



DÉPARTEMENT BIOLOGIE

Mémoire de fin d'étude

Présenté par

MOKHTARI Soumia

Pour l'obtention du diplôme de

Master en biologie

Spécialité: *Production et Transformation Laitière*

THÈME

**Caractérisation électrophorétique des caséines du  
lait de vache collecté durant les saisons d'hiver et de  
printemps**

Soutenu publiquement le **18/09/2018**

Devant le jury :

Président : M.NEMMICHE

Examineur : Mme. HENNI

Encadreur : Mme. RACHIDI NADRA

Co-encadreur : M.SASSI HACHEMI

Travaux effectués au laboratoire LSTPA

Année universitaire : 2017-2018

# Remerciement

*Nous remercions Allah le miséricordieux le tout puissant de nous avoir donné la santé et patience qui nous ont permis de mener à terme ce modeste travail;*

*Nous tenons à remercier:*

*Notre promotrice M<sup>me</sup> RACHIDI NADERA et le Co-encadreur Monsieur HACHEMI SASSI pour le temps consacré à l'encadrement de ce travail; on la remercie pour nous avoir donné la chance de vivre cette expérience très riche sur le plan scientifique, humain et pour l'immense aide et confiance qu'elle nous a accordé.*

*Nos remerciements s'adressent à l'ensemble des membres de jury. M.NEMMICHE et M<sup>me</sup>. HENNI*

*Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.*

*Enfin nos remerciements sont dressés plus particulièrement à nos familles et nos amis (es) qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tout au long des années.*

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail*

*A ceux qui m'ont donné beaucoup de chose que Dieu vous protégé.*

*A mes très chers parents : Pour m'avoir toujours entourée d'affection, soutenue, rassurée et aidée, merci pour tant de patience et de force.*

*A ma petite famille: Pour aides, soutiens et encouragements.*

*A mes chers oncles: Qui m'a toujours encouragée, a toujours gardé confiance malgré mes doutes, pour son aide précieuse et sa persévérance toute au long de mon travail.*

*A tout la famille Mokhtari*

*A tout la promotion de production et transformation laitier .*

*Sans oublier tous les enseignants qui m'ont formé du primaire à l'université.*

*A toute personne que j'aime.*

## Résumé

Le lait bovin est très pris en Algérie, afin de répondre aux besoins de la population qui ne cesse d'augmenter et qui consomme le lait à l'état frais ou transformé nombreuses sont les industriels qui transforment le lait en produits dérivés surtout le fromage. Pour ce dernier cas, il est établi que seuls les laits possédant la caséine  $\alpha_1$  exprimée avec fort pourcentage pourraient donner lieu à la fabrication de fromages.

Pour cela nous avons mené une étude qui vise dans un premier temps à évaluer la quantité de caséine produite dans ces laits de l'Ouest Algérien. Les résultats obtenus montrent que la fraction de caséine était plus élevée en printemps (80.52%) qui coïncide avec la période de forte lactation contre 79.75% pour le lait de l'hiver.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à l'isolement et à la caractérisation des caséines. Pour cela nous avons utilisé la précipitation à pH isoélectrique des caséines (pH 4.6). Les fractions ont été ensuite contrôlées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée. Les profils électrophorétiques résultants ont permis d'identifier la présence de 04 bandes qui correspondent aux caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et K caséine. La quantification de ces dernières a mis en évidence certaines différences entre les laits obtenus durant les deux saisons où la caséine  $\alpha_1$  était plus importante en printemps 41.10% contre 38.80% en hiver.

L'utilisation de la PAGE-urée est plus adaptée pour l'étude des profils de caséines.

**Mots clés** : lait cru, saison, caséines, électrophorèse.

## **Abstract**

The cattle milk is very busy in Algeria, in order to meet the needs of the population which is constantly increasing and who consumes the milk in the fresh state or transformed many are the manufacturers who transforms the milk products derived mainly cheese. For the latter case, it established that only milks possessing  $\alpha_1$  casein expressed with a high percentage could give rise to the manufacture of cheeses.

For that, we conducted a study, which aims at first to evaluate the amount of casein produced in these milks of western Algeria. The results obtained show that the casein fraction was higher in spring (80.52%) which coincides with the period of high lactation against 79.75% for winter milk.

In a second step, we proceeded to the isolation and the characterization of the caseins. For this, we used the isoelectric pH precipitation of caseins (pH 4.6). The fractions were monitored by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of urea. The resulting electrophoretic profiles made it possible to identify the presence of 04 bands, which correspond to the caseins  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  and K casein. The quantification of the latter showed some differences between the milks obtained during the two seasons when casein  $\alpha_1$  was greater in spring 41.10% against 38.80% in winter.

The use of PAGE-urea is more suitable for the study of casein profiles.

**Key words:** raw milk, season, caseins, electrophoresis.

## التلخيص

إن حليب الأبقار كثر الاستهلاك في الجزائر، وذلك من أجل تلبية احتياجات السكان التي تتزايد باستمرار والذين يستهلكون الحليب في حالة طازجة أو محول. العديد من الشركات المصنعة التي تحول الحليب الى منتجات المشتقة منه خاصة الجبن. ثبت أن الحليب الذي يمتلك الكازين  $\alpha 1$  بنسبة هو الأفضل في حالة تصنيع الجبن.

لذلك أجرينا دراسة تهدف في البداية إلى تقييم كمية الكازين الموجودة في بعض العينات التي اخذناها من غرب الجزائر. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن كمية الكازين كانت أعلى في الربيع (80.52%) والذي يتزامن مع فترة الانتاج المكثف للحليب مقابل 79.75% بالنسبة للحليب المنتوج في فصل الشتاء.

في الخطوة الثانية، شرعنا في عزل وتوصيف الكازين. لهذا استخدمنا ترسيب pH isoélectrique من الكازين (الرقم الهيدروجيني 4.6). ثم تم رصد الأجزاء بواسطة الكهربائي polyacrylamide في وجود اليوريا. جعلت التشكيلات الكهربائي الناتجة من ذلك من الممكن تحديد وجود 04 نطاقات تتوافق مع الكازينات  $\beta$  ،  $\alpha 2$  ،  $\alpha 1$  و K casein. أظهر التحليل الكمي للأخير بعض الاختلافات بين الحليب الذي تم الحصول عليه خلال الموسمين عندما كان الكازين  $\alpha 1$  أكبر في الربيع 41.10% مقابل 38.80% في الشتاء.

استخدام PAGE-urea أكثر ملاءمة لدراسة خصائص الكازين.

**الكلمات المفتاحية:** الحليب طازج ، الموسم ، الكازين ، électrophorèse.

## Sommaire

Remerciement

Dédicace

Liste des tableaux

Résumé

### Première partie: Partie bibliographique

Introduction générale.....01

### Chapitre I: LAIT DU VACHE

1 .la composition du lait .....02

2. Structure et propriété générale des constituants du lait.....03

2.1. Eau.....03

2.2. Matière grasse .....04

2.3 .Les Glucides.....05

2.4 Matières azotés .....05

2 .5 Matières salines .....06

2.6. Vitamines .....06

2.7. Enzymes .....06

3. Les propriétés physico-chimiques de lait.....06

3.1 La densité de lait .....06

3.2 Point de congélation.....07

3.4 Point d'ébullition.....07

3.5 Acidité du lait .....07

4. Facteurs de variations de la composition du lait.....08

4.1Influence de la race.....08

4.2 Taux protéique .....08

4.3 Taux butyrique .....	08
4.4 Teneur en minéraux .....	08
4.5 Influence de l'âge .....	08
4.6 Influence de l'état de santé .....	08
4.7 Influence de l'alimentation .....	09

## **Chapitre II: LES CASEINES**

1. La caséine .....	10
1.1 La caséine S1 .....	10
1.2 La caséine S2 .....	10
1.3 Protéines de lactosérum .....	11
2. Propriétés générales des constituants du lait de vache, responsables d'allergie ou d'intolérance .....	11
2.1 Les caséines .....	12
3. Les protéines du lait de vache .....	12
3.1 Les caséines .....	12
3.2 La bêta-lactoglobuline (BLG) .....	12
3.3 L'albumine sérique .....	13
3.4 Les immunoglobulines .....	13
3.5 La lactoferrine .....	13
3.6 Le lactose .....	13
4. Description et composition psycho-chimique de la micelle .....	14
4.1 Aspects et propriétés .....	14

4.2 .la micelle .....	15
4.3. Action du pH .....	15
4.4. Action de la température .....	16
4.5. Action des enzymes .....	17

### **Chapitre III: Les Méthodes De Séparation**

1. L'électrophorèse .....	19
1.2. La technique SDS-PAGE .....	19
1.3 .La technique PAGE .....	19
1.4. La technique Acide – PAGE .....	20
2. La Chromatographie.....	20
2.1. Définition de la chromatographie .....	20
2.2 Les différents types de chromatographie.....	20
3. Optimisation d'une méthode chromatographique.....	21
3.1Facteur de résolution en chromatographie.....	21
3.1.2Polarité des colonnes de CPG.....	21
3.1.3L'injecteur de CPG.....	21
4. Chromatographie sur couche mince.....	21
4.1 Dosage par la méthode de normalisation interne.....	21
4.2Les grandeurs de rétention.....	21
4.3Dosage par étalonnage interne.....	21
4.4Dosage par étalonnage externe.....	22
4.5Efficacité des colonnes de chromatographie.....	22

