche fondamentale. Leur clivage sélectif des liaisons peptidiques est utilisé dans l'élucidation de la relation structure-fonction, dans la synthèse des peptides et dans le séquençage des protéines. Les protéases ont des applications en biologie moléculaire et en génie génétique dont la dissolution des membranes des parois cellulaires à l'aide de protéases est essentielle, elles sont utilisées pour l'étude des organelles cellulaires comme les noyaux, l'appareil de Golgi, les mitochondries, les lysosomes, le réticulum endoplasmique, etc (Kumar et al, 2016).

Deuxième partie :
Étude expérimentale

1-Préparation du lactosérum

Une préparation a été effectuée à partir de lait ovin. Le lait a été pesé puis mis dans 10 tubes (le volume de chacun d'eux est de 15ml), puis ont été placés dans une centrifugeuse (4000xg/30min).

Le pH du liquide restant a été ajusté jusqu'à 4.4 en utilisant l'acide acétique 10% (V/V)... (Annexe 1).

Après avoir supprimé et pesé la partie lipidique, une deuxième centrifugation a été réalisée (4000xg/30min). La partie lipidique restante et la caséine précipitée ont été éliminées.

Le pH est ajusté à 7.4 avec le NaOH (1M). Une troisième centrifugation (4000xg/20min) est effectuée pour séparer la caséine résiduelle du lactosérum, suivie d'une acidification du pH à 4 par l'acide acétique 10% (V/V). Une dernière centrifugation (4000xg/20min) permet d'obtenir le lactosérum pur.

2-Dosage des protéines par la méthode du Biuret

2-1-Principe

En milieu basique les ions cuivriques Cu^{2+} forment un complexe bleu violet avec les composés contenant au moins deux groupements voisins de type $-\text{CO}-\text{NH}_2$ (exemple le biuret ayant donné son nom à la méthode $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$).

Les peptides et les protéines donnent donc un complexe violet stable présentant une absorbance maximale à 540nm.

Le développement de la couleur et l'intensité de cette coloration dépendent de différents facteurs : alcalinité et concentration des ions Cu^{2+} , température, nature des protéines (composition en acides aminés basiques : Asn, Gln, et longueur : nombre de liaisons peptidiques) .cependant, l'influence de la structure primaire de la protéine reste assez faible et la formation du complexe est à peu près équivalente pour toutes les protéines.

2-2-Protocol

Nous avons préparés une série de tubes dont le blanc. Chaque tube contient 1ml de réactif. Les tubes échantillons contiennent 25 μl de lactosérum ovin tandis que le standard est composé de 1ml de réactif et 25 μl de standard.

Puis, les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 10 min.

3- concentration de l'extrait par l'acétone

Nous avons procédé par la suite à une étape de concentration dans des tubes eppendorfs. Chacun d'eux contenant un volume d'extrait de lactosérum et quatre volumes d'acétone (conservé à -20°C).

Les tubes sont mélangés avec un vortex et incubés à -20°C pendant 60min. Immédiatement après, les échantillons sont soumis à une centrifugation (13000xg/10min) puis le culot contenant les protéines est récupéré et dilué dans le tampon citrate pH3.8 100mM

4- Chromatographie sur colonne DEAE sepharose pH6.4

Dans cette partie du travail nous avons utilisé la chromatographie échangeuse d'anions qui est une méthode de purification des protéines basée sur l'attraction ionique entre les charges de la phase stationnaire et les charges des composants d'un mélange dans des conditions de pH et de salinité définies.

La résine employée est une résine échangeuse d'anion la DEAE- sepharose® chargée positivement.

La colonne a d'abord été équilibrée avec 3CV tampon phosphate pH 4... (Annexe 3) et de concentration 1mmol Puis 2ml de lactosérum ovin concentré est ajouté, ensuite élution des protéines fixées avec gradient NaCl (1M) de 0% à 100% pour prendre des échantillons à différents temps dans le but d'effectuer une électrophorèse sur gel d'acrylamide.

5-SDS-PAGE

5-1-Principe

Dans l'électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence du dodécyl sulfate de sodium (SDS), la migration est déterminée par la masse moléculaire des polypeptides. Le SDS est un détergent anionique, qui dénature les liaisons non covalentes des protéines en enveloppant la structure primaire des polypeptides. De ce fait, il leur confère une charge négative proportionnelle à leur longueur dans le rapport d'environ une méthode de SDS pour deux résidus d'acides aminés. Le mercaptoéthanol est ajouté afin de réduire les liaisons disulfures. Les complexes formés par les protéines et le SDS sont soumis à une électrophorèse dans un gel d'acrylamide.

5-2-Protocol

La séparation a été réalisée sur un gel de concentration 15%... (Annexe 4) et un gel de séparation 10%...(Annexe 5). Le gel est coulé entre des plaques de verre fixées sur un support et un peigne et enchâssé entre ces plaques. Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant ainsi des puits où nous plaçons le mélange constitué de 25% de solution laemmli et 75% de la solution de l'échantillon.

Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse et la migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique, dans un premier un voltage de 150V pendant 30min puis on a augmenté ce voltage jusqu'à 190V pendant 90min.

Après migration, le gel est démoulé, et les protéines sont révélées par une coloration avec l'Instant BlueTM pendant 30min.



photo.1. solution de coloration

6-Protéolyse

6-1-Principe

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et les polypeptides en libérant les acides aminés libres et des peptides simples qui se trouvent dans la phase soluble.

6-2-Protocol

Pour effectuer cette étape on a préparé un mélange comprenant 0.4ml de protéase d'origine bactérienne (*Nocardiopsis*), avec 4ml de la solution de lactosérum obtenue par chromatographie après l'ajustement de son pH à 9 par NaOH4%, est mis à incuber à 50°C pendant 4 heures. Chaque heure nous prenons un volume de 500µl et on le met dans un bain marie à 85°C pendant 15min pour inactiver l'enzyme puis nous le refroidissons et le soumettons à une centrifugation (10000xg/25min). Finalement 400µl de surnageant est récoltée et congelée.

7- Détermination du pouvoir antioxydant par DPPH

7-1-Principe

Ce test est basé sur la mesure de l'aptitude de l'antioxydant à exercer un effet scavenger sur le radical libre DPPH(1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl).le radicale DPPH est réduit en son hydrazine correspondant lorsqu'il réagit avec un donneur d'hydrogène. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violette à une couleur jaune. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 515nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité anti radicalaire (le mécanisme est récapitulé dans la figure.06).

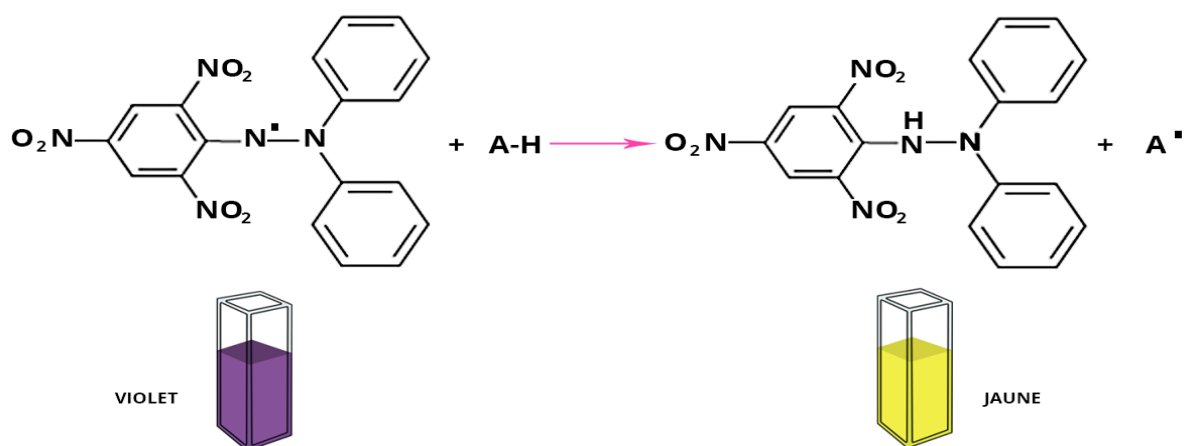


Figure.06. Piégage du radical libre DPPH (Parejo et al.2002)

7-2-Protocol

Dans une première cuve spectrophotométrique on a placé 2ml de la solution de la DPPH ... (Annexe 7) puis on a ajouté des différents volumes de surnageant contenant l'antioxydant, mélanger par retournement et mesure l'absorbance à 515nm.

