

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères Mentouri Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'ordre.....

N° de série.....

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie
Option Nutrition Moléculaire et Santé

**Etude des paramètres physicochimiques et
biochimiques et analyse des profils protéiques
de laits additionnés de grains de kéfir**

Soutenu le 02/07/2017

Présenté par :

- HAMZA NOUR EL HOUDA
- ALLOUI ROMEISSA

Devant le jury :

- Président : Prof. KHELIFI Douadi, UFMC
- Examineur : Dr. BECHKRI Sakina, UFMC
- Encadreur : Dr. BELLIL Inès, UFMC

Année universitaire 2016/2017

A decorative border with intricate floral and scrollwork patterns surrounds the text. The border is black on a white background, featuring various motifs like leaves, flowers, and swirling lines.

Remerciements

Nous exprimons notre gratitude avant tout à DIEU miséricordieux qui nous a donné le courage et la force pour mener à bout ce modeste travail.

Nos premiers remerciements iront à notre rapporteur Mr : le Professeur KHELIFI. D, professeur à l'université des frères Mentouri Constantine, vous nous avez ouvert les portes de votre laboratoire pour effectuer ce travail, vous nous faites également l'honneur de participer à ce jury et de le présider.

Nos remerciements vont également à notre encadreur Mme BELLIL I., Maitre de conférence à l'université des frères Mentouri Constantine ; pour sa compétence, disponibilité, patience et gentillesse, pour son soutien, ses conseils et son aide dans notre travail, nous vous adressons nos remerciements les plus chaleureux.

A Dr. BECHKRI S., maitre de conférences à l'UFM Constantine, nous vous remercions de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Aux responsables de l'laboratoire SAFILAIT SARL de Constantine., ils nous ont constamment soutenue, conseillée et aidée dans notre travail.

Enfin, nous sommes très reconnaissants à tous ceux qui ont apporté une aide de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

A decorative border with intricate floral and scrollwork patterns surrounds the text. The border is black on a white background, featuring various motifs like leaves, flowers, and swirling lines.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

Aux être les plus chers à mon cœur ceux qui m'ont encouragé d'amour et d'affection, qui m'ont protégé, qui m'ont donnés force, courage et confiance.

A ma chère mère HAKIMA la personne la plus proche de mon cœur, je veux te dire maman que tu es une mère exemplaire, par tes conseil, ta tendresse, ta confiance et ton amour.

A mon cher père KAMEL qui m'a toujours encouragé, ta confiance m'a permis de surmonter les difficultés et m'a donné l'espoir pour les projets d'avenir.

Que Dieu les récompense pour tous leurs bienfaits.

Ainsi à mes chères sœurs SOUHEYLA et LOUBNA et à mes chers frères YACINE et HOUSSEM.

A toutes ma famille spécialement ma tante SOUAD et mes amies.

A toute la promotion 2017.

HAMZA N.H.

A decorative border with intricate floral and scrollwork patterns surrounds the text. The top border features large, symmetrical floral motifs. The side borders consist of repeating scroll and leaf patterns. The bottom border is a wide, horizontal band with a central floral element and symmetrical scrollwork on either side.

DEDICACES

A toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire.

Tout particulièrement à ma famille, aux deux étoiles qui éclairent ma vie mes très chers parents, mes sœurs Meriem, Hiba, Djouheinaet, Amani, et mon fiancé Houdheifa : pour votre soutien quotidien sans faille, vos conseils, votre aide précieuse tout le long de mes études, votre compréhension, vos encouragements qui m'ont amené là où je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir tant donné.

Et à tous ceux qui me sont chers...

Alloui Romeissa

Sommaire

Liste des abréviations	
Résumés	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	1
I. Synthèse bibliographique	
1. Généralité sur le lait.....	3
1.1. Définition.....	3
1.2. Composition du lait.....	3
1.2.1. L'eau.....	4
1.2.2. Les glucides.....	4
1.2.3. Les lipides.....	4
1.2.4. Les protéines.....	5
1.3. Les phases du lait.....	7
1.4. Les propriétés physicochimiques.....	7
1.4.1. Le pH.....	7
1.4.2. La densité.....	7
1.4.3. L'acidité.....	8
2. Le kéfir.....	10
2.1. Généralité sur le kéfir.....	10
2.2. Grains du kéfir.....	10
2.2.1. Structure des grains de kéfir.....	10
2.2.2. Microflore des grains de kéfir.....	11
2.2.2.1. Composition microbienne qualitative des grains de kéfir.....	11
2.2.2.2. Composition microbienne quantitative des grains de kéfir.....	13
2.3. Préparation traditionnelle du kéfir.....	14
2.4. Composition du lait fermenté.....	14
2.4.1. Acides organiques	14
2.4.2. Lactose.....	15
2.4.3. Protéines, matière grasse et acide linoléique conjugué.....	15
2.4.4. Alcool et CO ₂	16
2.5. Kéfir et santé.....	16

2.5.1. Le kéfir est une source incroyable de plusieurs nutriments.....	16
2.5.2. Le kéfir est un probiotique plus puissant que le yaourt.....	17
2.5.3. Le kéfir possède des propriétés antibactériennes puissantes.....	17
2.5.4. Le kéfir peut améliorer la santé des os et diminuer le risque d'ostéoporose.....	18
2.5.5. Le kéfir peut prévenir contre le cancer.....	18
2.5.6. Le Kéfir est généralement bien toléré par les gens qui ont une intolérance au lactose.....	19
2.5.7. Le Kéfir peut considérablement diminuer les symptômes d'allergie et d'asthme.....	19