4.6 Dosage par chromatographie.....	22
4.7 Dosage par la méthode des ajouts dosés.....	22
5. Chromatographie de partage.....	22
6. La chromatographie d'exclusion.....	22
7. La chromatographie d'échange d'ion.....	22
8. Chromatographie d'adsorption .....	22

## **Deuxième partie: Partie expérimentale**

### **I. Matériels et méthodes**

1. La région d'étude .....	23
2. Matériels .....	23
2.1 Matière première.....	23
2.2 Appareillage .....	23
2.3 Petite matériels .....	24
2.4 Produit chimique et réactifs .....	24
3. Méthodes d'analyse .....	24
3.1 Collecte du lait .....	24
3.2 Isolement des protéines du lait .....	25
3.2.1 Ecrémage .....	25
3.2.2 Séparation des caséines du lait .....	25
4. Electrophorèse.....	25
4.1 Principe général .....	25
4.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamides.....	26
4.3 Conduite de l'électrophorèse .....	26

4.4	Electrophorèse en présence d'urée et de 2- mercaptoéthanol .....	26
4.5	Révélation des bandes de migration électrophorétique .....	27
	- fixation .....	27
	- la coloration .....	27
	- la décoloration .....	27

### **Résultats et Discussions**

1.	Evaluation de la qualité biochimique .....	28
1.1	Taux butyreux .....	28
1.2	Taux protéique .....	29
1.3	Taux de caséine .....	29
2.	Analyse électrophorétique des caséines totales .....	30
2.1	Quantification des fractions de caséines.....	31

### **Conclusion**





## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Composition moyenne du lait de différentes espèces :(Lebeuf y.et al., 2002) (p2)

**Tableau 2** : Composition du lait de vache et du lait humain :( Lebeuf Y.et al. 2002). (p2)

**Tableau 3** : décrit la composition générale du lait de vache. Constituants, mineurs ; enzymes, vitamines, pigments, cellules diverses, gaz (CAROLOME ,L,2010).(p3)

**Tableau 4** : modification chimique des laits en cas de mammites /composition en g/l (LUQUET ,1985).(p9)

**Tableau 5** : classification des protéines (p11)

**Tableau 6** : classification de protéine de lactosérum. (p11)

**Tableau 7** : composition chimique moyenne des analysés durant les saisons d'hiver et de printemps. (p28)

## Partie bibliographique

# **Chapitre 01: lait de vache**

## **Introduction**

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes : le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, et bien nourrie et non surmenée .il doit être recueilli proprement et ne contenir de colostrum.

La dénomination lait, sans indication de l'espèce animale de provenance est réservée au lait de vache

Tout lait provenant d'une femelle laitière autre que la vache doit être désigner par la dénomination lait suivie de l'indication de l'espèce animale dont il provient, exemple : lait de brebis de chèvre et lait de femme

Le dictionnaire de terminologie de F.I.L (fédération international de laiterie), (IDF, 1983) définit ainsi le lait en 1983 : le produit de la sécrétion mammaire normale obtenu par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ou sous traction.

Selon LUQUET .F.M ; 1985 ne peut être considéré comme lait propre a la consommation humaine :-le lait d'animaux atteint de maladie

-Le lait coloré, malpropre ou malodorant

- le lait provenant d'une traite opérée

Le lait d'origine animal peut jouer un rôle important dans l'alimentation des enfants dans la population, ne bénéficiant que d'un très faible apport en lipides et ayant un accès limité aux autres aliments d'origine animale.

L'espèce de l'animal laitier, la race, l'âge et l'alimentation, ainsi que le stade de lactation, la parité (le nombre de parturitions) le système d' exploitation l'environnement physique et la saison influencent la couleur, la saveur et la composition du lait et permettent de produire une variété de produits laitiers

## 1. La composition de lait

Le lait est le produit des sécrétions mammaires de mammifères. Ainsi, on retrouve différents types de lait destinés à alimenter le nourrisson.

La composition du lait varie selon les espèces animales mais aussi selon différents facteurs tels que l'individualité, la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison, l'âge.

En règle générale, l'eau est le constituant principal du lait. La proportion des autres constituants varie selon les espèces. (Centre d'information et de Recherche sur les Intolérances et l'Hygiène Alimentaire 2000).

**Tableau 1** : Composition moyenne du lait de différentes espèces :(Lebeuf y.et al., 2002)

<b>Animaux</b>	<b>Eau (%)</b>	<b>Matières grasses (%)</b>	<b>Glucides (%)</b>	<b>Minéraux</b>
<b>Vache 87,5</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	<b>4,7</b>	<b>0,7</b>
<b>Chèvre 87,0</b>	<b>87.0</b>	<b>2,9</b>	<b>3,8</b>	<b>0,9</b>
<b>Brebis 81,5</b>	<b>5,3</b>	<b>7,4</b>	<b>4,8</b>	<b>1,0</b>
<b>Chamelle 87,6</b>	<b>3,0</b>	<b>5,4</b>	<b>3,3</b>	<b>0,7</b>
<b>Jument 88,9</b>	<b>2,5</b>	<b>1,9</b>	<b>6,2</b>	<b>0,5</b>

Dans l'alimentation du nouveau-né et du jeune enfant, deux types de laits sont prédominants, le lait humain et les laits adaptés, qui sont la seule source de nourriture du nourrisson avant la diversification alimentaire. Le tableau 2 permet d'observer les différences de composition entre le lait de vache et le lait maternel.

**Tableau 2** : Composition du lait de vache et du lait humain :( Lebeuf Y.et al. 2002)

<b>Nutriment</b>	<b>Vache</b>	<b>Humain 100</b>
<b>Protéines (g)</b>	<b>3, 3</b>	<b>1,0</b>
<b>caséines</b>	<b>2,7(82%)</b>	<b>0,6(60%)</b>
<b>lactosérum</b>	<b>0.6 (18%)</b>	<b>0,4(40%)</b>
<b>Matières grasse (g)</b>	<b>3,3</b>	<b>4,4</b>
<b>Lactose (g) 4,7</b>	<b>4,7</b>	<b>6,9</b>
<b>Minéraux (mg)</b>	<b>0,7</b>	<b>02</b>
<b>Calcium (mg)</b>	<b>119</b>	<b>32</b>
<b>Phosphore (mg)</b>	<b>93</b>	<b>14</b>
<b>Magnésium (mg)</b>	<b>13</b>	<b>3</b>

<b>Potassium (mg)</b>	<b>152</b>	<b>51</b>
<b>vitamines</b>		
<b>Riboflavines (mg)</b>	<b>0,16</b>	<b>0,04</b>
<b>Vit B 12 (ug) 0,36</b>	<b>0,04</b>	

Ce tableau permet de constater que la proportion de chaque constituant est différente dans les deux laits. La quantité de protéines est supérieure dans le lait de vache alors que le lactose se retrouve en plus grande quantité dans le lait humain.

**Tableau 3** : décrit la composition générale du lait de vache. Constituants, mineurs ; enzymes, vitamines, pigments, cellules diverses, gaz (CAROLOME ,L,2010)

Constituants majeurs	Variations limites%	Valeur moyenne%
eau	85.5-89.5	87.5
Matière grasse	2.4-5.5	3.7
Protéine	2.9-5.0	3.2
glucides	3.6-5.5	4.6
minéraux	0.7-0.9	0.8

## 2. Structure et propriété générale des constituants du lait

### 2.1. Eau

L'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion. La présence d'un dipôle et doublets d'électrons lui confère un caractère polaire. Ce caractère polaire est ce qui lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum. Puisque la matière grasse possède un caractère non polaire, elle se dissout et formeront une émulsion du type huile dans l'eau, il en est de même pour les micelles de caséines qui formeront une suspension colloïdale puisqu'elles sont solides (GRAPPIN R. et R. JEUNET, 1995).

### 2.2 Matière grasse

Les matières grasses sont présentes dans le lait sous forme d'une émulsion de globules gras de 1 à 8 micromètre de diamètre.

La taille des globules dépend à la fois des facteurs génétiques et de la technologie de la traite. Les laits du début de lactation tendent à contenir des globules plus gras que ceux de fin de lactation

La traite mécanique augmente le fractionnement des lipides du lait en diminuant leurs tailles et en augmentant leur nombre, l'homogénéisation réduit considérablement la dimension des globules.

La teneur en matière grasse du lait est appelée taux (TB). (HOLDEN et COULON, 1991)

Les lipides du lait sont constitués de :

- 98% de triglycérides.

- 1% de phospholipides

- 1% de stérols (cholestérols), tocophérol et vitamines liposolubles.

- Les acides gras du lait sont très variés, le lait contient :-les acides gras à chaîne courte de C4 à C8 (C4 3%, C6 3,5% et C8 1%)

- Les acides gras à chaîne moyenne de C8 à C14 (C8 1%, C10 3%, C12 3% et C14 9%)

- les acides gras à chaîne longue de C16 à C18 (C16 25% à 30% et surtout C18 40% à 48%)

L'origine des acides gras est double :

Les acides gras dont la chaîne carbonée contient de 4 à 12 atomes de carbones sont synthétisés par la mamelle à partir de précurseurs sanguins : l'acétate et le butyrate d'origine ruminée. Ces acides gras sont plus abondants dans le lait ruminants que dans le lait des monogastriques.

Les acides gras dont la chaîne carbonée contient 18 (et plus) atomes de carbones sont directement prélevés dans le plasma sanguin, ils proviennent de l'alimentation, des réserves adipeuses ou d'une synthèse dans d'autres tissus que la mamelle.

Les acides gras à 14 et 16 atomes de carbones qui proviennent soit d'une synthèse par la mamelle, soit d'un prélèvement dans le flux sanguin.