Pour chaque volume en antioxydant l'évolution du DPPH résiduel en fonction du temps et extraire la valeur atteinte au plateau.

Résultats et discussion

1-Préparation du lactosérum

Afin d'obtenir du lactosérum pur on a suivi toutes les étapes mentionnées ci-dessus dont le volume initial du lait ovin est 150ml. après la première centrifugation le lait a coagulé avec un volume de 145ml et un poids de 130,47g après élimination de la partie lipidique sa masse est estimée à 25,10g.



Photo 2 : le lait ovin a coagulé.

Une deuxième centrifugation a été effectuée dedans cette étape trois couches sont apparues qui sont la caséine en bas puis la couche liquide et au fond une petite couche de graisses.



Photo 3 : la caséine



Photo 4 : les différentes couches apparaissent après la deuxième centrifugation.

Après la troisième centrifugation il reste une petite partie de la caséine.



Photo 5 : Culot de caséine précipitée.

La dernière centrifugation nous a permis d'extraire du lactosérum ovin pur.



Photo 6 et 7 : lactosérum ovin pur.

2-Chromatographie sur colonne DEAE sepharose

La chromatographie sur DEAE sepharose nous permet d'isoler les différentes fractions du lactosérum selon leur pH isoélectrique.

La figure suivante montre le profil d'élution du lactosérum par gradient de NaCl.

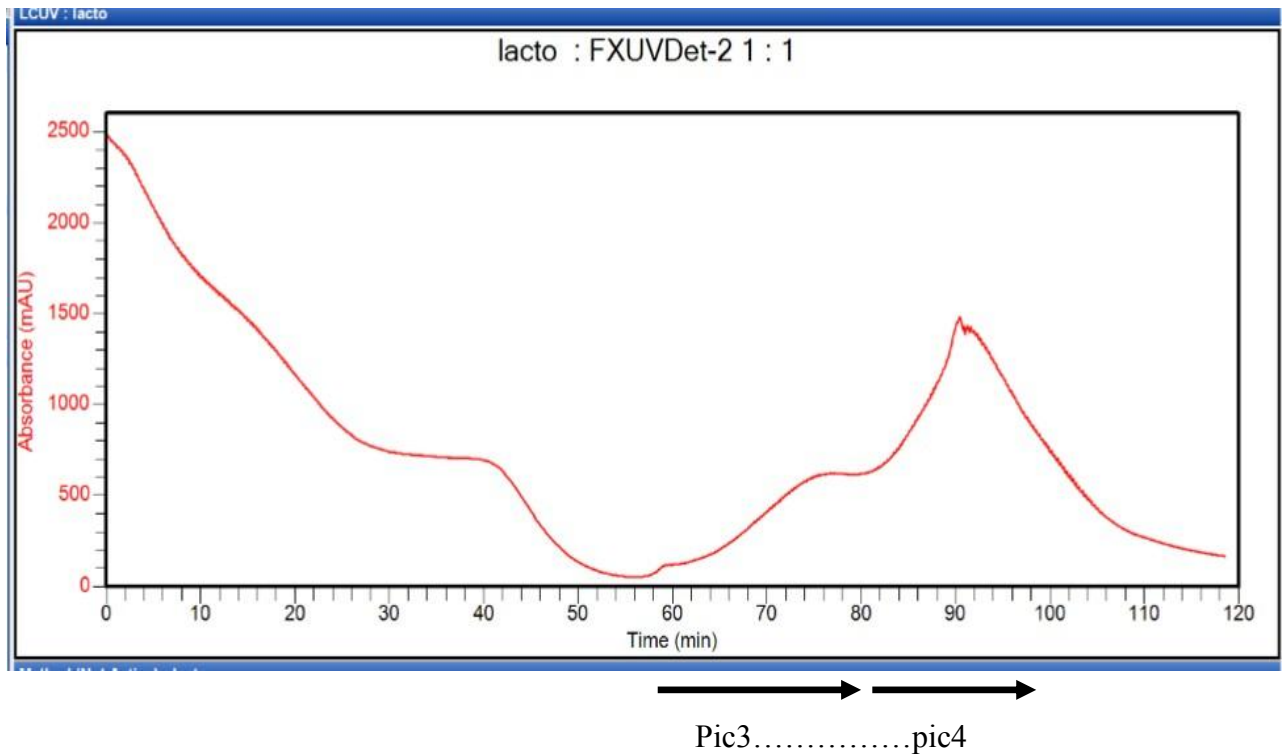


Photo 8 : présentation graphique d'élution des protéines du lactosérum ovin.

3-SDS-PAGE

Cette technique consiste à faire migrer les protéines dans un gel ; sous l'influence d'un champ électrique ; permettant ainsi leur séparation selon leur taille.



Photo 09 : la migration des protéines

Lorsque les protéines ont été séparées, leur révélation sur gel peut être effectuée en les colorants directement par l'Instant Blue™

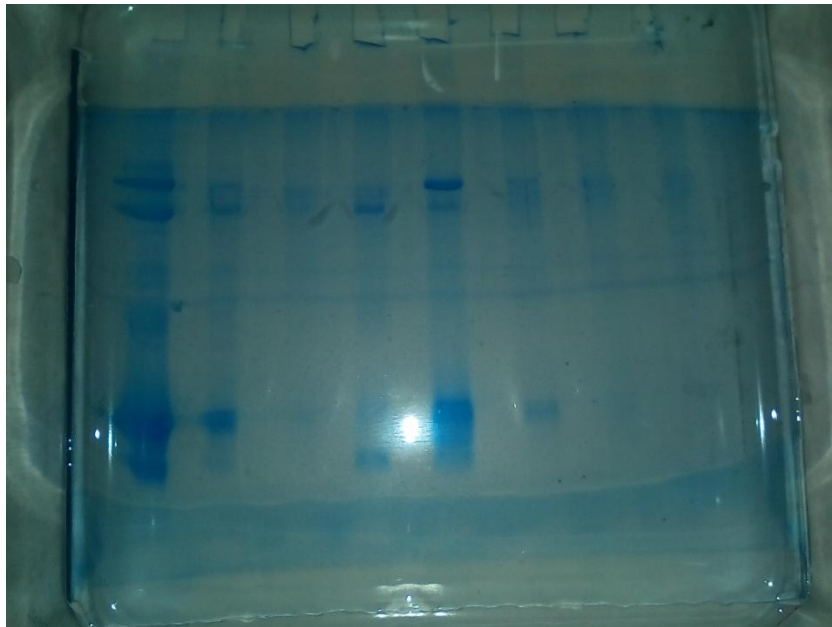


Photo 10 : gel après coloration par l'Instant Blue™

de gauche à droite

Puits 1 : 30µl de lactosérum ovin pur+10µl laemml

Puits 2 :30µl de pic 1 ovin+ 10µl de laemml.

Puits 3 :30µl de pic 2 ovin+ 10µ de laemml

Puits 4 30µl de pic 3 ovin+ 10µl de laemml

Puits 5 :30µl de pic 4 ovin+ 10µl de laemml.