II. matériel et méthodes

1. Matériels biologique.....	20
2. Méthodes d'analyses.....	20
2.1. La fermentation des laits avec les grains de kéfir	20
2.2. Analyses physico-chimiques.....	20
2.2.1. Mesure du pH.....	20
2.2.2. Détermination de l'acidité Dornic.....	21
2.3. Analyses biochimiques.....	21
2.3.1. Détermination de la matière grasse (Méthode GERBER).....	21
2.3.2. L'humidité et la matière sèche.....	21
2.3.3. Dosage de lactose.....	22
2.4. Analyse des profils protéique par Electrophorèse monodimensionnelle.....	23
2.4.1. Principe.....	23
2.4.2. Extraction des protéines.....	23
2.4.3. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide.....	23
2.4.3.1. Préparation des gels.....	24
2.4.3.2. La migration.....	24
2.4.3.3. Coloration et décoloration des gels.....	25

III. Résultats et Discussion

1. Paramètres physico-chimiques.....	26
1.1. pH.....	26
1.2. Acidité titrable.....	27
2. Composition biochimique.....	28
2.1. Teneur en matière grasse.....	29
2.2. Taux de matière sèche totale.....	30

2.3. Teneur en lactose.....	31
3. Fractionnement des protéines.....	32
3.1. Analyse des profils électrophorétiques.....	32
3.1.1 Analyse des protéines laitières dénaturées et réduites.....	32
3.2. Etablissement des diagrammes type.....	41
3.3. Indice de similarité des diagrammes protéiques.....	41
3.3.1. Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites cas du lait total.....	42
3.3.2. Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites dans le cas de surnageant.....	43
3.3.3. Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites cas de culot.....	44
Conclusion et perspectives.....	46
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des abréviations

AJR : Apports Journaliers Recommandés

APS : Amonium persulfate

B : Bande

CH : Chamelle

CLA : Conjugated Linoleic Acids

°D : Degré Dornic

E : Echantillon

FPM : Faible Poids Moléculaire

HPM : Haut Poids Moléculaire

IBS : Irritable Bowel Syndrome

IAS : Indice absolue de Similarité

IRS : Indice Relatif de Similarité

L : Lait reconstitué

M : Mobilité

N : Normalité

MG : Matière Grasse

RE : Chèvre

S : Surnageant.

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TCA : Trichloroacetic Acid

TEMED : Tetra-methyl-ethylene-diamine

V: Vache

Résumé

Le kéfir est un lait fermenté, produit principalement à partir des laits de vache, de brebis ou de chèvre à l'aide de « grains de kéfir ». La région d'origine de cette boisson est le Sud du Caucase, sous des noms très variés. La dénomination la plus fréquente est « kéfir » qui est d'origine turque.

Les grains de kéfir sont décrits comme étant de "petites masses ridées, à consistance gélatineuse, de grosseur variable", ou encore de "petites masses blanches élastiques, en forme de chou-fleur". Observés en microscopie électronique, les grains de kéfir révèlent la présence de bactéries et de levures étroitement associées à une matrice spongieuse.

L'objectif de ce travail vise à étudier les paramètres physicochimiques et biochimiques des laits de différentes origines animales additionnés de grains de kéfir et apprécier l'effet de ces derniers sur la composition protéique du lait par électrophorèse monodimensionnelle.

Pour cela des laits de différentes origines (vache, chèvre, chamelle, lait reconstitué) ont été fermentés et analysés à l'état frais (0h) et après ensemencement (24h, 48h et 72h). Nous avons ensuite comparés les résultats des paramètres physicochimiques, biochimiques et les profils électrophorétiques des protéines du lait avant et après fermentation.

Les résultats des analyses physicochimiques et biochimiques du kéfir ont montré que la composition de ce dernier dépend de la durée de fermentation et l'origine des laits utilisés, et que plusieurs composés présentent des variations très importantes.

L'analyse des gels a permis de dénombrer 38 bandes protéiques de mobilité et d'intensité différentes dans les conditions dénaturantes et réductrices.

Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines, une étude statistique a été effectuée en calculant, l'indice de similarité.

Plusieurs variations quantitatives et qualitatives importantes ont été trouvées entre les laits de différentes origines d'une part, et entre les laits frais et fermentés de la même origine d'autres part.

Mots clés : Lait, grain de kéfir, composition physicochimique, protéines, électrophorèse.

Abstract

Kefir is fermented milk, mainly produced from cow, sheep or goat milks with "kefir seeds". This drink is originally from South Caucasus region, it has many nouns. The most frequent denomination is "kefir" which is original from Turkish.

Kefir grains are described as "small, wrinkled, gelatinous masses of varying size" or "small, elastic, cauliflower-like white masses". Observed by electron microscopy, kefir grains reveal the presence of bacteria and yeasts closely associated with a spongy matrix.

The goal of this work aims to study physicochemical and biochemical parameters of milks of different animal's origin added to kefir seeds and appreciate the effect of these seeds on protein's composition of milk by monodimensional electrophoresis.

For this, milks of different origins (cow, goat, camel, reconstituted milk) were fermented and analyzed in the fresh state (0h) and after seeding (24h, 48h and 72h). We compared after that the results of physicochemical, biochemical parameters and the electrophoretic profiles of milks proteins before and after fermentation.