La teneur en acides gras insaturés est faible dans le lait de ruminant et moyenne dans le lait des monogastrique. Egalement le lait de ruminants est pauvre en acides gras essentiels par rapport au lait des monogastriques. (HOLFEN et COILON ; 1991)

### **2.3. les Glucides**

Le lactose est quasiment le seul glucide du lait de vache et représente 99%des Glucides du lait. La teneur en lactose augmente avec le cycle de lactation, la valeur moyenne se situant entre 48 et 50 g/l dans le lait de vache ; il est fabriqué à partir d'une combinaison entre la molécule de glucose et la molécule de galactose.

Cependant, d'autres glucides sont présentés dans le lait de vache par un classement basé sur leur polarité électrique (HOLDEN et COULON ; 1991 ; KUZDZAL. Et al ,1990)

- glucides neutres : lactose (composé majeur), glucose 70mg/l et galactose 20mg/l.
- glucides azotés : N - acétyllucaosamine (sous forme de trace)

N- acétyllactosamine (sous forme de trace)

- glucides azotés acides : acide N-acétylneuramique ou acide sialique (sous forme de trace).

### **2.4. Matières azotés**

Les protéines du lait représentent 95% des matières azotées totales du lait (UNDERWOODE J.et SUTTLEN ,1999) .les restants sont des constitués :

- d'acides aminés libres et de petits peptides.
- d'azote non protéique, essentiellement de l'urée (0,3 à 0,4 g/l) mais aussi de la créatine de l'acide urique.
- les protéines du lait sont constituées de 80%de caséines.

### **2.5. Matières salines**

Elles sont présentées sous forme de phosphate de citrate et de chlorure de potassium, de calcium, de magnésium, leur intérêt est surtout diététique ; le lait est une excellente source de magnésium et de phosphate (GOURSAUD J.1985 dans LUQUET ; 1980).

### **2.6. Vitamines**

Le lait contient différentes vitamines :

- les vitamines liposolubles A, D3 et E. leur teneur dépend de l'alimentation.
- les vitamines hydrosolubles B1, B2, ces vitamines sont synthétisées par les bactéries du rumen chez les ruminants. (ABDEL A, 1981)

## **2.7. Enzymes**

Le lait contient principalement trois groupes d'enzymes ; les hydrolases .les déshydrogénases et les oxygénases.

Les deux principaux facteurs qui influent sur l'activité enzymatique sont le Ph et la température .En effet, chaque enzyme possède un Ph et une température d'activité maximale (AMIOT J .2001)

## **3. Les propriétés physico-chimiques de lait**

### **3.1. La densité du lait**

La densité de lait à 15C° varie de 1.028 à 1.035 pour une moyenne de 1.032 chacun des constituants agit sur la densité du lait. On sait que la crème à 35 %p possède une densité de 0,996 et le lait écrémé une densité de 1.036 .Etant donné que la matière grasse est le seul constituant qui possède une densité inférieure à 1 , plus un lait ou un produit laitier contient un pourcentage élevé en matière grasses, plus sa densité sera basse . De plus, les solides non gras ont une densité supérieure à 1. Par conséquent, plus le teneur en solides non gras est élevé, plus la densité du produit laitier sera élevée, donc un écrémage du lait augmentera sa densité et qu'un mouillage ou une addition d'eau la diminuera (CAROLE L. VINGOLA.2010).

### **3.2. Point de congélation**

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau puisque la présence de solides solubilisés abaisse le point de congélation .Il peut varier de -0.555C°à -0.575C° avec une moyenne à -0.555. Un point de congélation supérieur à -0 .530C° permet de soupçonner une addition d'eau au lait. (CAROLE .VIGNOLA ,2010)

### **3.3. Point d'ébullition**

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée.

Le point d'ébullition du lait subit l'influence de la présence des solides solubilisés.

Il est également supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100.5°C. Cette propriété physique diminue avec la pression, on applique ce principe dans les procédés de concentration de lait. (FOURNIER S.2000)

### **3.4. Acidité du lait**

Dès sa sortie du pis de la vache, le lait démontre une certaine acidité, cette acidité est due principalement à la présence de protéines, surtout les caséines et la lactalbumine, de substances minérales telles que les phosphates et le  $\text{CO}_2$ , et d'acides organiques, et le plus souvent l'acide lactique

L'acidité titrable est exprimée en degré doronic ( $D^\circ$ ) : 1D correspond à 0,1g de l'acide lactique par litre N/9 des composants acides de lait en présence de la phénolphthaléine

Dans le lait frais, PH étant le PH étant neutre (par exemple 18 $D^\circ$ ) ne signifie pas qu'il y a 1,8g d'acides pouvant réagir sur la soude, cette valeur rend compte de l'acidité naturelle du lait frais, qui est liée à la richesse en matière sèche (LEVECQUE P1997)

## **4. Facteurs de variations de la composition du lait**

### **4.1. Influence de la race**

Le type génétique a une influence sur la composition du lait notamment le taux protéique, taux butyrique, ainsi la teneur en minéraux (LUQUET, 1985)

### **4.2 Taux protéique**

L'écart du taux azoté est de 2.2 pour 1000 entre françaises frisonnes et normandes et de 1.9 pour 1000 entre Holstein et françaises frisonnes (LUQUAT ,1985)

#### **4.3 Taux butyrique**

Le taux butyrique des normandes est supérieur à celui des françaises frisonnes d'environ 3g pour 1000 et celui des françaises frisonnes à celui des Holstein de près de 2g pour 1000 (LUQUET, 1985).

#### **4.4 Teneur en minéraux**

Selon la race, les laits seront plus au moins riches en tel ou tel élément : chez jersey le lait est riche en Ca que celui de la frisonne ou Montbéliard, lui-même riche en K. le lait de la frisonne est riche en élément solubles dans l'eau tels que K, Na et Cl, ce fait est moins riche en protéines et en matières grasse que celui des jersiaises (LUQUET, 1985).

#### **4.5 Influence de l'âge**

La production laitière augment durant les premiers lactations et atteint le plus souvent son maximum à la quatrième et cinquième lactation.

A L'opposé de la production du lait, le taux butyreux est relativement stable avec l'âge.

(LAUSANNE ; 1969, CRAPLET et AUDAL ; 1983)

#### **4.6 Influence de l'état de santé**

La mammite est une inflammation d'un ou plusieurs quartiers de la mamelle due à la présence d'un ou de plusieurs types de microorganismes pathogènes.

Une mammite provoque un trouble de la sécrétion lactée, plus la mammite n'est grave, Plus la composition du lait se rapproche de celle du plasma sanguin.

La mamelle lésée se comporte comme un orange d'élimination, il y a diminution des molécules élaborées et augmentation des molécules filtrées.

**Tableau 4 :** modification chimique des laits en cas de mammites /composition en g/l

(LUQUET ,1985).

<b>composants</b>	<b>lait normal</b>	<b>Modification apportée</b>
Lactose	48	Diminution
Protéines solubles	6.5	augmentation
Caséines	27	Diminution
Lipides totaux	38.5	Diminution
Matière minérale	7.5	augmentation

#### **4.7. Influence de l'alimentation**

Un animal insuffisamment nourri verra sa production laitière diminuer rapidement et son organisme affaibli ; alors qu'un animal suralimenté engraissera et souffrira des troubles digestifs qui auront finalement pour effet l'entraver la sécrétion laitière.

Certains aliments ou rations alimentaires ont une influence propre sur la production et la composition du lait, les ensilages des maïs permettent de produire un lait plus riche en matières grasse et en protéines que les rations à base de foin et ensilage d'herbes.

Durant l'été, on assiste souvent à une chute importante de la production laitière et du taux protéique en raison d'une herbe insuffisante en quantité et en qualité.

Certains aliments peuvent communiquer au lait des défauts organoleptiques, c'est le cas de la moutarde, des choux, des navets, de l'ail, des résidus industriels .pulpes ou déchets fermentés qui peuvent provoquer des troubles digestifs chez l'enfant qui consomme ce lait directement (HOLDEN ,1991).

# ***Introduction Générale***

---

## **INTRODUCTION**

Le lait est l'aliment le plus consommé dans le monde .En effet la production laitière mondiale en 2012 se chiffrait à 632 .6 millions de tonnes avec une répartition hétérogène entre les continents, l'Asie en premier lieu 27,55% contre 4,71 % pour l'Afrique (CNIEL ,2002).

L'Algérie, répertoriée mondialement comme étant le deuxième importateur de lait et produits laitiers (ABDELJALI M. C. et al, 2005), n'a jamais pu satisfaire les besoins de sa population en ce produit, malgré la succession de plans laitiers, visant à relancer la production laitiers.

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, et se place ainsi au troisième rang mondial.

En matière d'importation de laits et produits laitiers après L'Italie et le Mexique.

La composition du lait varie selon différents facteurs tels que L'individualité , la race , la période de lactation , la saison , l'âge l'alimentation .

La caséine est la principale protéine du lait , elle présente près de 80% de l'ensemble des protéines du lait elle est constituée de plusieurs fractions caséiniques toutes importantes dans la fabrication fromagère d'où l'intérêt apporté par les fromages à cette molécule jugée noble .