Puits 6 :30µl de pic 5 ovin+ 10µl de laemml.

Puits 7 : 30µl de pic2' camelin+ 10µl de laemml

Puits 8 :30µl de pic 3' camelin+10µl de laemml.

4-Activité antioxydant

4-1-Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante des extraits des protéines de lactosérum vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH·) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 515nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires (Majheni L, Kerget M·S, et Kenz Z, 2007).

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont représentés dans les figures 7 à 18.

La courbe suivante (Fig07) représente le pourcentage d'inhibition en fonction du temps pour le lactosérum brut, où l'on note que de 0 à 320 sec une diminution rapide du pourcentage de 100 à 79%, et après 320 sec à la fin du temps une diminution progressive jusqu'à ce qu'elle atteigne 58%.

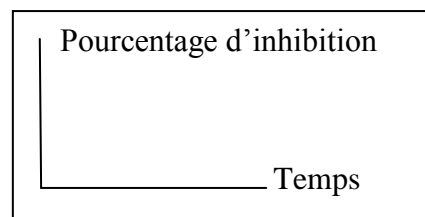
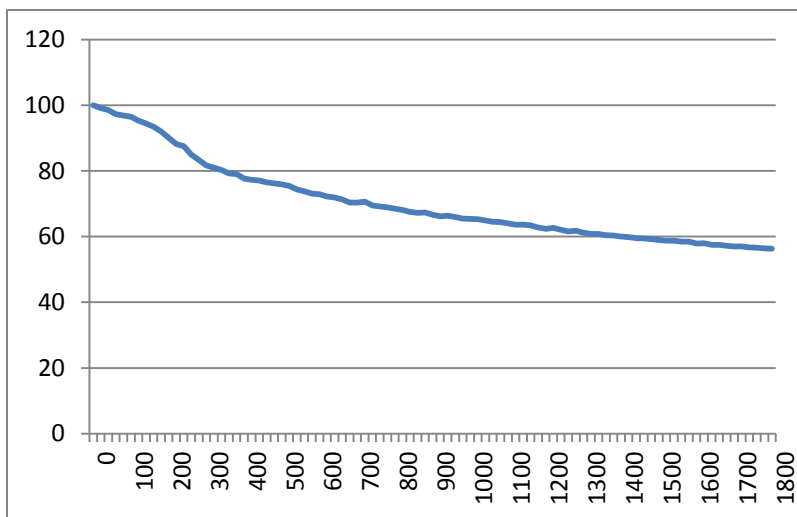


Figure.07 : pourcentage d'inhibition de 30µl du lactosérum ovin brut.

Les trois courbes suivantes montrent l'évolution de l'inhibition du radical DPPH par surnageant de lactosérum hydrolysé du pic3 (après 3 heures d'incubation à 50°C)

Nous remarquons une diminution graduelle de l'activité à partir de 500 s de réaction et elle atteint finalement 97.5 % d'inhibition (figure 08).

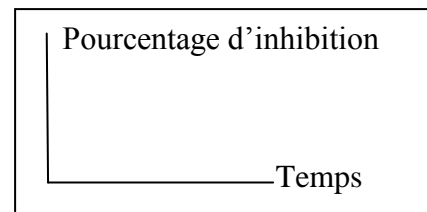
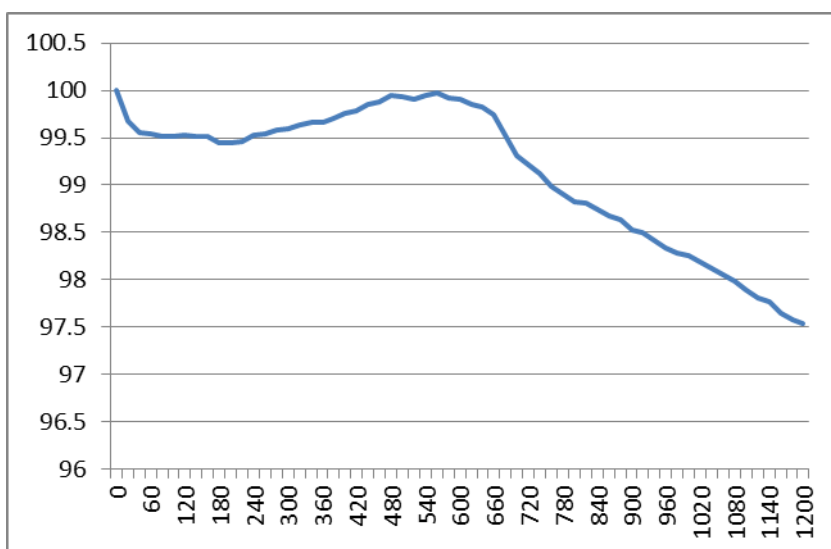


Figure.08 : pourcentage d'inhibition de 30µl de surnageant du lactosérum ovin du pic3 (après 3 heures d'incubation à 50°C).

Il est clair que le taux d'inhibition de l'extrait protéique ne présente pratiquement aucun pouvoir antioxydant vis-à-vis du DPPH

En ce qui concerne les figures 09 et 10 , on observe une diminution du pourcentage dans les deux courbes, puis il reste stable pendant 12min, puis atteint respectivement 90 et 85% d'inhibition

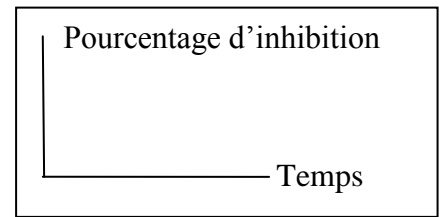
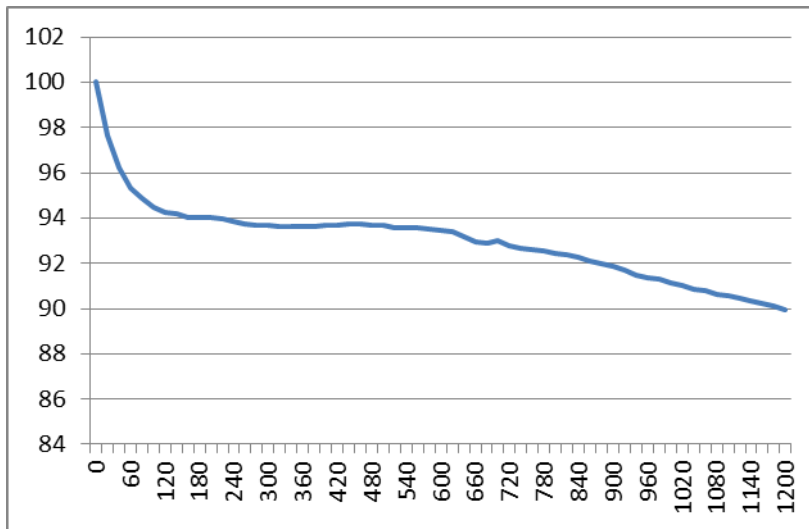


Figure.09 : pourcentage d'inhibition de 50µl de surnageant du lactosérum ovin du pic3 (après 3 heures d'incubation à 50°C).