The results of physicochemical and biochemical analyzes have shown that the composition of kefir depends on fermentation time and the origin of the milks used, and several compounds present very important variations.

Frost analysis allowed the obtaining of clearly separated proteic profil and reproducible milk proteome where 38 protein bands of different mobility and intensity were detected in different denaturant and reduced conditions.

To appreciate numerically the diversity of milk protein, a statistic study was made by calculating similarity index.

Several important variations both quantitative and qualitative were found between milks of different origins on one side, and between fresh and fermented milks on the other side.

Key Words : Milk, kefir seeds, physicochemical composition, proteins, electrophoresis.

الملخص

الكفير عبارة عن حليب مخمر ينتج أساساً من حليب البقر، الغنم وكذلك الماعز، بواسطة "حبوب الكفير"، حيث أن منطقة نشأته هي جنوب القوقاز، وتطلق عليه عدة تسميات "أهمها الكفير" وهو من أصل تركي.

حبوب الكفير توصف على أنها "كتل صغيرة مجمعة، بكثافة جيلاتينية، بحجم متباين"، وكذلك "كتل بيضاء مطاطية، على شكل القرنبيط". ملاحظة حبوب الكفير عبر المجهر الإلكتروني، تظهر وجود بكتيريا و خميرة ملتصقة بشدة في مادة أسفنجية.

إن الهدف من هذه الدراسة هو دراسة واستكشاف المعايير الفيزيائية والكيموحيوية للحليب من مختلف المنشآت الحيوانية بإضافة حبوب الكفير و تقييم تأثير هذه الأخيرة على تكوين بروتين الحليب عن طريق استخدام تقنية الهجرة الكهربائية ذات البعد الواحد. لهذا الغرض تم استخدام حليب بعدة أصول (البقر، الماعز، الإبل و الحليب المعاد تصنيعه)، حيث قمنّا بتخميره و تحليله في الحالة الطازجة (0سا) و بعد التخمير (24سا، 48سا، 72سا) و من ثم تمت مقارنة نتائج الفيزيائية، الكيموحيوية و الهجرة الكهربائية للبروتين قبل و بعد التخمير.

و قد أظهرت النتائج أن تكوين الكفير يعتمد على مدة التخمير و أصل الحليب المستعمل و إن العديد من المركبات لديها اختلافات كبيرة. إن تحليل المواد الهلامية يسمح بالحصول على لمحات من البروتين المفصولة بوضوح و القابلة للتكرار لبروتين الحليب حيث تم الكشف عن 38 شريط بروتيني ذات مسافات هجرة كهربائية و كثافة مختلفة في الشروط المغيرة للحالة الطبيعية و المرجعة.

و من أجل تقييم عددي لتنوع بروتينات الحليب، تم إجراء دراسة إحصائية عن طريق حساب مؤشر التشابه، و قد تم العثور على العديد من التغييرات الكمية و النوعية الكبيرة بين الحليب من مصادر مختلفة من جهة، و بين الحليب الطازج و المخمر من جهة أخرى.

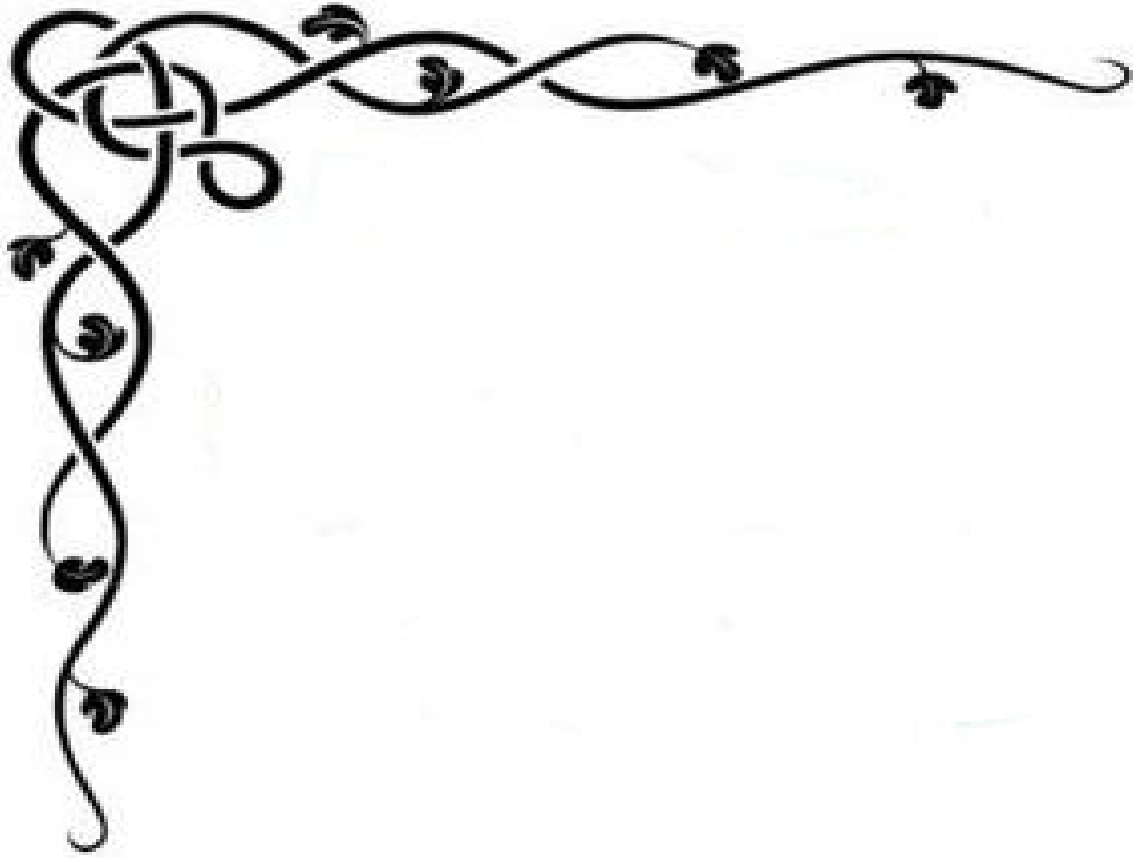
الكلمات المفتاحية: حليب، حبوب الكفير، التكوين الفيزيائي، بروتين، الهجرة الكهربائية.