## **Chapitre 02: les caséines**

## 1. La caséine

La caséine est la principale protéine du lait de vache. Elle représente environ 80% des protéines contenues dans le lait. les 20 % restants étant des protéines du sérum .les caséines sont des polypeptides phosphorés associés surtout à des constituants minéraux, en particulier le calcium, mais aussi le phosphate, le magnésium et le citrate, de manière à former des micelles de phospho-caséines de calcium .la taille des micelles se situe entre 100 et 500 nm ,avec un diamètre moyen âpre 180 nm et elle varie principalement selon l'espèce animale .la saison et le stade de lactation. On peut séparer trois composants.

Principaux au sein des caséines : caséine alpha caséine beta, caséine kappa chaque fraction de caséine a un rôle bien déterminé qu'on peut citer :

**1.1 La caséine S1** : c'est la protéine la plus importante en masse, elle possède 199 AA pour 23 614 g/mol. Cette caséine est très sensible au calcium au PH normal du lait (ph =6,4) : quelle que soit la température et en présence de calcium on constate une formation de flocons .Dans la micelle, la caséine aS1 est peu accessible qu'elle se situe au cœur de la micelle masquée par d'autres caséines (**Grippon, 1 960**).

**1.2 La caséine S2** : Elle représente 8 à 11 % de la micelle de caséine, possède 207 AA et 13 à 10 phosphates et son poids moléculaire estimé varie de 25150 à 253 90g/mol Grace à la présence des 2 résidus cystéine, les molécules peuvent s'associer en dimères qui s'agrègent entre eux par interaction électrostatiques pour former des polymères. par sa richesse en phosphate, elle est très sensible au calcium, et comme pour aS1.Elle sensible au calcium à température ambiante mais après déphosphorylation (expérience de ISBM).

**Tableau 5** : classification des protéines

Nom de protéines	% de protéines	Nombre des AA
<b>Caséines</b>	<b>75-85</b>	
<b>Caséines 1</b>	<b>39-46</b>	<b>199</b>
<b>Caséines 2</b>	<b>8-11</b>	<b>207</b>
<b>Caséinea</b>	<b>25-35</b>	<b>20</b>
<b>caséinee</b>	<b>8-15</b>	<b>169</b>
<b>caséinea</b>	<b>3-7</b>	

**1.3 Protéines de lactosérum** : les autres protéines du lait sont présentes dans le lactosérum, elles représentent environ 20% des protéines totales, se retrouvent sous forme de solution colloïde .les protéines sériques sont définies comme étant les protéines solubles présentes dans le lactosérum suivant

**Tableau 6** : classification de protéine de lactosérum.

Nom de protéine	% protéines	Nombre d'acides aminés
Protéine de lactosérum	15-22	
a-lactoglobuline	7-12	162
a-lactalbumine	2-5	123
Sérum albumine	0,7-1,3	582
Immunoglobuline(G1, G2..)	1, 9- 3,3	
protéase-peptone	2-4	

## **2. Propriétés générales des constituants du lait de vache, responsables d'allergie ou d'intolérance.**

Comme vu ci-dessus, lors d'une allergie alimentaire, ce sont les protéines présentes dans l'aliment qui sont mises en cause.

Les protéines du lait de vache peuvent être classées en deux groupes selon leur solubilité dans l'eau et leur stabilité :

### **2.1 Les caséines :**

Les protéines du lactosérum, les principales étant les bêta- lactoglobulines suivies par les alpha-lactoglobulines.

Le lactose est, quant à lui, le constituant du lait responsable de l'intolérance alimentaire. Il se retrouve dans le lait de vache en quantité moindre, mais toutefois significative, par rapport au lait humain.

### 3. Les protéines du lait de vache : propriétés générales

#### 3.1 Les caséines

Les caséines représentent 82% des protéines du lait de vache et ne se retrouvent qu'à 60% dans le lait maternel humain.

Il existe 4 types de caséines qui peuvent se regrouper sous forme de micelles :

- Les caséines  $\alpha_1$  (protéines les plus abondantes dans le lait car représentent 1. environ 40% des protéines) ;
- Les caséines  $\alpha_2$
- Les caséines  $\beta$
- Les caséines  $\gamma$

Les protéines du lactosérum ou petit lait (Brodeur, C., 2000), protéines sériques (Mathieu J., 1998) ou « whey » selon son appellation anglaise (Wal J., 2001))

Les principales protéines du sérum sont la bêta -lactoglobuline et l'alpha-lactalbumine. Les autres protéines du sérum sont les immunoglobulines, le sérum albumine bovine et la lactoferrine.

#### 3.2 La bêta-lactoglobuline (BLG) et l'alpha-lactalbumine (ALA)

La  $\beta$ -lactoglobuline (BLG) est la protéine principale du lactosérum, elle y est présente à 55% (Wal J., 2001 ; Lebeuf. et al., 2002 ; Bouglé, D and Bouain, A., 2004). Une partie de cette protéine est hydrophobe. Sa structure tertiaire a la capacité de fixer la vitamine A et certains acides gras (Lebeuf. et al., 2002). 22% des protéines du sérum sont constitués de l' $\alpha$ -lactalbumine (ALA), une petite protéine composée d'acides aminés et d'un cation  $Ca^{++}$ , d'où son appellation de métalloprotéine.

Cette protéine a une partie hydrophobe qui semble être le site de fixation de la galacto-tranfêrase (Debry G. et al., 2001).

#### 3.3 L'albumine sérique

Généralement appelée «Sérum Albumine Bovine (SAB)», elle représente 7% des protéines du sérum. Contrairement à la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine directement synthétisées dans les glandes mammaires, cette protéine fait partie de celles provenant du sang (Wal , J.M., 1998b). La sérum albumine bovine, tout comme la  $\beta$ -lactoglobuline, a la capacité de fixer des acides gras qui la protégeraient des dénaturations thermiques mais a aussi la capacité de transporter des hormones, des métabolites physiologiques ou encore des médicaments (**Cayot, P. and Lorient, D., 1998c**).

**3.4 Les immunoglobulines :** Ces protéines, se présentant sous forme d'un « Y » et jouant un rôle d'anticorps, constituent environ 13% des protéines du lactosérum (**Debry G. et al., 2001; Lebeuf Y. et al., 2002; Wal J., 2001** ).

Elles sont transférées du sang au lait au niveau des cellules des glandes mammaires (**Cayot, P. and Lorient, D., 1998c**).

**3.5 La lactoferrine :** Cette protéine porteuse de fer représente 4% des protéines du sérum (**Lebeuf Y. et al., 2002**).

**3.6 Le lactose :** Le lactose est un sucre n'ayant pas beaucoup d'importance nutritionnelle pour l'adulte mais bien pour le nouveau-né lors de sa première année de vie car il représente sa principale source de glucides (**Vesa, T.H. et al., 2000**).

On le retrouve en quantité plus importante dans le lait d'origine maternelle (= 6.9g/100g) que celui d'origine bovine (= 4.7g/100g) (**Bahna, S.L., 2002; Lebeuf Y. et al., 2002**).

Le lactose se trouve sous forme de liquide blanchâtre en solution vraie dans le lait.

C'est un disaccharide réducteur constitué de 2 sucres en liaison  $\alpha$  ou  $\beta$  (**Debry G. et al., 2001; Montalto, M. et al., 2006; Lebeuf Y. et al., 2002; Benkebil, F. and Roulet, M., 2007**).

Celui-ci est hydrolysé lors de la digestion en deux sucres simples, le glucose et le galactose, par une enzyme présente dans le tractus digestif (au niveau du jéjunum), la «  $\beta$ -galactosidase, lactase phloritizin hydrolase », appelée plus communément « lactase» (**Vesa, T.H. et al., 2000; Bahna, S.L., 2002**).

L'absence ou la faible présence de cette enzyme est responsable de l'intolérance au lactose.

Le lactose est donc le glucide pouvant provoquer l'intolérance selon les quantités ingérées et la tolérance personnelle.

L'allergie est, quant à elle, provoquée par différentes protéines.

Leur allergénicité est cependant controversée et celle-ci augmente ou diminue selon le processus appliqué aux produits. La teneur de lait en protéines est une caractéristique essentielle de sa valeur marchande car plus le taux protéique est élevé, meilleur sera le rendement de la transformation technologique

La matière protéique et les caséines en particulier prennent, ainsi, de plus en plus d'importance

Nous verrons donc quelles sont les propriétés physicochimiques de ces protéines, à quels types de transformation sont-elles liées et comment la maîtrise des facteurs de variation peut permettre aux producteurs une meilleure valorisation du lait.

#### **4. Description et composition psycho-chimique de la micelle**

##### **4.1. Aspects et propriétés**

La caséine est un complexe protéique phosphoré à caractère acide qui précipite dans le lait à pH 4.6 Il s'agit d'une substance hétérogène en raison de la constance de sa composition élémentaire.

##### **4.1.1. La micelle**

La micelle de caséine est un édifice instable en fonction des conditions du milieu .Elle plus particulièrement instable sous l'action du pH, de la température et de la protéolyse.

Les caséines se présentent dans le lait sous forme d'un complexe organique et minéral la micelle

Particule sphérique d'environ 180nm constituée de 8 à 20nm (64), elle est très hydratée (2 à 4 g d'eau par g de protéines) et 7% environ de son extrait sec tableau (3 ,1) est composé de sels ( phosphate, calcium, magnésium, citrate dans l'espace inter sub- micellaire)

Les submicelles pourraient être constituées d'environ 10 molécules des 4 caséines en proportion variable avec une répartition de caséine  $\gamma$  (hydrophile) en surface :

Les submicelles les plus riches en caséine  $\gamma$  sont situées en surface de la micelle, ce qui la stabilise, les parties C-terminales de la caséine  $\gamma$  hérissent la micelle et l'enveloppent d'une chevelure périphérique particulièrement hydrophile.