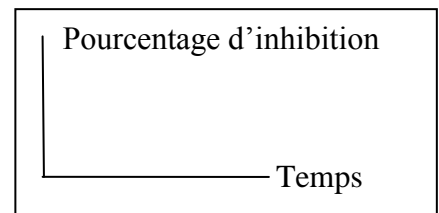
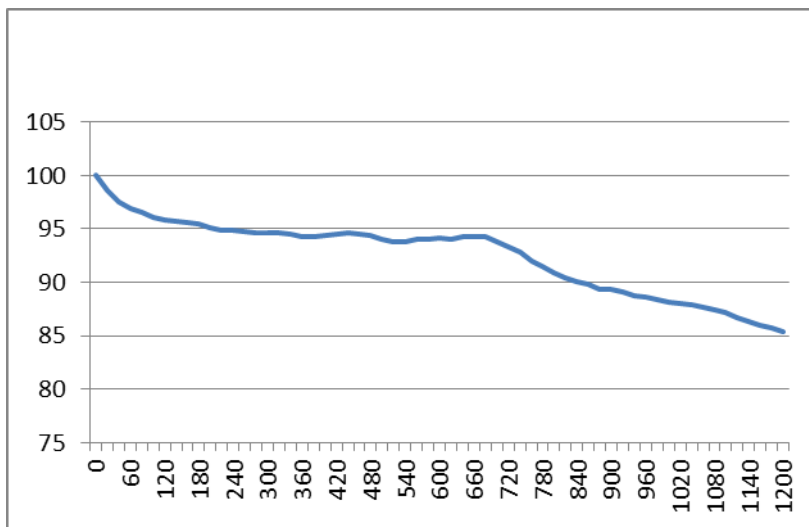


Figure.10: pourcentage d'inhibition de 70µl de surnageant du lactosérum ovin du pic3 (après 3 heures d'incubation à 50°C).

Ces taux sont plus élevés que ceux observés pour la figure 08, mais restent cependant inférieurs à ceux observés pour le lactosérum brut.

Les trois courbes suivantes montrent l'évolution de l'inhibition du radical DPPH par surnageant de lactosérum hydrolysé du pic3 (après 4 heures d'incubation à 50°C)

Dans les deux courbes, on constate une diminution relative de l'activité dans les deux premières minutes, puis elle reste constante pendant 10 minutes, suivis d'une diminution

progressive avec le temps (figure 11 et 12).

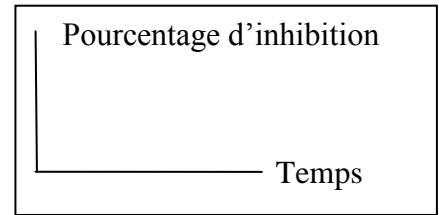
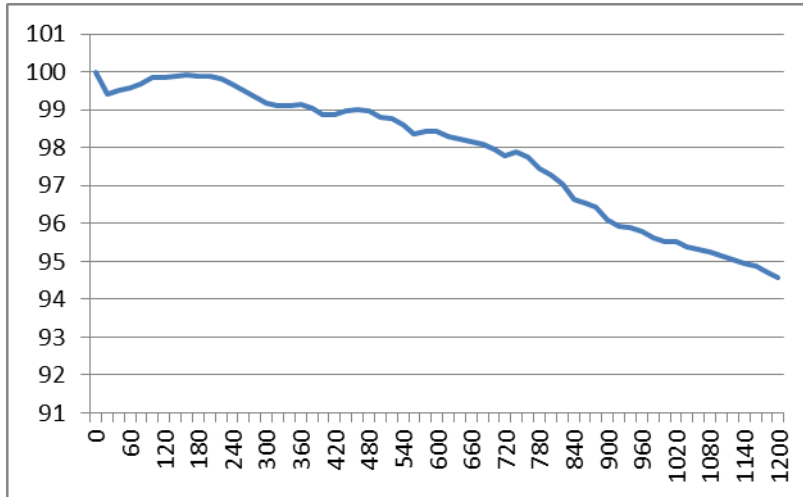


Figure.11 : pourcentage d'inhibition de 30µl de surnageant du lactosérum ovin du pic3 (après 4 heures d'incubation à 50°C).

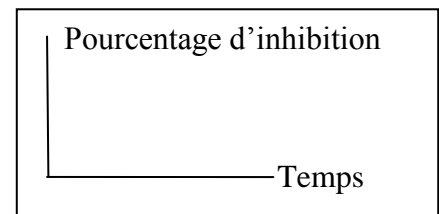
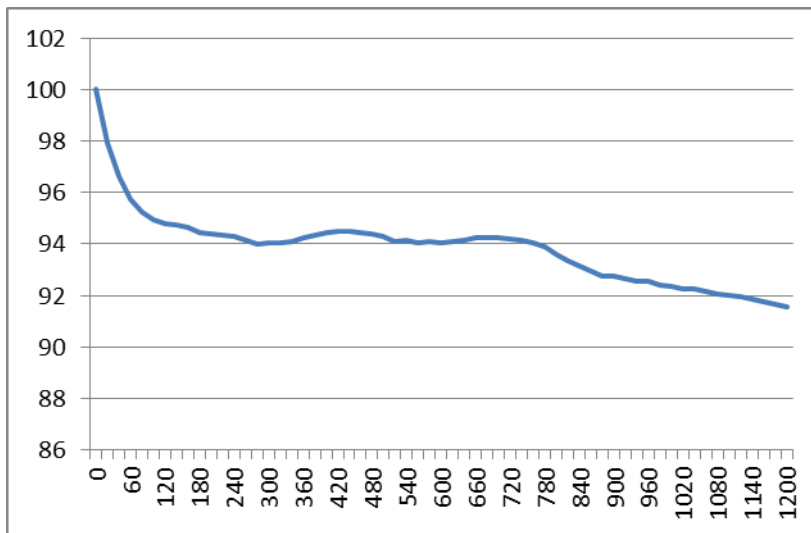


Figure.12 : pourcentage d'inhibition de 50µl de surnageant du lactosérum ovin du pic3 (après 4 heures d'incubation à 50°C).

On remarque que l'activité descend progressivement jusqu'à atteindre 94.5% à la fin du temps (figure 13).

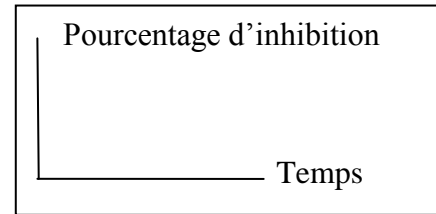
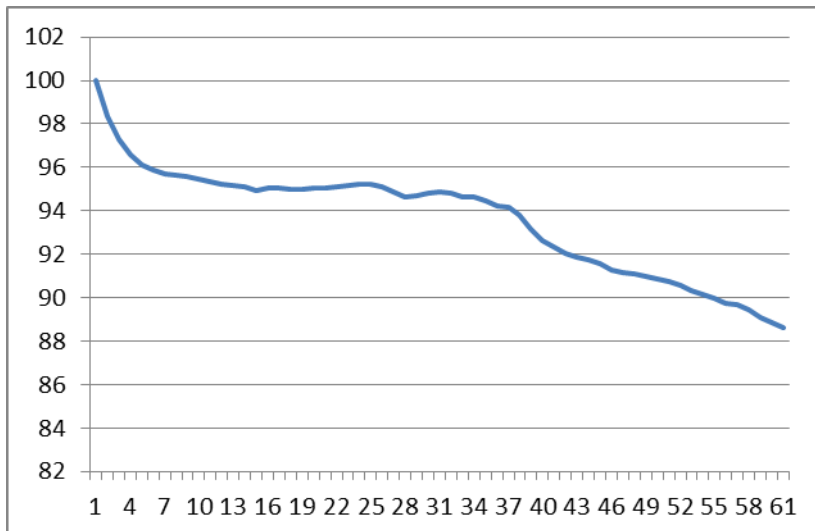


Figure.13 : pourcentage d'inhibition de 70µl de surnageant du lactosérum ovine du pic3 (après 4 heures d'incubation à 50°C).

Ces taux sont plus élevés que ceux observés pour la figure 08, et sont comparables à ceux obtenus pour les hydrolysats à 4h. Le temps n'a donc aucun influencé l'activité antioxydant.