Liste des tableaux

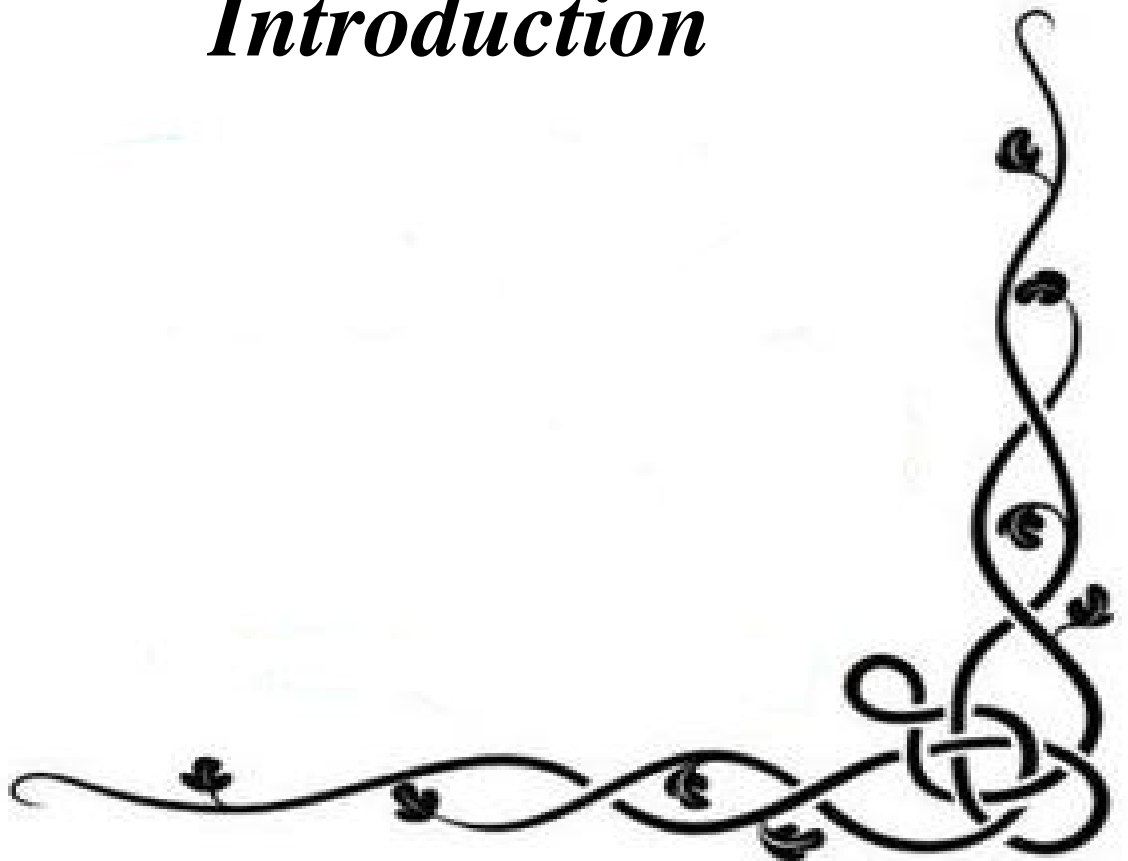
N°	Intitulé	Page
1	Composition moyenne du lait entier	6
2	Un tableau récapitulatif des principaux constituants et les caractères physico-chimiques des laits de diverses espèces	9
3	Les échantillons	20
4	Caractérisation physico-chimiques des échantillons de lait de vache, chèvre, chamelle, et lait reconstitué frais et fermentés	26
5	Paramètres biochimiques des échantillons de lait de vache, chèvre, chamelle, et lait reconstitué frais et fermentés.	29
6	Variation des bandes protéiques présentent dans le lait de vache et chèvre avant et après fermentation.	36
7	Variation des bandes protéiques présentent dans le lait de chamelle et lait reconstitué avant et après fermentation.	40
8	Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites cas du lait total.	43
9	Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites dans le cas de surnageant.	44
10	Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites dans le cas de culot.	45