Cependant l'organisation exacte intra micellaire (très petites submicelles ou structure interne de caséines individuelles) n'est pas aujourd'hui précisément connue (Mc Mahon et Mc Manus, 1998).

La coagulation du lait après addition de présure résulte, entre autres phénomènes, d'une action primaire sur la caséine  $\gamma$  (protéolyse entre les acide aminées 105(phénylalanine) et 106 (Méthionine) situés à l'extérieur de la micelle) laissant des plages hydrophobes de para-caséine  $\gamma$   $\text{Ca}^{++}$  dissous, il y a agglomération des micelles dépourvues de casinos glycopeptide ( cas  $\gamma$  106-10NEUF qui se solubilise ) en un réseau : le caillé (17 ,40).

#### **4.2. Action du pH**

La micelle de caséine est stable au pH normal du lait (pH 6 ,8) et température ambiante. Quand il y a acidification du milieu il se produit une gélification des protéines. Lorsque le pH est compris entre pH 6,8 et 5,8 il n'y a aucune modification de la micelle .Quand le pH passe de 5,8 à 5,5 les micelles ont tendance à se

rapprocher car il y a diminution du potentiel (diminution de la charge globale des particules, recul d'ionisation des fonctions acides organiques).

Et forment des groupes de micelles pouvant passer de 180 nm de diamètre. Il n'y a cependant pas de modification de la forme de la micelle.

Entre pH 5,5 et 5,0 il y a une modification importante de la forme, des dimensions et des agrégats apparaissent. Il y a fusion partielle avec perte de matériel, principalement de la caséine B mais qui une fois en solution sera légèrement ionisée et reviendra se fixer à la surface de la micelle.

A pH 5,2 les premiers signes de gélification apparaissent, à pH 5,0 il y a solubilisation totale du calcium et à pH 4,9 la gélification est totale. Le gel ne se forme que si l'acidification est très lente. Le réseau est constitué par des chaînes et des agrégats de caséines. La synthèse de ce gel est très faible voire nulle. Si l'acidification est brute, il y a agrégation forte et synérèse importante.

A pH 4,6 il se produit l'agrégation irréversible des micelles.

### **4.3. Action de la température**

A basse température la micelle n'est pas déstructurée mais on assiste à une fuite de caséine B depuis la micelle vers le milieu ambiant. Cette fuite est due au fait que l'abaissement de la température entraîne une diminution des interactions hydrophobes entre les différentes caséines. La fuite est aussi tributaire du pH car à pH 5,2 il y a 3 fois plus de fuite qu'à pH 6,8 pour une température de 4 °C. S'il on veut éviter les freintes protéiques il sera nécessaire de travailler avec des températures très largement positives. A basse température la perte de caséine B et de calcium se traduit par une augmentation de la voluminosité à 4°C. Si l'on veut éviter les freintes protéiques il sera nécessaire de travailler avec des températures très largement positives. A basse température la perte de caséine B et de calcium se traduit par une augmentation de la voluminosité de la micelle par relâchement des structures.

A haute température, il y a cassure des interactions phosphocalciques sans déphosphorylation des résidus de sérine. Il s'en suit plutôt une désorganisation du granule de phosphate. Un chauffage à 120°C pendant 20 minutes entraîne une déphosphorylation à 80 % des caséines A et B.

Au cours d'un chauffage à 90° C, B lactoglobuline vient s'associer avec le kappa caséine des micelles soit par des ponts disulfure si le pH est voisin de pH 6,8 soit par des interactions hydrophobes si le pH 6,5. Le complexe kappa caséine B lactoglobuline se sépare de la micelle si le pH est supérieur à pH 6,9 et entraîne une congélation du lait par déstructuration de la micelle de caséine. Au cours du chauffage, les protéines du lactosérum vont venir s'adsorber sur les micelles entraînant une diminution du taux des protéines solubles, une augmentation de la taille des micelles et une augmentation de viscosité. Ce comportement est important dans les échangeurs thermiques à plaques puisque cela se traduit par un phénomène d'encrassement de ces derniers (dépôt de micelles à la surface, augmentation de la viscosité, diminution des débits).

En présence de caséines, les concentrés de protéines soluble sont susceptibles de donner des gels blancs, doux avec un aspect analogue à celui du caillé du lait avec une forte synérèse. Les isolats de protéines donnent des gels translucides, fermes (analogues à ceux obtenus avec gélatine) et présentent une forte rétention d'eau.

#### **4.5. Action des enzymes**

De nombreux systèmes enzymatiques sont susceptibles d'entraîner la modification de la structure des caséines.

Cette chymosine est en présence de pepsine mais dans des rapports qui vont varier selon l'âge et l'alimentation.

Chez le veau allaité, le rapport chymosine /pepsine est voisin de 1,4 alors que chez le bovin adulte ce rapport est inférieur à 0,15. Dans ce dernier cas on caractérise surtout de la pepsine A et C (EC 3 .4.23.1).pour le secteur fromager, on préfère l'utilisation de la chymosine par rapport à la pepsine car elle entraîne moins de peptides amers .cette chymosine devient une denrée rare car il y a diminution des élevages de veaux traditionnels et une augmentation de la production des fromages. On a tenté dans un premier temps de

Remplacer la chymosine par des enzymes provenant de micro –organisme.

La réactivité des enzymes a été comparé en prenant comme référence la chaîne B de l'insuline constituée de 30 résidés amides.

La qualité des produits obtenus avec les enzymes microbiennes a été améliorée, au début les fromages obtenus présentaient des amertumes importantes dues essentiellement à la présence d'estérase qui accompagnaient les protéases.

La sélection des souches a permis d'améliorer la qualité mais les produits obtenus à la chymosine restent les plus appréciés. La deuxième possibilité de produire la chymosine est de recourir aux techniques de la biologie moléculaire et produire une chymosine recombinante.

L'avantage d'un tel système c'est que la chymosine produite est absolument dépourvue de pepsine et les propriétés enzymatiques sont exactement les mêmes. On obtient un produit de haute qualité avec un prix stable ce qui est appréciable en industries alimentaires.

En fromagerie seuls les fromages obtenus après coagulation par la chymosine peuvent prétendre à l'AOC. Les mélanges de chymosine et de pepsine diminuant les temps d'affinage des fromages.

## **Chapitre3:Les Méthodes de séparation**

### **1.L'électrophorèse**

C'est un procédé biochimique qui permet le fractionnement des molécules biologiques par le passage du courant électrique sur support poreux en fonction de leur charge nette ou de leur poids moléculaire (Hamza Belaouar 2008).

La vitesse de migration dépend non seulement de la charge des protéines, de leur taille et de leur forme mais aussi des conditions expérimentales de tels que le PH la composition des solutions et le support électrophorétique (Hamza Belaouar 2008).

La révélation se fait après coloration des protéines avec du bleu de Coomassie en présence d'un fixateur acide de TCA (acide trichloracétique)

Le dispositif d'électrophorèses est constitué d'un gel dans lequel sont déposés des échantillons et dont deux extrémités opposées sont en contact avec une solution tampon dans laquelle baignent les électrodes

On distingue différents types d'électrophorèses en milieu acide (ACIDE-PAGE) l'électrophorèse en présence du sodium -dodecyl- Sulfate SDS -PAGE) l'isolé-électrolocalisation (Hamza Belaouar .Université Montouri Constantine -Licence 2008).

#### **1.2.La technique SDS-PAGE**

Cette technique a été mise au point par LAEMMLI (1970) où la séparation des molécules se fait en milieu basique à  $\text{pH} = 8,8$  en présence d'un détergent, le sodium - dodecyl - Sulfate qui masque la charge des protéines par sa propre charge négative et permet donc faire migrer les protéines selon leurs poids moléculaires et leurs conformations uniquement

#### **1.3La technique PAGE**

Dans cette technique, la séparation des molécules se fait en milieu basique à  $\text{pH} = 8,8$  en absence d'un détergent, le sodium-Dedecyl -Sulfate .

Donc la migration des protéines se fait selon leurs poids moléculaires, leurs conformation et leur charge électriques.

## 1.4.La technique Acide – PAGE

La séparation des molécules se fait en milieu acide a  $\text{PH}= 3,2$  en présence de l'acide ascorbique, ce dernier accélère la réaction entre l'acrylamide et bis' acrylamide , donc une polymérisation rapide.

## 2.Chromatographie

### 2.1.Définition de la chromatographie :

est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange. Le principe est basé sur les différences d'affinité des composés du mélange avec la phase stationnaire et la phase mobile. Le chromatogramme traduit la variation du soluté dans l'éluant en fonction du temps.

### 2.2.Il existe différents types de chromatographie suivant la méthode de séparation utilisée :

- ✓ d'adsorption
- ✓ de partage
- ✓ d'échange d'ions
- ✓ d'exclusion

Abréviations des 3 grandes familles de chromatographie :

- ✓ CPG : chromatographie en phase gazeuse
- ✓ HPLC : chromatographie liquide haute performance
- ✓ CCM : chromatographie sur couche mince

Cette méthode d'analyse permet l'identification et le dosage de composés dans un mélange. Elle peut-être couplée à un spectromètre de masse pour l'identification de composés inconnus. Pour l'exploiter pleinement il est important de connaître les différentes grandeurs de rétention et d'utiliser des colonnes avec une bonne efficacité.

La chromatographie permet également d'effectuer des dosages avec une grande précision. les principales méthodes de dosage sont la normalisation interne, la méthode des ajouts dosés et l'étalonnage interne. L'étalonnage externe peut également être effectué sous certaines conditions.