Les figures suivantes montrent l'évolution des profils d'inhibition des lysats protéiques obtenus à partir du pic 4 du chromatogramme.

On note que l'activité diminue progressivement du début du temps jusqu'à sa fin (figure 14).

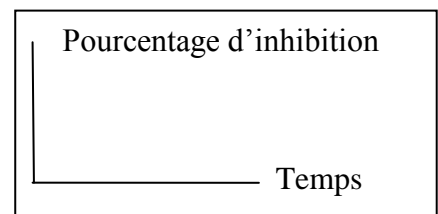
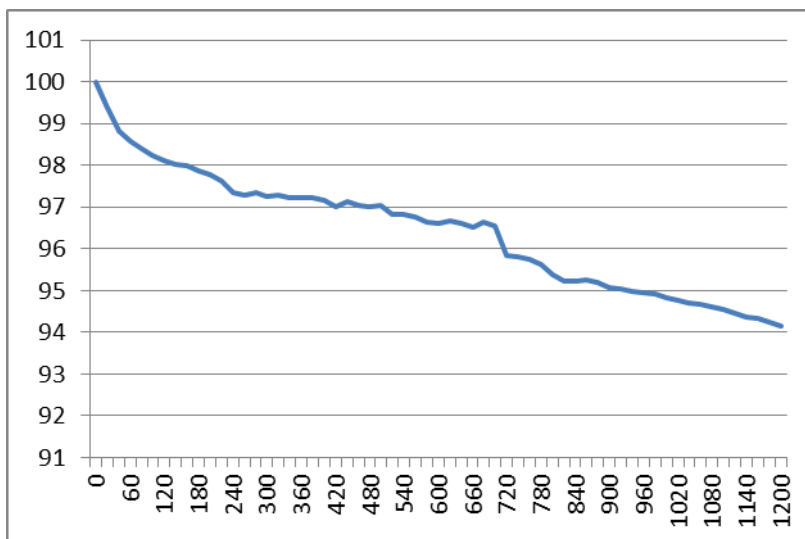


Figure.14 : pourcentage d'inhibition de 30µl de surnageant du lactosérum ovine du pic4 (après 3 heures d'incubation à 50°C).

Dans cette courbe, on remarque une baisse d'activité suivis d'une hausse puis d'une nouvelle baisse (figure 15).

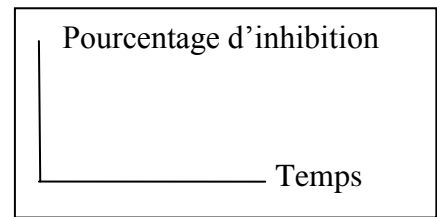
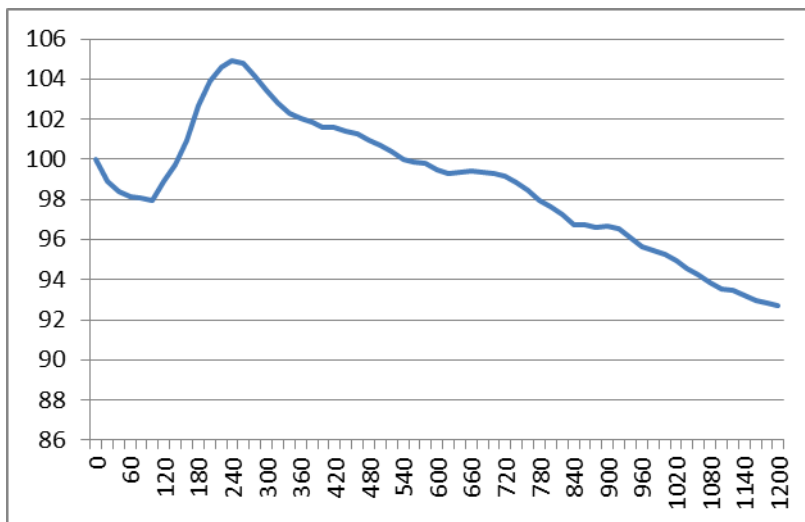


Figure.15 : pourcentage d'inhibition de 50µl de surnageant du lactosérum ovin du pic4 (après 3 heures d'incubation à 50 °C).

Dans les premières minutes, nous remarquons une diminution de l'activité, suivis d'une augmentation jusqu'à ce qu'elle atteigne son apogée et se termine par une diminution graduelle (figure 16).

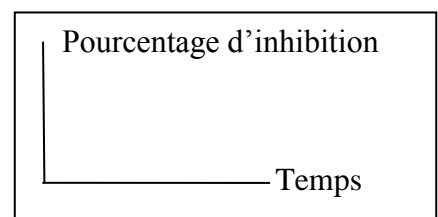
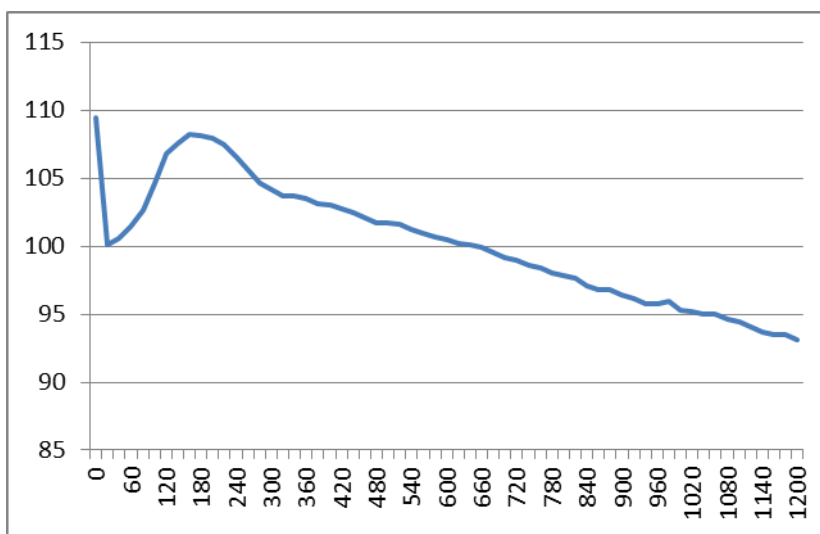


Figure.16 : pourcentage d'inhibition de 30µl de surnageant du lactosérum ovin du pic4 (après 4 heures d'incubation à 50° C).

On observe une diminution notable au début du temps puis la diminuons progressivement (figure17 et 18)

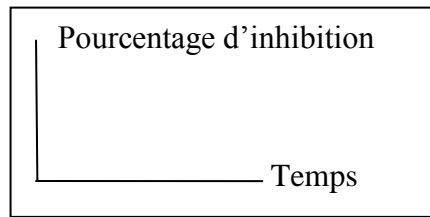
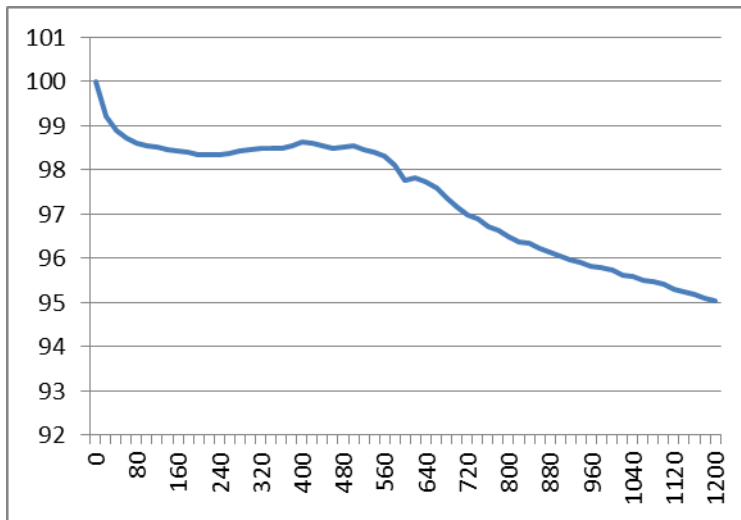


Figure.17 : pourcentage d'inhibition de 50µl de surnageant du lactosérum ovin du pic4 (après 4 heures d'incubation à 50° C).