Liste des figures

N°	Intitulé	Page
1	Illustration de grains de kéfir	12
2	Illustration d'un grain de kéfir en grossissement de 7000 X	12
3	variation du pH des différents laits (chèvre, chamelle, vache et lait reconstitué) en fonction de leurs durées de fermentation.	27
4	variation de l'acidité des différents laits (vache, chèvre, chamelle et lait reconstitué) en fonction de leurs durées de fermentation.	28
5	variation du taux de la matière grasse des différents échantillons (lait de vache, chèvre, chamelle et le lait reconstitué) en fonction de leur durée de fermentation.	30
6	variation du taux de la matière sèche des différents échantillons (lait de vache, chèvre, chamelle et le lait reconstitué) en fonction de leur durée de fermentation.	31
7	variation du taux du lactose des différents échantillons (lait de vache, chèvre, chamelle et le lait reconstitué) en fonction de leur durée de fermentation.	32
8	Profils électrophorétiques des protéines du lait de vache dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS-PAGE. 1 : V0T, 2 : V24T, 3 : V48T, 4 : V72T, 5 : V0S, 6 : V24S, 7 : V48S, 8 : V72S, 9 : V0C, 10 : V24C, 11 : V48C, 12 : V72C.	34
9	profils électrophorétiques des protéines du lait de chèvre dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS- PAGE. 1 : RE0T, 2 : RE 24T, 3 : RE 48T, 4 : RE 72T, 5 : RE 0S, 6 : RE24S, 7 : RE 48S, 8 : RE 72S, 9 : RE 0C, 10 : RE 24C, 11 : RE 48C, 12 : RE 72C.	35
10	profils électrophorétiques des protéines du lait de chamelle dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS-PAGE. 1 : CH0T, 2 : CH24T, 3 : CH48T, 4 : CH72T, 5 : CH0S, 6 : CH24S, 7 : CH48S, 8 : CH72S, 9 : CH0C, 10 : CH24C, 11 : CH48C, 12 : CH72C.	38
11	profils électrophorétiques des protéines du lait reconstitué dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS- PAGE. 1 : L0T, 2 : L24T, 3 : L48T, 4 : L72T, 5 : L0S, 6 : L24S, 7 : L48S, 8 : L72S, 9 : L0C, 10 : L24C, 11 : L48C, 12 : L72C.	39



Introduction



Le lait occupe une place importante dans la ration alimentaire de la population mondiale. En effet, ce produit, irremplaçable pour les nourrissons, est aussi vital pour les autres tranches d'âge, du fait de son apport important en nutriments de base (protides, lipides, et glucides) et sa richesse en éléments minéraux, notamment le calcium et en vitamines [1].

Cette matière alimentaire, source de protéines animales relativement bon marché et ayant une bonne digestibilité, soit en tant que produit à l'état de lait frais ou transformé en produits dérivés (fromages, beurre, laits fermentés, crèmes glacées...etc.)[1].

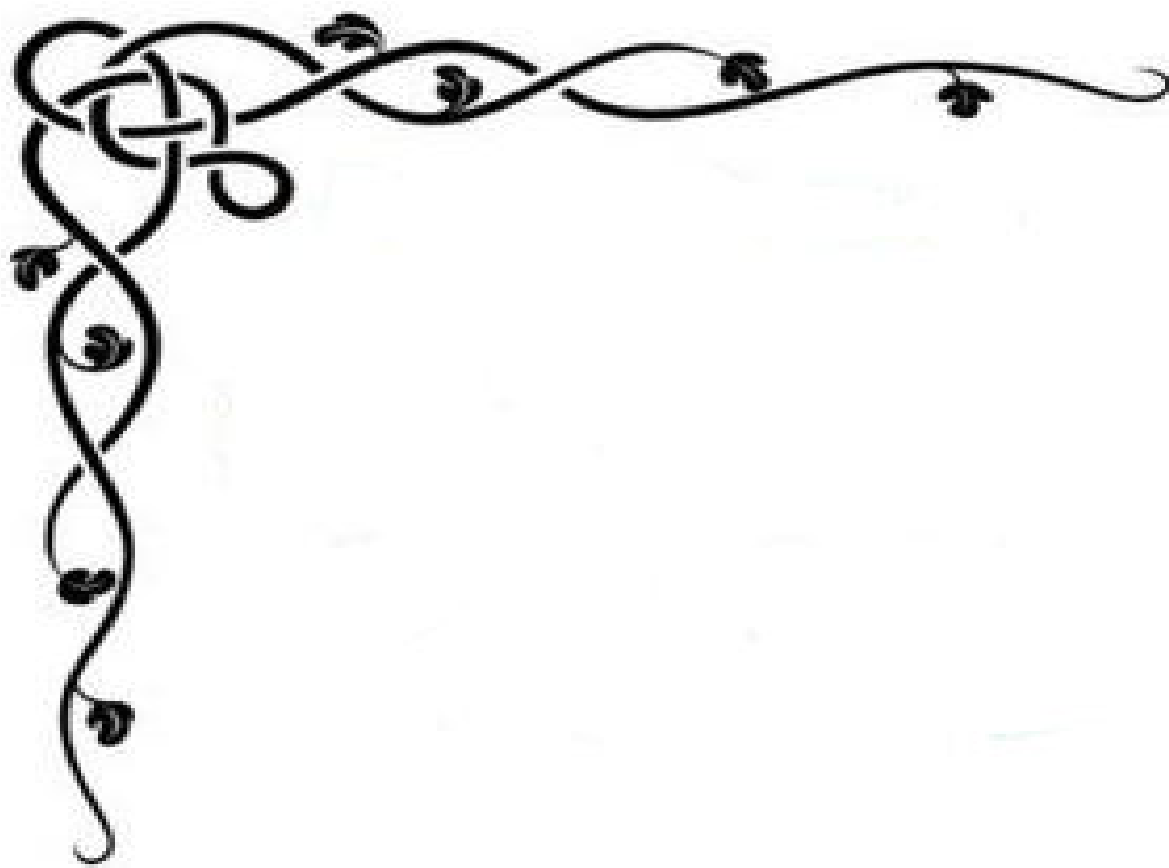
C'est pour ces raisons qu'un effort consistant est déployé de part le monde pour satisfaire des besoins et répondre aux exigences de plus en plus affinées des consommateurs. Cet effort est surtout mené en amont de la production laitière, en améliorant les conditions internes et externes d'élevage, que ce soit pour la vache, qui domine la production mondiale, ou d'autres espèces laitières, non moins importantes et surtout connues pour leur rusticité et leur adaptation particulière à leur milieu d'implantation telles la chèvre, la brebis et la bufflonne [1].