### **3 .Optimisation d'une méthode chromatographique**

Les principaux paramètres permettant d'optimiser une méthode en chromatographie liquide ou gazeuse

Extraction SPE : L'extraction des composés à doser est une étape particulièrement importante en analyse chimique.

#### **3.1Facteur de résolution en chromatographie**

Le facteur de résolution est un paramètre important de la chromatographie car il définit la plus ou moins bonne séparation de 2 solutés.

##### **3 .1.2Polarité des colonnes de CPG**

##### **3.1.3L'injecteur de CPG**

On rencontre en général 2 types d'injecteurs : avec diviseur (Split) ou sans diviseur de flux (splitless).

Le détecteur de CPG

Les principaux détecteurs sont le cathétomètre.

### **4.Chromatographie sur couche mince**

La chromatographie sur couche mince s'effectue généralement sur une fine couche desilice (phase stationnaire) déposée sur un support

#### **4 .1.Dosage par la méthode de normalisation interne**

La méthode est proche de l'étalon interne. Ici au lieu de rajouter un étalon on choisit comme étalon interne un des composés du mélange que l'on dose

#### **4 .2Les grandeurs de rétention**

Temps de rétention : C'est le temps que met le soluté à sortir de la colonne

#### **4.3Dosage par étalonnage interne**

Le principe consiste à comparer les surfaces des pics du mélange avec un étalon pris comme référence

#### **4.4 Dosage par étalonnage externe**

On injecte successivement un même volume d'une solution étalon (concentration en élément à doser connue  $C_{ref}$ ) et la solution à doser (concentration inconnue  $C_i$ ).

#### **4.5 Efficacité des colonnes de chromatographie**

L'efficacité d'une colonne de chromatographie peut s'exprimer par le nombre  $N$  de plateaux théoriques qu'elle possède

#### **4.6 Dosage par chromatographie**

La surface du pic est proportionnelle à la quantité de produit élué. Cela se traduit par la relation :  $m_i = K_i A_i$

#### **4.7 Dosage par la méthode des ajouts dosés**

Soit un mélange de 3 composés ayant des masses respectives  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ . Le dosage consiste à ajouter une masse  $m_0$  du composé à doser au mélange.

### **5. Chromatographie de partage**

Elle est basée sur la différence de solubilité du soluté dans la phase mobile et la phase stationnaire

### **6. La chromatographie d'exclusion**

Les molécules sont plus ou moins retenues suivant leur taille

### **7. La chromatographie d'échange d'ion**

Elle consiste à un échange réversible d'ions entre la phase mobile et la phase stationnaire.

### **8. Chromatographie d'adsorption**

La chromatographie d'adsorption est caractérisée par une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide. C'est une méthode d'HPLC. (Mohamed Nabil ATIG .Ecole supérieur des sciences et techniques de la santé de Monastir Tunisie ,2010.

Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Sciences et Techniques de Production Animales université Abdelhamin Ibn Badis Mostaganem.

## **1. La région d'étude : relizane ,mascara , sidi belabes**

Dans l'Ouest Algérien le climat est aride et semi-aride avec une saison sèche qui dure de 05 à 06 mois, l'été est chaud et sec (Benssaoud ; 2002). Les pluies sont concentrées sur la saison fraîche de l'hiver à jours courts (Benabadji ; 2000) avec des basses températures. La pluviométrie varie selon les cites de 200 à 450mm. Le printemps et l'automne sont courts avec des températures modérées. L'élevage bovin laitier occupe une place importante dans l'activité agricole. Les systèmes d'alimentations utilisés durant les saisons était comme suit ; utilisation du foin, concentré, d'ensilage d'herbe et de la paille durant l'hiver, utilisation du foin et du concentré durant le printemps avec une période importante de pâturage, utilisation du sorgho en vert, concentré et du chaume en été, et enfin utilisation du foin, du concentré et de l'ensilage de maïs et de sorgho en automne.

## **2. Matériels**

### **2.1 Matière première**

Les échantillons du lait analysés sont des laits de mélange, frais issus de troupeaux de vaches laitières saines de race Holstein localisés dans la région Ouest de l'Algérie durant deux saisons l'hiver et printemps.

Vingt et sept échantillons ont été prélevés et analysés à raison de 27 échantillons par saisons. Les échantillons ont été prélevés le matin et acheminés dans une glacière à laboratoire d'analyse.

### **2.2 Appareillage**

Unité d'électrophorèse sur cuves verticales comprenant : cuves d'électrophorèse, générateur de courant constant, plaque en verre et en hydroxyde d'alumine (10/8 cm), espaces d'épaisseurs variées.

- Balance de précision à 0.0001 g.
- Agitateur basculant (Heidolph, duomax 1030, Allemagne)
- pH mètre (Hanna instruments, France)
- centrifugeuse réfrigérée (SIGMA, USA).

- Agitateurs variés à plateau (Labinco BV, Pays Bas), à barreaux magnétiques chauffant et non chauffant.
- Bain marie (Memmert, Allemagne).

### **2.3 Petits matériels**

Un certain nombre de petit matériels et d'accessoires spécifiques sont utilisés dans le cadre de cette étude :

- micropipettes, micro-seringue, papier filtre Whatman, gants et masques pour la manipulation de produits dangereux tel l'acrylamide, différents types de verrerie (fiolle, Buchner...)

### **2.4 Produits chimiques et réactifs**

Colorants et réactifs : bleu de Coomassie, bleu de bromophénol, glycine,  $\beta$  mercaptoéthanol, persulfate d'ammonium, tétraméthyléthylène diamine (TEMED), acrylamide, N,N-méthylène-bis-acrylamide, tris-hydroxy-méthyl-aminométhane (TRIS), urée. Solvants usuels : acide acétique, acide trichloracétique, éthanol, méthanol, glycérol....

### **Matériels biologique**

Caséines de référence pour la quantification des bandes de caséines des échantillons du lait analysés.

## **3. Méthodes d'analyse**

### **3.1 Collecte du lait**

Les échantillons du lait étaient déjà prélevés, chauffés à bain marie et stockés à  $-18^{\circ}\text{C}$ , afin d'éviter tout développement microbien ou une activité enzymatique indésirable qui pourrait nuit à la structure des caséines.

## **3.2 Isolement des protéines du lait**

### **3.2.1 Ecrémage**

L'écémage est la première étape du protocole d'isolement des protéines bovines. Cette étape consiste en l'élimination de la matière grasse du lait par centrifugation à 10000 g pendant 10 minutes à 4°C.

A la fin de la centrifugation nous notons une séparation de phase avec la formation d'une couche en surface correspondant à la crème du lait, une fois celle-ci écartée à l'aide d'une spatule, le lait résultant dit écémé est filtré.

Pour assurer un bon écémage, l'ensemble de l'opération d'écémage est répété deux fois afin d'éliminer toute trace résiduelle de matière grasse pour la suite du protocole d'isolement.

### **3.2.2 Séparation des caséines du lait**

L'isolement des caséines bovines est réalisé par précipitation différentielle au pH isoélectrique de cette fraction (pH 4.6). Cette opération est effectuée par l'ajout d'une solution d'acide acétique 1N, suivie d'une centrifugation à 10000 g pendant 10 min à 4°C.

Il en résulte une différence de phase, où le culot correspondant au caséine est récupéré dans un minimum d'eau distillée, puis ramené à pH 7 grâce à une solution d'hydroxyde de sodium 1N, afin d'obtenir la re-solubilisation de cette fraction.

Pour éviter toute contamination sérique, deux autres étapes d'isolement dans les mêmes conditions sont répétées.

## **4. Electrophorèse**

### **4.1 Principe général**

Les particules ayant une charge nette, soumises à l'action d'un champ électrique se déplacent dans la direction du champ vers le pôle de signe opposé à leur charge, à une vitesse proportionnelle à leur charge globale et inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

Les protéines majeures du lait en raison de leur caractère amphotère sont solubilisées dans un tampon de pH supérieur à leur pHi, (pH alcalin). Il en résulte leur acquisition d'une charge négative et leur migration sous l'effet du champ électrique appliqué vers le pôle positif.

## 4.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamides

Les gels de polyacrylamide peuvent varier en composition. Ils sont constitués d'acrylamide (unité de base) et de bisacrylamide (agent pontant), qui en présence de TEMED et le persulfate d'ammonium polymérisent. Les caractéristiques du gel sont en fonction de la concentration, du degré de réticulation et de pontage des constituants du gel et sont déterminés par les indices T et C calculés comme suit :

$$T(\%) = (a+b/v) * 100$$

$$C(\%) = (b/a+b) * 100$$

Avec :

a : acrylamide (g).

b : méthylène-bis-acrylamide (g).

v : volume de la solution (ml).

## 4.3 Conduite de l'électrophorèse

Le gel de polyacrylamide, est coulé entre deux plaques de verre. Les échantillons de caséines sont déposés dans des puits à raison de 2 µl, ils sont préalablement dissous dans un tampon composé de bromophénol indicateur de la progression de la migration électrophorétique. Le voltage appliqué est constant, 60v pendant 30 min puis 100v pendant 02 heures.

## 4.4 Electrophorèse en présence d'urée et de 2- mercaptoéthanol (PAGE- urée) :

L'urée rompt les interactions intramoléculaires faibles (non covalent), telles que les liaisons hydrogènes et hydrophobes. Ainsi, la PAGE-urée est particulièrement adaptée à la séparation des caséines.