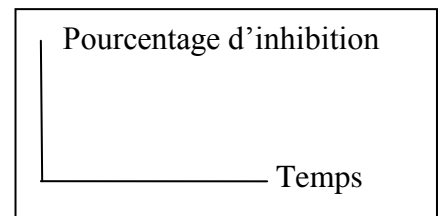
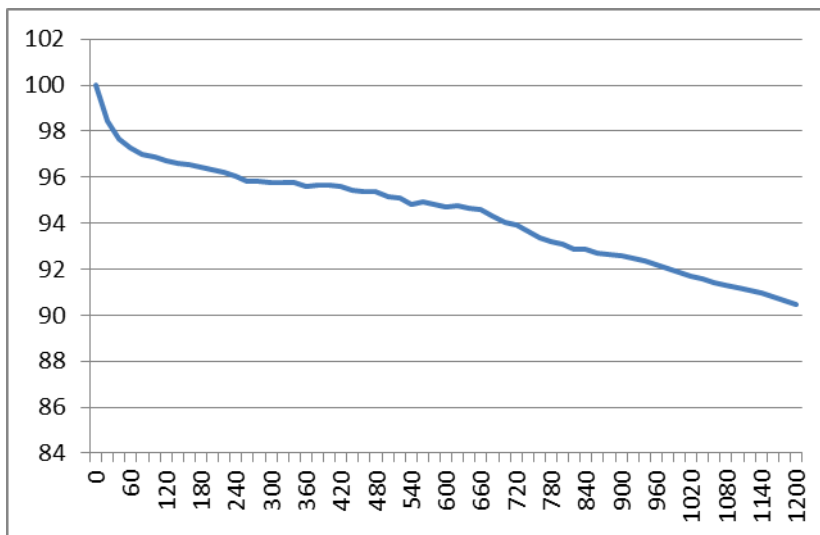


Figure.18: pourcentage d'inhibition de 70µl de surnageant du lactosérum ovin du pic4 (après 4 heures d'incubation à 50°C).

Les résultats obtenus à partir de la figure 07 montrent que le lactosérum brut ovin possède un pouvoir antioxydant important qui fait baisser l'absorbance de 40% après 200mn d'incubation.

Nous avons procédé par la suite à une hydrolyse du lactosérum par une protéase microbienne afin de fractionner les protéines issues des deux pics isolés après chromatographie échangeuse d'anion afin d'obtenir éventuelles des peptides à pouvoir antioxydant plus élevé.

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits testés montrent que le % d'inhibition des extraits du lactosérum est supérieur à 10% pour les extraits à partir de 3h d'incubation en présence de protéase.

Cependant les résultats obtenus montrent clairement un effet inverse sur le pouvoir antioxydant après hydrolyse.

Les résultats obtenus à partir des figures (8,9,10) du pic3 après 3 heures d'incubation ont montrés que le surnageant a une faible pouvoir antioxydant par rapport au lactosérum ovin brut, ou dans la figure 8 l'absorbance est diminué de 2,5%, et dans la figure 9 son abaissement estimée par 10% et 15% dans la figure 10 ; les résultats des mêmes surnageant mais après 4 heures sont montrés dans les figures (11,12,13) dont le pourcentage d'inhibition à diminué de 5,5%, 8,5%, et 11,5% pour les surnageant 30µl, 50µl, et 70µl respectivement.

Pour le pic4 après 3 heures d'incubation les résultats sont représentés dans les figures (14,15), montrent une altération de leur absorbance dont 10% pour 30µl, 7% pour 50µl, d'autre part il y a une baisse d'absorbance de 16% dans la figure 16 de 5% dans la figure 17 et de 9,5 dans la figure 18. pour le même pic après 4 heures.

Et à partir de cela, nous pouvons dire que le volume et l'absorption sont inversement proportionnels.

D'après les résultats représentés dans les figures ci-dessus, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation du volume soit pour lactosérum brut de camelin ou bien d'ovin

Les profils de l'activité anti-radicalaire révèlent que le lactosérum testé possède une activité dose dépendante.

On peut conclure que l'activité antiradicalaire du lactosérum ovin brut est élevée et que l'activité des hydrolysats de lactosérum préparés à partir de protéase ne présente pas d'intérêt particulier. Ceci peut être dû à une hydrolyse trop poussée des protéines et à la formation de peptides de trop faible activité.

Conclusion

Conclusion

Le lactosérum est aujourd'hui un coproduit peu valorisé de la fabrication fromagère. En plus d'un enjeu économique pour les industries laitières, c'est également un enjeu environnemental puisqu'il ne peut être rejeté directement dans la nature car trop polluant.

Lors de cette étude, son potentiel a particulièrement été mis en valeur de part sa composition en protéines, de lactosérum. Le pouvoir antioxydant de cette solution possède donc une forte activité thérapeutique.

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits testés montrent que le % d'inhibition des extraits du lactosérum est supérieur à 90% à une concentration de 0,847(mol/l).

Pour le lactosérum brut soit camelin ou ovin le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation du volume, après l'hydrolyse de lactosérum par une protéase microbienne les résultats montrent un effet inverse sur le pouvoir antioxydant

Les profils de l'activité anti-radicalaire révèlent que les deux lactosérums testés possèdent une activité dose dépendante.

Ceci peut être dû à la formation au fractionnement des protéines en peptides de trop faible activité.

Références

- Alais C., 1984.** Science du lait - principes des techniques laitières. Paris, Editions Sepaic. 4^e éd. 814 pages.
- Assenât L., 1985.** Le Lait de brebis, Composition et propriétés ; in : (Lait et Produits laitiers, 1, Les Laits de la Mamelle à la laiterie) .Ed. Tec.et Doc. , Lavoisier, Paris
- Bencini, 2002.** Goglescholar Y W- Recherche sur les petits ruminants,2007- Elsevier.
- Mathieu J., 1998.** Initiation à la Physicochimie du lait. Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris. Mémoire 3^e cycle agronomie,I .A.V.H.II,rabet
- Chilliard Y., Sauvant D., 1987.** La sécrétion des constituants du lait. INRA-CEPIL, Paris.
- De La Croix-Bucher A., Barillet f, et Lagriffoul G., 1994.** Caractérisation de l'aptitude fromagère des laits de brebis Lacaune à l'aide d'un Forma graph. Le Lait, 74, 173-186.
- Pirisi A., Lauret A. and Dubeuf J P. 2007.** Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. Small,Ruminant,Research. 86: 167-178.
- Park Y W., Juarez M., Ramos M., Haenlein G.F.W. 2007.** Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant Research, 68, 88-113.
- Pavic V., Antunac N., Mioc B., Ivankovic A., Havranek J L., 2002.** Influence of stage of lactation on the chemical composition and physical properties of sheep milk. Czech Journal of Animal Science, 47 (2), 80-84.
- Hilali M., El- Mayda E., and Rischkowsky B, 2011.**Characteristics and utilization of sheep and goat milk in Middle East. Small Ruminant Research, 10, 92-101.
- Baltadjiera M., Veinoglou B., Kandarakis J., Edgaryan M., et Stamenova V.,1982.** La composition du lait de brebis de la région de la Plovdiv en Bulgarie et d'Ioannina en Grèce. Le lait, 62, 191-201.
- Rouissi H., Kamoun M., Rekik R., Tayachi L., Hammami S., Hammami M., 2006.** Study of milk quality in dairy sheep in Tunisia.Ciheam-Option Mediterranean's, Série A, 78,307-311.
- Martini M., Mele M., Scolozzi C., and Salari F., 2008a.** Cheese making aptitude and the chemical and nutritional characteristics of milk from Masseseewe's. Italian Journal of Animal Science, 7, 419-437.
- Croguennec T., Jeantet R., et Brule G., 2008.** Fondements Physicochimiques de la Technologie Laitière. Ed. Tec. ET Doc, Paris.
- Kuchtik J., Sustova K., Urban T. and Zapletal D, 2008.** Effect of stage of lactation on milk composition, its properties and quality of rennet curdling in East Friesienewe's. Czech Journal

of Animal Science. 53, 55-63. Laitière en Tunisie. Projet d'assistance technique aux UCPA. BNA/CEE, Projet SEM (01/212/20), Rapport de mission des consultants.