Les laits fermentés ont été développés dans le monde entier, afin de répondre au besoin de prolonger le temps de conservation du lait. Il s'agit de produits traditionnels ; certains ont évolué et de nos jours sont fabriqués à une échelle industrielle au moyen de souches microbiennes sélectionnées et d'équipements modernes. Ce sont des fractions essentielles de l'alimentation de divers peuples d'Europe mais également d'Asie et d'Afrique [2].

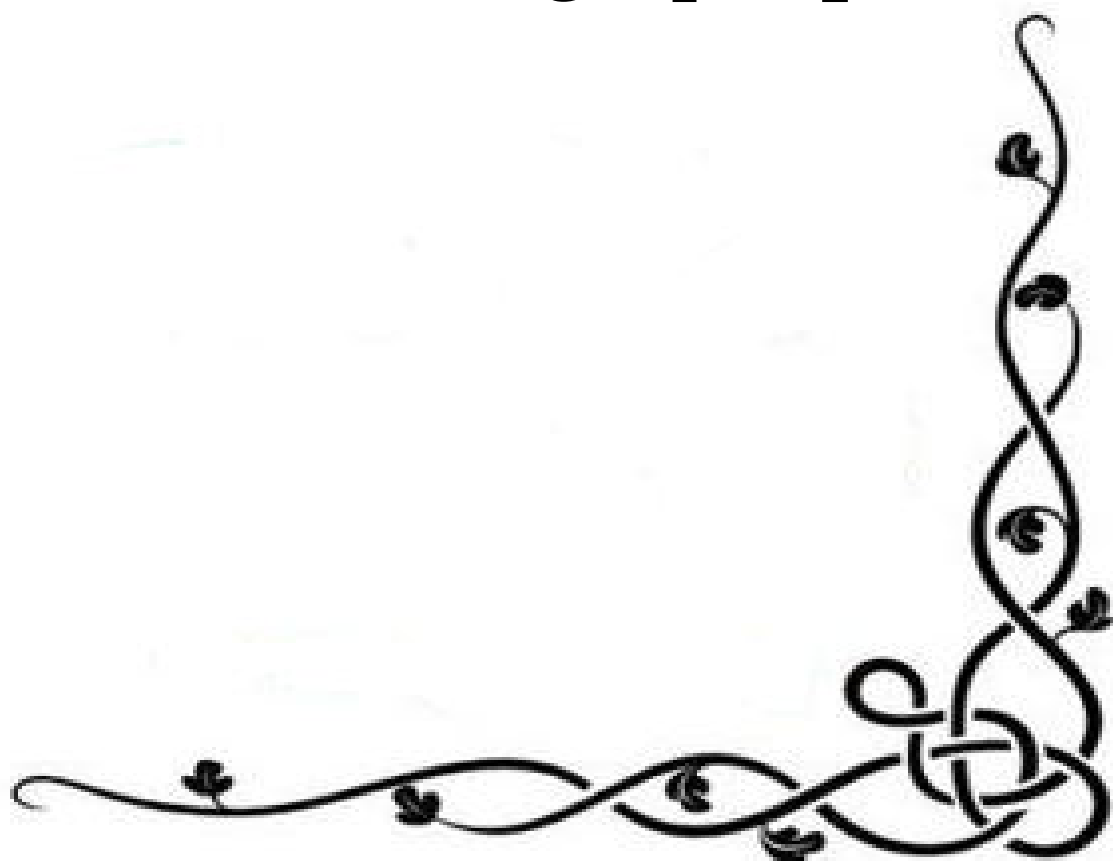
Très tôt, de nombreux chercheurs se sont prononcés très favorablement sur les avantages nutritionnels des produits fermentés qui jouissent d'une grande vogue, leur « image santé » étant nettement positive. Néanmoins, la base scientifique de ces affirmations et, en particulier, de leur influence sur la flore gastro-intestinale et la santé de l'homme, n'est pas fermement établie [2]. Parmi ces produits, le kéfir, lait fermenté d'origine caucasienne, doit sa particularité et son goût spécifique à une association de bactéries lactiques et de levures.

Dans cette optique, nous avons initié ce travail visant à étudier les paramètres physicochimiques et biochimiques des laits de différentes origines animales additionnés de grains de kéfir et apprécier l'effet de ces derniers sur la composition protéique du lait par électrophorèse monodimensionnelle.

Les données bibliographiques sont présentées dans le premier chapitre de ce mémoire, avec une présentation générale du lait et du kéfir tout en mettant l'accent sur les bienfaits du lait fermenté « kéfir » sur notre santé. Le deuxième chapitre décrit le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude. Les étapes suivies dans l'exploitation des résultats ainsi que leur discussion sont présentées dans le troisième chapitre. Une conclusion générale et des perspectives sont enfin données.



Synthèse Bibliographique



1. Généralités sur le lait

1.1. Définition

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum » [3].