L'électrophorèse en présence d'urée et de 2-mercaptoéthanol, a été réalisé en appliquant le protocole décrit par LAEMMLI et FAVRE (1973). grâce auquel nous avons réalisé un gel de concentration (T = 4% et C = 2.7%) en tampon (urée 0.8M, TRIS 0.49M à pH 6.8), ainsi qu'un gel de séparation à (T = 15% et C 2.7%) dans un tampon (urée 4M, TRIS 1.5M, pH 8.8). les échantillons sont dissous dans un tampon de même composition que celui du gel de

concentration (8% v/v de l'urée à 3.3M, du 2-mercaptoéthanol à 0.3%% et du glycérol à 10M). le tampon d'électrode est composé de (TRIS 5mM, glycine 77mM, pH 8.3).

#### 4.5 Révélation des bandes de migration électrophorétiques

A la fin de la migration, le gel est démoulé pour subir les opérations successives suivantes :

- **La fixation** : la fixation est réalisée par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA 12%) pendant 30 min.
- **La coloration** : le gel est immergé dans une solution contenant de bleu de Coomassie 0.1% dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée, méthanol et TCA 5%.
- **La décoloration** : elle est réalisé par immersion du gel dans une solution composée du mélange (eau/méthanol/acide acétique) dans les proportions suivantes 3.12 – 1.5 – 0.37 (v/v/v).

## **Résultats et discussion**

## Résultats et discussion

### 1. Evaluation de la qualité biochimique

Le tableau N°7. Dans cette étude nous avons étudié seulement l'effet de la saison.

**Tableau N°7** :composition chimique moyenne des analysés durant les saisons d'hiver et de printemps.

Saisons	paramètres	MG (g/l)	MP (g/l)	Caséines (%)
<b>Hiver</b>	<b>Décembre</b>	33.52	32.45	79.71
	<b>Janvier</b>	32.52	31.88	79.67
	<b>Février</b>	31.73	31.4	79.87
	<b>Moyenne</b>	32.59±1.37	31.91±1.03	79.75±0.76
<b>Printemps</b>	<b>Mars</b>	33.39	32.34	80.46
	<b>Avril</b>	33.97	32.61	80.65
	<b>Mai</b>	33.80	33.12	80.46
	<b>Moyenne</b>	33.72±0.78	32.54±0.79	80.52±0.58

#### 1.1 Taux butyreux

Le taux butyreux est la quantité de matière grasse dans le lait cru, elle est variable selon certains facteurs ; la race, l'alimentation distribuée, le stade de lactation et la saison.

D'après les résultats obtenus nous remarquons que cette fraction est variable durant les deux saisons en faveur du printemps ; la moyenne était de 32.59 pour l'hiver contre 33.72 contre le printemps. La moyenne la plus élevée a été obtenue durant le mois d'avril 33.97 et la plus basse durant le mois de février 31.73. Ces résultats sont inférieurs à la norme surtout qu'il s'agit des vaches de race Holstein. Selon MARTIN et al, 2000, les vaches de race Holstein produisent un lait plus riche en matière grasse 37g/l. ces résultats sont inférieurs à ceux rapportés par Bousselmi et al 2010 en Algérie. Cela laisse penser que le système d'élevage en Algérie n'est pas le même. Cette variation peut être expliquée par le niveau d'alimentation situé dans les élevages dans cette région.

Dans cette étude le taux butyreux a passé de 32.59 g/l en hiver à 33.72g/l en printemps cela peut être expliqué par la mise à l'herbe en fin d'hiver et en début du printemps. Selon Coulon et al (1986) la mise à l'herbe conduit à une augmentation du taux de matière grasse dans le lait cru. Matallah et al (2015) ont rapportés les mêmes constats où les taux butyreux ont augmentés de +0.15g/l pour les vaches en 4<sup>ème</sup> lactation et +1.35g/l pour les vaches en 6<sup>ème</sup> lactation. Plusieurs auteurs accordent cette augmentation à la sécrétion des acides gras longs que l'herbe est bien riche (Matallah et al 2015). La présence et l'utilisation de l'herbe jeune durant l'hiver a conduit à une légère diminution du taux butyreux, ce résultat est similaire de ceux de Murphy (1985).

## 1.2 Taux protéique

Le taux de matière protéique était 31.91g/l pour la saison d'hiver et 32.54g/l pour la saison du printemps. La moyenne la plus élevée a été obtenue durant le mois de Mai 33.12g/l et la plus basse est obtenue durant le mois de février 31.4g/l. d'après ces résultats nous remarquons que le taux de protéine enregistré dans cette région et pour les deux saisons sont plus ou moins supérieur à des taux de protéines obtenus dans des études réalisées en Algérie.

Cette augmentation du taux de protéine est attribuée à la mise à l'herbe en fin d'hiver et en début du printemps ce comportement a été déjà observé par certains auteurs (Hoden 1985, Agabriel et al 1993).

## 1.3 Taux de caséine

Le rapport entre les caséines du lait et les protéines totales est plus ou moins variable entre les deux saisons. D'après les résultats obtenus nous remarquons que cette fraction est de l'ordre de 79.75% pour la saison d'hiver contre 80.52% pour la saison du printemps. Le rapport le plus élevé est obtenu durant le mois d'avril 80.65% et le plus faible durant le mois de janvier 79.67%. D'après ces résultats nous remarquons que le taux de protéine a passé de 31.91g/l en hiver jusqu'à 32.54g/l en été et le rapport caséines/protéines a passé de 79.75% en hiver jusqu'à 80.52% en été ; cette augmentation du taux de protéine concerne la fraction de caséine et pas les protéines solubles. La mise à l'herbe au printemps provoque le plus souvent un accroissement de la teneur en matières azotées du lait, cet accroissement porte surtout sur la caséine (Journet M et Remond B 1980). Cette augmentation est attribuée à l'élévation du

niveau des apports énergétiques qui a généralement lieu entre la fin de la période hivernale et le début de la période de pâturage et au changement de composition de la ration.

## 2. Analyse électrophorétique des caséines totales

La PAGE-urée est une technique particulièrement adaptée à la séparation des groupes protéiques à forte association comme les caséines.

Les agents dissociant, urée et 2-mercaptoéthanol (rompent respectivement les liaisons hydrogènes et disulfures), permettent aux protéines de migrer sous leur forme la plus simple.

Mais pour adapter cette technique aux caséines du lait bovin, nous ramenés à effectuer plusieurs mises au point relatives notamment à la porosité du gel et aux concentrations en urée et en APS.

Le comportement des caséines bovines en PAGE-urée, ainsi que sur l'ordre d'apparition de celles-ci a été décrit par plusieurs auteurs (PESIC, 2011). Il est admis que lait bovin migrent en 4 bandes comme suit (suivant une mobilité croissante) : K caséines,  $\beta$  caséine  $\alpha_2$  caséine  $\alpha_1$  caséine.

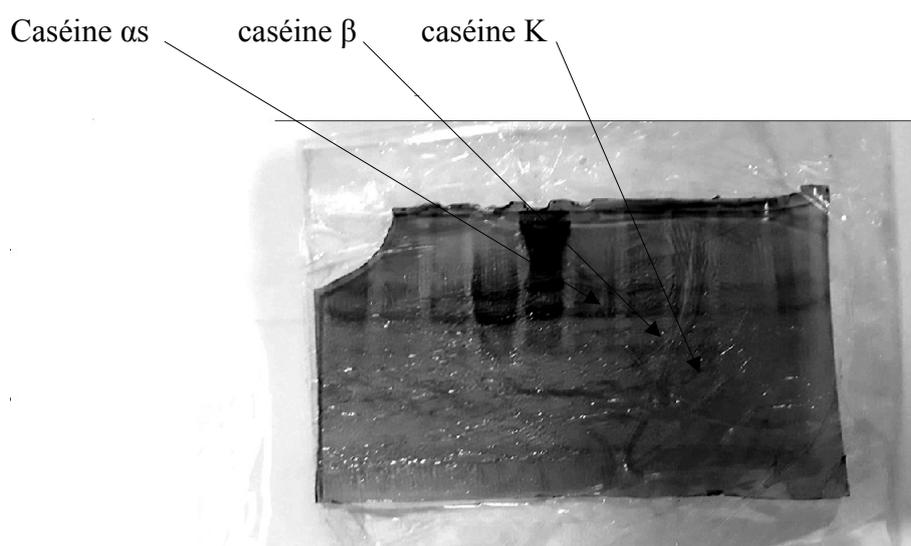
Ce comportement des caséines bovines (Egito et al, 2006) est différent de celui illustré pour les caséines caprines en PAGE-urée et à celui de l'espèce ovine (Calavia et Burgos, 1998 Moatsou et al, 2004). Le schéma général de migration des caséines pour ces espèces présente en premier lieu la caséine  $\beta$  avec la plus faible mobilité, suivi du groupe des caséines  $\alpha$  ( $\alpha_2$  puis  $\alpha_1$ ), ces deux groupes sont séparés par une bande diffuse peu focalisée, la caséine K.

Comme décrit par Pardo et Natalucci (2002) et Le Bars et Gripon (1993) le diagramme électrophorétique (figure ), montre pour le lait bovin un agencement identique à celui décrit par ces auteurs ( $\beta$  caséine,  $\alpha_2$  caséine,  $\alpha_1$  caséine). Les caséines  $\beta$  et  $\alpha_1$  apparaissent bien focalisées, alors que la caséine  $\alpha_2$  migre en une bande diffuse et ceux pour les deux saisons

Selon Trujillo et al (1997) et Egito et al (2006) la première bande de migration des profils électrophorétiques (bovin et caprin) présente un même niveau de migration, celle-ci représente les caséines  $\gamma$  et K respectivement dans le lait bovin et caprin. Dans notre étude nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de caséine  $\gamma$ , cela est peut être du à sa plus faible quantité dans notre lait.