Simos E N., Nikolaou E M., and Zoiopoulos P E., 1996. Yield, composition and certain Physicochemical characteristics of milk of the Epirus mountain sheep breed. *Small Ruminant Research*, 20, 67-74.

Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R., 2002. Composition, propriétés qualités technologique et techniques physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologiques et techniques d'analyse du lait, in **Science et technologie du lait ** Ed. Presses Internationales Polytechnique. Canada.

Maamouri O., Rouissi H., Dridi S., Kammoun M., De Baerdemaeker J., and Karou R. 2008. Mid infrared attenuated total reflection spectroscopy as a rapid tool to assess the quality of sicilo-Sarde ewe's milk during the lactation period after replacing soybean meal with scotch bean in the feed ration. *Food Chemistry*, 106, 361-368.

Kremer R., Rosés L., Rista L., Barbato G., Perdigon F., and Herrera V., 1996. Machine milk yield and composition of non-dairy Corriedale sheep in Uruguay. *Small Ruminant Research*, 19, 9-14.

Pirisi A., Piredda G., and Scintu M F., and Fois N., 2001. Effect of feeding diets on quality characteristics of milk and cheese produced from Sardaewe's. *Ceheam-Option Méditerranéennes, Série A*, 45, 115-119.

Barlowska J., Sz wajkoska M., Litwinczuka Z., and Krol J., 2011. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for Airy production. *Comprehensive Reviews in food Science and Food Safety*. 10, 291-302.

Pellegrini O., Remeuf F., Rivemale M., 1994. Evolution of Physic-chemical characteristics and renneting properties of ewe's milk collected in the ** Roquefort area**. *Le Lait*, 74, 425-442.

Cayot P., et Lorient D., 1998. Structures et techno fonctions des Protéines du laits. Ed. Tec. Et Doc., Lavoisier, Paris.

Rassu S P G., Cannas E A., Nicolussi P., Nudda A., Pulina G. 2007. Machine milking management and milk nitrogen fraction in primiparousewes. *International Journal of Animal Science*, 6 (suppl.1), 591-593.

Potocnik K., Gantner V., KresimirKuterovac., Cividini Angela., 2011. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo*, 62(2): 107-113.

Pelmuş R. S., Pistol G.C., Lazar C., Marin D.E., Gras M., Radu M. and Ghita E., 2012. Preliminary study on milk composition and protein polymorphism in the Romanian Local sheep breed Teleorman Black Head Tsigai. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(5): 7582-7591.

Leonil J., Bos C., Maubois J-L et Tome D. 2001. Protéines ; in : * Lait, Nutrition et Santé* Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris.

Pougheon S., et Goursaud J., 2001. Le Lait : caractéristiques physicochimiques ; in : (Lait, Nutrition et Santé) Ed. Tec. Et Doc. ,Lavoisier, Paris.

Moatsou G., Hatzinaki A., Samolada M., Anifantakis E. 2005. Major whey proteins in ovine and caprine acid wheys from indigenous greek breeds, *International Dairy Journal*, 15, 123-131.

Lock A.L., Sinclair L A., and Bauman D E., 2005. Milk fat synthesis and its regulation in dairy sheep.Proceedings of the 11th Annual.GreatLaks Dairy Sheep Symposium, November 3-5, Vermont, USA.

Gargouri A., 2005. Production et composition du lait de brebis : effet de l'apport de lipides protégés. *Revue de l'élevage et Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 58 (3), 183-190.

Jeantet R., Croguennec T., Schuck P., Brule G., 2007. Science des Aliments ; Biochimie, Microbiologie, Procédés, Ed. Tec. Et Doc., Lavoisier, Paris.

Danthine S., Blecker C., Paquot M., Innocente N., et Deroanne C., 2000. Evolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : synthèse bibliographique. *Le Lait*, 80, 209-222.

Biondi L., Valvo M., Di Gloria M., ScinaroTenghi E., Galofaro V., and Priolo A., 2008.Changes in ewe milk fatty acids following turning out to pasture.*Small Ruminant Research*, 75, 17-23.

Mierlita D., DarabanST.AndLup F., 2011a. Effect of breed on milk fatty acid profile in dairy ewe's, with particular reference to cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid. *South African Journal of Animal Science*, 41 (3), 224-231.

Mahaut M., Jeantete R., Brule G., Schuck P., 2000. Les Produits Industriels Laitiers, Ed, Tec, et Doc, Lavoisier, Paris.

Bianchi L., Bolla A., Budelle E., Caroli A., Casoli C., Pauselli M. and Duranti E., 2004. Effect of udder health status and lactation phase on the characteristics of Sardinian ewe milk.*Journal of Dairy Science*, 87, 2401-2408.

Bovera F., Cutrignelli M.I., Schettini R., and Di Lella T. 52003°.Effets of non-structural carbohydrate levels of diet on milk yield of primiparousSarda ewes. *Italian Journal of Animal Science*, 2 (suppl.), 521-523.

Rassu S P G., Cannas E A., Nicolussi P., Nudda A., Pulina G. 2007. Machine milking management and milk nirogen fraction in primiparousewes.*International Journal of Animal Science*, 6 (suppl.1), 591-593.

Abd Allah M., Abbas F., etAllam F. M., 2011. Factors affecting the milk yield and composition of Rahmani and sheep.*International Journal of Livestock production*.2 (3), 24-30.

Kasana R.C., Salwan R., Yadav S.K. (2011). MICROBIAL PROTEASES : DETECTION, PRODUCTION, AND GENETIC IMPROVEMENT. *Critical Reviews in Microbiology*. 37(3): 262–276.

Kumar N.S., Devi P.S., Nair A.S. (2016). A REVIEW ON MICROBIAL PROTEASES. *International Journal of Advanced Research*, 4(7) : 2048-2053.

Contesini F.J., De Melo R.R. and Sato H.H. (2017). AN OVERVIEW OF BACILLUS PROTEASES: FROM PRODUCTION TO APPLICATION. *Critical Reviews in Biotechnology*, 13(5) :43-54.

Sandus H., Mukhtar H. and Nawaz A. (2017). INDUSTRIAL APPLICATIONS AND PRODUCTION SOURCES OF SERINE ALKALINE PROTEASES: A REVIEW. *GC University Lahore, Pakistan*, 3(1) :00051.

Aguilar J.G.D.A. and Sato H.H. (2018). MICROBIAL PROTEASES: PRODUCTION AND APPLICATION IN OBTAINING PROTEIN HYDROLYSATES. *Food Research International*. 103 :253–262

Jisha V.N., Smitha R.B., Pradeep S., Sreedevi S., Unni K.N., Sajith S., Priji P., Josh M.S and Benjamin S. (2013). VERSATILITY OF MICROBIAL PROTEASES. *Advances in Enzyme Research*. 1(3) : 39-51.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. and Deshpande V.V. (1998). MOLECULAR AND BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF MICROBIAL PROTEASES. *American Society for Microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 :597–635.