Le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femme et par celles des mammifères femelles pour la nutrition des jeunes [4].

Le lait cru est un lait qui n'a subi aucun traitement de conservation sauf la réfrigération à la ferme. La date limite de vente correspond au lendemain du jour de la traite. Le lait cru doit être porté à l'ébullition avant consommation (car il contient des germes pathogènes). Il doit être conservé au réfrigérateur et consommé dans les 24h [5].

Le lait doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires. Il peut être commercialisé en l'état mais le plus souvent après avoir subi des traitements de standardisation lipidique et d'épuration microbienne pour limiter les risques hygiéniques et assurer en plus une longue conservation [6].

1.2. La composition du lait

La composition générale du lait varie en fonction d'une multiplicité de facteurs : la race, l'alimentation, la période de lactation et l'état de santé de l'animal [7].

Les laits sont les seuls aliments naturels complets qui existent [4].

Le lait est une source importante de protéines de très bonne qualité, riches en acides aminés essentiels, tout particulièrement en lysine qui est par excellence l'acide aminé de la croissance. Ses lipides, caractérisés par rapport aux autres corps gras alimentaires par une forte proportion d'acides gras à chaîne courte, sont beaucoup plus riches en acides gras saturés qu'en acides gras insaturés. Ils véhiculent par ailleurs des quantités appréciables de cholestérol et de vitamine A ainsi que de faibles quantités de vitamine D et E [4].

Les principaux constituants du lait par ordre de présence sont [3]:

- L'eau, très majoritaire,
- Les glucides principalement représentés par le lactose,
- Les lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras,
- Les sels minéraux à l'état ionique et moléculaire,
- Les protéines, caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles,
- Les éléments à l'état de trace mais au rôle biologique important, enzymes, vitamines et oligoéléments.

1-2-1- L'eau

La valeur nutritive du lait est particulièrement élevée grâce à l'équilibre entre les nutriments qu'il contient. La quantité d'eau dans le lait reflète cet équilibre. Chez tous les animaux, l'eau est le nutriment requis en quantité la plus élevée (90%) [8].

La quantité d'eau dans le lait est contrôlée par la quantité de lactose synthétisé par les cellules sécrétrices de la glande mammaire. L'eau nécessaire pour la formation du lait est prélevée du sang. La production de lait diminue rapidement lorsque l'eau n'est pas disponible [8].

1-2-2- Les glucides

L'hydrate de carbone principal du lait est le lactose qu'est synthétisé dans le pis à partir du glucose et du galactose. Malgré que le lactose soit un sucre, il n'a pas une saveur douce. Sa concentration dans le lait ne varie que légèrement (4,8-5,2 g/100g). Contrairement à la concentration de matière grasse dans le lait, celle du lactose ne peut pas être modifiée facilement par l'alimentation [9].

1-2-3- Les lipides

La matière grasse dont la quantité varie en fonction des conditions d'élevage, est présentée dans le lait sous forme de globules gras, de 1 à 8µm de diamètre, émulsionnés dans la phase aqueuse. Le taux en matière grasse est variable en fonction de l'origine de lait (environ 10 milliards de globules par millilitre de lait) [9].

La composition chimique de la matière grasse(MG) du lait est extrêmement complexe ; cette MG comprend un mélange de triglycérides ainsi que divers composé lipidiques ou liposolubles mineurs tels que les phospholipidiques et les stérols [10].

1- 2- 4 Les protéines

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes et elles constituent une part importante du lait et des produit laitiers, l'analyse du lait par minéralisation, permet d'évaluer que 95% de la quantité totale d'azote est présente dans les protéines dont la concentration moyenne est de 3.2%. Les composés azotés non protéiques sont principalement des protéases, des peptones et de l'urée [9].

Différentes structures et propriétés physicochimiques distinguent les protéines du lait. On les classe en deux catégories d'après leur solubilité dans l'eau et leur stabilité :

➤ **les caséines** : qui sont en suspension colloïdale, qui se regroupent sous forme de micelles et qui précipitent sous l'action de la présure ou lors de l'identification à un pH d'environ 4.6 [11].

Les caséines sont très bien adaptées à la nourriture des nouveaux nés. Leurs structures moléculaires ne leur confèrent pas d'activité enzymatique. Elles constituent aussi la matière première des fromages [12].

Environ 95% des caséines dans le lait. En base sèche, les micelles de caséines contiennent 94% de protéines, et 6% d'espèces de faible poids moléculaire, et qui consistent en calcium, magnésium, phosphate et citrate. Les micelles sont hautement hydratées, elles contiennent environ 2,0 g d'H₂O par g de protéine [12].

On distingue principalement 4 catégories de caséines:

Les caséines α (α S1 et α S2) (36% et 10% respectivement) ; Les caséines β (34%) ; Les caséines κ (13%) ; Les caséines γ (7%) [13].

➤ **les protéines du sérum** : qui sont en solution colloïdale et qui précipitent sous l'action de la chaleur. chez la vache, les protéines du lactosérum les plus abondantes à température ambiante sont la β -lactoglobuline (β -Lg) et l' α -lactalbumine (α -La) [14].

Le tableau 1 représente la composition moyenne du lait entier.

Tableau 1 : Composition moyenne du lait entier [5].