Le deuxième niveau de migration du lait bovin est la caséine  $\beta$  qui est bien focalisé dans tous les échantillons du lait analysés et durant les deux saisons. Ce comportement est identique à celui trouvé dans le lait caprin. Celle-ci pouvant être de même nature.

Les caséines  $\alpha$ s, quant à elles, présentent un agencement identique et migrent ensemble et en même temps, dans certains échantillons on n'a pas pu faire la différence entre ces deux bandes du fait de leur diffusion l'une sur l'autre. Ce comportement est déjà décrit par certains auteurs (Moualek I. 2009).



**Figure:** Electrophorégramme des caséines de lait de vache en PAGE-urée.

### 2.1 Quantification des fractions de caséines

Pour la quantification des bandes de caséines nous avons utilisé le logiciel IMAGEJ. Le tableau N° résume les pourcentages relatifs des différentes bandes révélées dans notre étude.

Caséines (%)	Hiver			Printemps		
	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy
$\beta$ caséine	30.44	42.12	42.31	38.45	42.55	40.44
$\alpha$ s2 caséine	06.90	20.60	11.95	08.18	10.86	09.28

$\alpha$ 1 caséine	37.71	41.20	38.80	38.16	42.04	41.10
Kappa caséine	08.58	08.65	10.20	06.22	11.42	08.30
$\alpha$ s caséine/ $\beta$ caséine	1.46	1.46	1.19	1.20	1.24	1.24

Le pourcentage de l' $\alpha$ 1 caséine des échantillons du lait de la saison d'hiver est entre 37.71% et 41.20% avec une moyenne de 38.80% contre ceux du printemps qui sont entre 38.16% et 42.04% avec une moyenne de 41.10%, ces résultats sont plus ou moins supérieurs à ceux mentionnés par Golfo et al (2004).

Le taux des caséines  $\alpha$ 2 dans notre étude était aussi variable entre 6.90% et 20.60% en hiver et entre 08.18% et 10.86% en printemps Perisi et al ont mentionnés des valeurs entre 11.9% et 13.90%, cette différence est peut être du à des facteurs génétiques entre les troupeaux étudiés.

Les valeurs de  $\beta$  caséine varient entre 30.44% et 42.12% en hiver et entre 38.45% et 42.55% en printemps la moyenne pour cette fraction a été en faveur des laits produits durant la saison de l'hiver (42.31% vs 40.44%).

Perisi et al rapportent un pourcentage de  $\beta$  caséine de 40% à 43%. Dans un lait de brebis la valeur de  $\beta$  caséine peut atteindre 50% dans certains cas (Papoff et al 1993).

La quantité de Kappa caséine est variable entre les deux saisons ; la valeur la plus élevée était durant la saison de l'hiver 10.20% contre 8.30% en printemps. Cette différence de valeur est expliquée par l'action des enzymes protéolytiques qui ont agi probablement sur le contenu des caséines.

Le rapport  $\alpha$ s caséine/  $\beta$  caséine il est apparu est plus élevé en printemps qu'en hiver (1.24 vs 1.19), d'après les résultats obtenu et les travaux de Golfo et al (2004) le lait produit durant la saison du printemps est plus adapté pour la transformation fromagère que celui de l'hiver. D'après nos résultats il semble que le passage à l'herbe entre les deux saisons a modifié les proportions de caséines ainsi que les profils de ces dernières.

## Conclusion

Cette étude entreprise dans le but de contribuer à une connaissance du lait bovin dans la région Ouest de l'Algérie s'articule sur deux volets, l'un sur la proportion de caséines des lait produits durant les deux saisons hiver et printemps et l'autre, sur le phénotypages de la fraction caséinique visant ainsi une meilleure exploitation de celui-ci en industrie fromagère.

Pour ce qui est de la proportion de caséine la quantité de cette dernière est plus élevée dans le lait produit durant la saison du printemps 80.52% contre 79.75% pour la période de l'automne. Cette variation est liée à l'alimentation disponible durant les deux saisons.

Concernant le comportement électrophorétique, le PAGE –urée a mis en relief la particularité de la migration des caséines bovines où l'absence totale de  $\gamma$  caséine a été remarquée, et ce pour tous les échantillons du lait analysés et durant les deux saisons, ainsi l'ordre de mobilité des fractions de caséines était le même dans tous les échantillons et qui concorde avec les autres travaux.

Ces résultats préliminaires obtenus appellent à la mise en œuvre d'investigations plus spécifiques pour l'identification et le phénotypage ainsi que l'élaboration d'une cartographie exhaustive entre la nature du lait produit et ses aptitudes technologiques.

## Référence bibliographique :

1. AMIOT J., FOURNER S., LEBEUF Y., PAQUIN P., SIMPSON R et TURGEON H.,(2001) Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait *In VIGNOLA C.L*, Science et technologie du lait – Transformation du lait, Ecole polytechnique de Montréal, ISBN:3 -25-29 (600 pages)
2. **Anonyme 2015**. Centre d'information et de Recherche sur les Intolérances et l'Hygiène Alimentaire 2000.
3. Mohamed Nabil .école supérieure des sciences et technique et de la santé de Monastir Tunisie 2010. Diplôme de technicien supérieur en biologie médicale 2010
4. Hamza belaouar 2008 .fractionnement des proteines seriques par electrophorèse sur gel polycrylamide.Université Montouri Constantine .licence 2008
5. **Bousselmi K, Djemali M, Bedhiaf S et Hamrouni A 2010** : Facteurs de variation des taux de matière grasse et protéique du lait de vache de race Holstein en Tunisie. The factors affecting milk fat and protein of dairy cattle in Tunisia. *Rencontres Recherches Ruminants* 17:399.
6. **Coulon J B and Remond B 1991**: Variations in milk output and milk protein content in response to the level of energy supply in the dairy cow. *Livestock Production Science*. 29:31-47.
7. **Agabriel C, Coulon J B, Marty G, Bonaiti B 1993** : Facteurs de variations de la composition du lait dans des exploitations à haut niveau de production. *INRA Production Animales.*, 6 (1), 53-60.
8. **Benaïcha L., Sahi T., 2009**. Effet de la race sur la composition, la qualité du lait et son aptitude à la coagulation par un succédané de la présure. *Mém. Ing., ENSA –Ex.INA, El-Harrach*, 122 p.
9. **Grappin R, Jeunet R 1979** : Méthodes de routine pour le dosage de la matière grasse et des protéines du lait de chèvre. *Le Lait*, INRA Editions, 1979, 59 (587), pp.345-360.

10. **Rémond B, Bonnefoy J C 1997:** Performance of a herd of Holstein cows managed without the dry period. *Annales de Zootechnie*. 46, 3-12. <https://doi.org/10.1051/animres:19970101>
11. Vario cavalli S., Sofia V.silva, Cecilia Cimino , F.Xavier Malcata, Nora priolo : Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silibum marianum* flowers. *Food Chemistry*
12. Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2000). Comparative catalytic activity of two plant proteinases upon caprine caseins in solution. *Food Chemistry*, 71, 207–214.
13. Pesic M.B., Barac M.B., Vrvic M.M., Ristic M.M., Macej O.D., Stanojejevic S.P. and Kostic A.Z. (2011). The distribution of major whey proteins in acid wheys obtained from caprine/bovine and ovine/bovine milk mixtures. *International Dairy Journal*, 21, 831-838.
14. Clement P., Agboola S. O. and Bencini R. (2006). A study of polymorphism in milk proteins from local imported dairy sheep in Australia by capillary electrophoresis. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 63-69.
15. Mayer, B., A. Zolnai, L. V. Frenyo, V. Jancsik, Z. Szentirmay, L. Hammarström, and I. Kacs Kovics. 2002. Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs. *Immunology* 107:288–296.
16. Glofo M., Maria S., Alexandra K., Emmanuel A. Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. *Le lait*, INRA Editions, 2004, 84 (3), pp. 285-296. 10.1051/lait: 2004006. Hal-00895540.
17. Calavia M.C., Burgos J., Ovine  $\kappa$ -casein in milk from Lacha Spanish sheep: heterogeneity and total content, *Int. Dairy J.* 8 (1998) 779–786.

18. Addeo F., Mauriello R., Moio L., Laezza P., Chianese L., Di Luccia A., Ovine casein variant identification using electrophoretic, immunochemical and chromatographic techniques, *Milchwissenschaft* 47 (1992) 283–287.
19. Chianese L., Mauriello R., Ferranti P., Tripaldi C., Taibi L., Dell’Aquila S., Relationship between  $\alpha$ s1-casein variants and clotting capability of ovine milk, in: “Milk and milk protein polymorphism”, Special Issue 9702, Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium (1997) pp. 316–323.
20. Law A.J.R., Papoff C.M., Dalgleish D.G., Campus R.L., Quantitative fractionation of ovine casein by cation exchange FPLC, *Milchwissenschaft* 47 (1992) 279–282.
21. Papoff C.M., Law A.J.R., Dalgleish D.G., Campus R.L., Determination of the composition of ovine casein by anion-exchange FPLC, *Sci. Tec. Latt. Casearia* 44 (1993) 273–291.
22. Amigo L., Recio I., Ramos M., Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk – a review, *Int. Dairy J.* 10 (2000) 135–149.