Imaye L. and Patil R.C. (2016). IDENTIFYING THE STRAINS HAVING ABILITY TO PRODUCE LIGNINOLYTIC ENZYME LACCASE FROM THE PLETHORA OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM SOIL AND MANGROVE SAMPLES. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5(5) :878-884.

Bennura T., Kumara A.R., Zinjardea S and Javdekar V. (2015). *NOCARDIOPSIS* SPECIES: INCIDENCE, ECOLOGICAL ROLES AND ADAPTATIONS. *Microbiological Research*. 174 :33–47.

Bennur T., Kumar A.R., Zinjarde S.S and Javdekar V. (2015). *NOCARDIOPSIS* SPECIES: A POTENTIAL SOURCE OF BIOACTIVE COMPOUNDS. *Journal of Applied Microbiology*. 120 :1-16

Zerizer H. (2014). LES GENRES D'ACTINOMYCETES (HORS MYCOBACTERIES) IMPLIQUES DANS LES INFECTIONS DANS LA REGION DE CONSTANTINE. Thèse de Doctorat en Sciences en Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Frère Mentouri Constantine 1.

Moletta R. (2002). Gestion des problèmes environnementaux dans les IAA. Paris : Tech et Doc; 600p

Morr, C. V. (1989). Whey proteins: manufacture. *Developments in dairy chemistry*, 4(6), 245-284.

Morr C. V. and, HA E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and Functional properties. *Criticalreviews in food science and nutrition*, 33 (6) (1993), pp431-476

Sottiez P. 1990- Produits Dérivés Des Fabrications Fromagères In : Lait Et Produits Laitiers ;Vache, Brebis, Chèvre, Ed Lavoisier, Paris, 633p.

Violleau V.(1999). valorisation du lactosérum par électrodialyse. Thèse de doctorat.Montpellier

Sottiez, P. (1985). Produits dérivés des fabrications fromagères. Laits et produits laitiers: vache, brebis, chevre/Societe scientifique d'hygiene alimentaire; Francois M. Luquet, coordonnateur, assiste de Yvette Bonjean-Linczowski; prefaces de J. Keilling, R. de Wild

Oliveira, C. Guimarães, P.M.R., Domingues, L. 2011. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications, *Biotechnol.Adv.* 29: 600–609.

Kosikowski, F.V. 1979. Whey utilization and whey products. *Journal of dairy Science* 62(7): 1149-1160.

ABBAS K., (2012) .effet et de traitements thermiques sur les propriétés fonctionnelles de fromages traditionnels : le cas des pates persillées. *agricultural sciences. université blaise pascal - clermont-ferrand ii.* French.

SAOUDI Z, (2012). caractérisation microbiologique et de la protéolyse du fromage traditionnel algérien « bouhezza » de ferme ; thèse magister en science alimentaire ,universitéMentouriCostantine p09 .

KAUFMAN VERONIKA et al. La microfiltration, le traitement thermique et la conservation du lait.

MILLIPORE.Protein Concentration and Diafiltration by Tangential Flow Filtration [consulté en Février 2016].

Annexes :

Annexe 1 : composition de l'acide acétique 10% (V/V)

Acide acétique	10ml
Eau distillé	90ml

Annexe 2 : composition du tampon citrate

Acide citrique.....	17, 5 ml.
Sodium citrate.....	7,5 ml
Compléter le volume jusqu'à 50 ml par l'eau distillé	
Eau distillé	200ml.

Annexe 3 : composition du tampon phosphate pH 6,4.

Na ₂ HPO ₄	1,28 ml.
NaH ₂ PO ₄	3, 73 ml.
Compléter le volume jusqu'à 50 ml par l'eau distillé	
Eau distillé	50 ml.

Annexe 4 : Gel de concentration 10%

H ₂ O	2, 75 ml
Tris (pH 6,8/6.8M).....	1, 25 ml
SDS.....	0, 05 ml
Acr-Bis.....	0, 67 ml
APS.....	0, 05 ml
Temed.....	10µl/0,005 ml

Annexe 5: Gel de séparation 15%

H ₂ O.....	3, 4 ml
-----------------------	---------

Résumé

Le lactosérum est la phase aqueuse du début de la fabrication du fromage qui est séparée du caillé. Il représente environ entre 85 et 90% du volume total du lait et conserve environ 55% des éléments nutritifs du lait.

Dans la présente étude, le lactosérum est obtenue à partir des essais qui sont réalisés sur le lait ovin; quatre centrifugations ont été réalisés nous ont permis d'obtenir le lactosérum ovin pur. Nous avons procédé par la suite à une hydrolyse du lactosérum par une protéase microbienne afin de fractionner les protéines issues des deux pics isolés après chromatographie échangeuses d'anions afin d'obtenir éventuelles des peptides à pouvoir antioxydant plus élevés

D'après les résultats obtenus, Les profils de l'activité anti-radicalaire révèlent que le lactosérum testé possède une activité dose dépendante.

On peut dire que l'activité antiradicalaire du lactosérum ovin brut est élevée et que l'activité des hydrolysats de lactosérum préparés à partir de protéase ne présente pas d'intérêt particulier. Ceci peut être dû à une hydrolyse trop poussée des protéines et à la formation de peptides de trop faible activité.

Mots clé : lactosérum ovin/Chromatographie échangeuse d'anions/hydrolyse/pouvoir antioxydant

ملخص

مصل اللبن هو الطبقة المائية التي يتم فصلها عن اللبن الرائب في بداية صنع الجبن، يمثل ما بين 85 و 90% من اجمالي حجم الحليب و يحتفظ بحوالي 55 % من العناصر الغذائية في الحليب.

في هذه الدراسة تم الحصول على مصّل اللبن من خلال تجارب اجريت على حليب الاغنام. اربعة عمليات طرد مركزي استخدمت سمحت لنا من استخلاص مصّل لبن الاغنام نقي، ثم شرعنا في تحلل مصّل اللبن مع البروتيز الميكروبي بعد تجزئة البروتينات بعملية كروماتوجراف على عمود من اجل الحصول على بيبتيديات محتملة مع قوة مضادة للاكسدة اعلى

وفقا للنتائج التي تحصلنا عليها، اكتشفنا بان مصّل اللبن المختبر له نشاط يعتمد على الجرعة كما يمكننا القول بان النشاط المضاد للاكسدة في مصّل لبن الاغنام الخام مرتفع و ان نشاطه المحضر من البروتياز ليس له اهمية خاصة و قد يكون هذا بسبب لتحلل المائي المفرط للبروتينات و تكوين بيبتيديات ذات نشاط منخفض للغاية.

الكلمات المفتاحية: مصّل لبن الاغنام/ كروماتوجراف تبادل الانيون /التحلل المائي/القوة المضادة للاكسدة

Abstract:

Whey is the aqueous phase at the start of cheese making which is separated from the curd, it makes up about 85 to 90 % of the total milk volume and retains about 55 % of the nutrients in milk.

In the present study, a biochemical characterization of whey was obtained from tests, which are carried out on sheep milk. Four centrifugations were carried out. This allowed us to obtain pure sheep whey, the latter subjected to chromatography on a DEAE sepharose column in order to purify the proteins they contain, followed by electrophoresis step on Acrylamide gel in the presence of SDS PAGE in which proteins also migrate through. Which Instant Blue™ can identify after their coloration.

A proteolysis of the two best peaks was carried out laying 4 hours for each of them at the end of this experiment a free radical DPPH is added to the supernatant to determine the antioxidant power and the absorbance measured by spectrophotometry at 515 nm.

Keywords: sheep whey/ separate column chromatography /proteolysis/antioxidant power.