

# Purification Partielle et caractérisation de protéase coagulant le lait extraite du proventricule de la Dinde (*Meleagris gallopavo*)

## Partial purification and properties of protease milk clotting obtained from turkey proventriculus (*Meleagris gallopavo*)

MEKHANEG B. (1), GIRARDET J-M. (2), BELLAL M-M. (1)

(1) ENSA Ecole Nationale Supérieur d'Agronomie, Laboratoire de Technologie Alimentaire

(2) URAFPA, équipe protéolyse et biofonctionnalités des protéines et peptides (BP2P), Nancy-Université

### INTRODUCTION

La présure de veau est l'agent coagulant le plus utilisé pour la coagulation du lait. C'est l'extrait de la caillette de veau non sevré, qui comprend la chymosine, enzyme majoritaire, et la pepsine, dans un rapport massique supérieur à 1.38 (Desmazeaud et al. 1999).

Bien que la présure soit encore l'enzyme coagulante la plus utilisée en fromagerie, sa production connaît une pénurie mondiale croissante. Cette pénurie est due essentiellement à une augmentation croissante de la production et la consommation du fromage, et l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production de présure. Cette pénurie a provoqué des fluctuations très importantes de son prix (Cuvelier, 1993).

Pour pallier au déséquilibre de l'offre et de la demande en matière de présure de veau, différentes solutions ont été proposées : à savoir, la mise en œuvre de protéases d'origine animale (pepsine bovine, pepsine porcine), origine végétale (*cynara cardunculus*), d'origine microbienne (*Endothie parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*) sont autorisées en remplacement de la présure de veau dans certains pays. Ainsi, l'objet de notre travail s'inscrit dans une optique de recherche et développement, décrivant la méthode d'extraction, de purification et de caractérisation de la protéase du proventricule de la Dinde (*Meleagris gallopavo*).

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

La matière première est représentée par le proventricule provenant du tube digestif de la dinde, des échantillons de 100 g débarrassés de leurs contenues et leurs graisses.

#### 1.2. EXTRACTION DES ENZYMES

L'extraction de l'enzyme brut est réalisée dans Na Cl 5%, et acide borique 0.2% dans un rapport 1/2 (masse de la matière /volume de la solution d'extraction) (Tsouli, 1974) modifiée par nos soins.

#### 1.3 METHODES DE PURIFICATION

##### 1.3.1 Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)

La prépurification est faite par le sulfate d'ammonium à un taux de saturation de 50% de l'extrait enzymatique brut, suivie d'un passage sur colonne échangeuse d'anions mono Q HR 5/5 sur AKTA purifier (Figure 1).

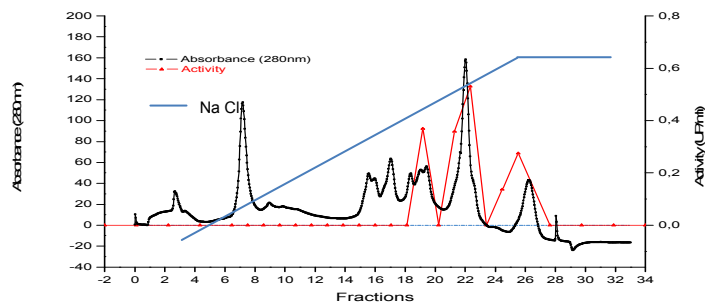
##### 1.3.2 Electrophorèse sur gel polyacrylamide dénaturante.

Les fractions coagulantes issues de la FPLC, ont subi une électrophorèse dénaturante sur gel SDS page sur gel de séparation de 12%. (Figure 2).

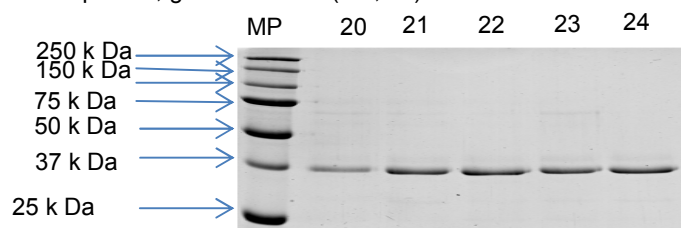
##### 1.3.3 Détermination de l'activité coagulante.

L'activité coagulante exprimée en UP (unité présure) de l'extrait enzymatique brut et purifié selon la méthode de Berridge (1952). Elle est définie comme étant la quantité d'enzyme par ml de l'extrait enzymatique qui provoque la floculation de 10 ml de substrat en 100sec à 35°C.

### 2. RESULTATS



**Figure 1 :** Profil d'élution de l'extrait enzymatique brut par filtration sur colonne échangeuse d'anions mono Q HR 5/5 sur AKTA purifier, gradient NaCl (0-0,5M)



**Figure 2 :** Electrophorogramme des fractions coagulantes issues de la colonne mono Q. MP : marqueurs protéiques, piste 20, 21, 22, 23, 24 : fractions coagulantes

Le profil d'élution obtenu révèle la présence de cinq fractions coagulantes (20, 21, 22, 23 et 24) au niveau du sixième pic. (Figure 1). L'électrophorogramme des fractions coagulantes, montre des bandes uniques sur SDS page avec un poids moléculaire de 36.5 kDa. (Figure 2)

### 3. DISCUSSION

La chromatographie par échange d'ions permet d'éliminer les protéines inactives et de purifier les fractions coagulantes.

La caractérisation de la protéase coagulante permet de déterminer les conditions optimales de coagulation (pH 5.5, température 55°C et concentration en protéine de 6.7 mg/ml).

### CONCLUSION

La purification partielle de la protéase de (*Meleagris gallpavo*) a montré la présence de cinq fractions coagulantes dont leurs poids moléculaire est de 36.5 kDa environ, d'autres méthodes de purification devraient être appliquées pour obtenir des résultats souhaitables.

**Berridge, N.J.** 1952. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. J. Dairy Res., 9: 328-329.

**Cuvelier, G.F.** 1999. Production des enzymes In: Biotechnologie. Goo. Scriban R, 5eme ed., pp: 345-363.

**Desmazeaud, M., Spinnler, E.**, 1997. Laits et produits laitiers. In «Enzymes en agroalimentaires». Ed.V.Larreta-Garde.tech.et Doc. Lavoisier.

**Tsouli, J.**, 1974. Etude comparée de l'activité de trois variétés d'artichauts du genre *Cynara scolymus* sur coagulation du lait. Le Lait, 537: 415-421