<i>Composants</i>	<i>Teneurs (g/100g)</i>
<i>Eau</i>	89.5
<i>Dérivés azotés</i>	3.44
<i>Protéines</i>	3.27
<i>Caséine</i>	2.71
<i>Protéines solubles</i>	0.56
<i>Azote non protéique</i>	0.17
<i>Matières grasses</i>	3.5
<i>Lipides neutres</i>	3.4
<i>Lipides complexes</i>	<0.05
<i>Composés liposolubles</i>	<0.05
Glucides	4.8
<i>Lactose</i>	4.7
<i>Gaz dissous</i>	5% du volume du lait
<i>Extrait sec total</i>	12.8g

1.3. Les phases du lait

Le lait est caractérisé par différentes phases en équilibre instables :

- Phase aqueuse : contenant en solution des molécules de sucre, des ions et des composés azotés.
- Phases colloïdales instables : constituées de deux types de colloïdes protéiniques.
- Phase émulsifiable : des globules gras en émulsion dans la phase aqueuse [15].
- Une phase gazeuse composée d'O₂, d'azote et de CO₂ dissous qui représente environ 5 % du volume du lait [5].

La composition des laits varie selon les espèces. On distingue:

- Les laits albumineux qui contiennent autant d'albumine que de caséine, produit par les femmes, les juments, les ânesses...
- Les laits caséineux qui contiennent plus de caséine, produits par les vaches, les brebis, les chèvres. Ces laits coagulent facilement et sont la matière première de l'industrie fromagère.

La qualité des protéines influe sur le coagulum et donc sur la digestibilité du lait. Le caillé des laits albumineux, plus fin, est souvent plus digeste [16].

1.4. Les propriétés physicochimiques

1.4.1. Le pH

Le pH du lait varie habituellement entre 6,5 et 6,7 (à 20°C), avec une valeur moyenne de 6,6: il est donc très légèrement acide. Ce pH tend à décroître quelque peu au cours d'une lactation. Mais hormis ces variations mineures, qui restent dans les limites précitées. Le colostrum peut avoir un pH aussi bas que 6,0 [17].

1.4.2. La densité

La densité du lait est généralement comprise entre 1,028 et 1,036.

Elle varie dans le même sens que la richesse en matière sèche du lait, c'est à dire qu'un lait plus riche sera a priori plus lourd, même s'il faut considérer le fait que les lipides, dont la présence peut augmenter la proportion de matière sèche, sont eux moins denses que l'eau donc

diminue la densité globale du lait [18].

1.4.3. L'acidité

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 minérale telles que les phosphates et le CO₂, et d'acide organiques, le plus souvent l'acide citrique. On appelle l'acidité apparente ou acidité naturelle du lait. Elle varie entre 0.13 et 0.17% d'équivalent d'acide lactique [11].

Le lait frais ne contient qu'environ 0.002% d'acide lactique. En se développant, les bactéries lactiques vont former de l'acide lactique CH₃_CHOH_COOH par fermentation du lactose. Cette nouvelle acidité se nomme acidité développée. C'est cette acidité qui conduit à la dénaturation des protéines [11].

Le tableau 2 représente les principaux constituants et les caractères physico-chimiques des différents types de laits.

Tableau 2 : Un tableau récapitulatif des principaux constituants et les caractères physico-chimiques des laits de diverses espèces [19].

Constituants	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait de chamelle
Extrait sec total (g/litre)	128	134	136
Protéines (g/litre)	32	34.1	35
Caséine (g/litre)	26	26	28
Lactose (g/litre)	48	44-47	50
Matières salines (g/litre)	9	7.7	8
Matières grasses (g/litre)	37	41	45
Energie (Kcal/litre)	705	600-750	800
Densité du lait entier à 20°C	1.028-1.033	1.027-1.035	1.025-1.038
pH à 20°C	6.60-6.80	6.45-6.60	6.20-6.82
Acidité (°Dornic)	15-17	14-18	14 -17

2. Le kéfir

2.1. Généralité sur le kéfir

Le kéfir est un lait fermenté, produit principalement à partir des laits de vache, de brebis ou de chèvre à l'aide de « grains de kéfir ». La région d'origine de cette boisson est le Sud du Caucase, sous des noms très variés. La dénomination la plus fréquente est « kéfir » qui est d'origine turque [2].

La formation des premiers grains de kéfir et la méthode de préparation utilisée par les anciens peuples du Caucase mêlent les légendes et la réalité, des rapports scientifiques n'existant pas [20].

La première publication concernant cette boisson, faite par un médecin russe, DZHOGIN G., en 1867, dans les Travaux de la Société Médicale du Caucase, a été suivie par des dizaines d'autres [21]. En Europe, la boisson a été introduite vers 1860. L'industrie bavaroise, en 1936, utilisait déjà les grains de kéfir pour la valorisation du lactosérum [2].

2.2. Grains de kéfir

2.2.1. Structure des grains de kéfir

Les grains de kéfir sont décrits comme étant de "petites masses ridées, à consistance gélatineuse, de grosseur variable" [22], des "granules irréguliers gélatineux, blanchâtres ou jaunâtres, de la taille d'une noix" [23], ou encore de "petites masses blanches élastiques, en forme de chou-fleur" [24]. Si l'apparence d'un chou-fleur est souvent évoquée pour décrire des grains de kéfir, elle n'en est pas pour autant exclusive [25]: la Figure 1 illustre des formes variées de grains et en décrivent comme "pouvant être déroulés en une sorte de feuille".

La dimension des grains de kéfir est variable et homogène ou hétérogène au sein d'un lot selon qu'ils sont petits ou plus gros [26].

Observés en microscopie électronique, les grains de kéfir révèlent la présence de bactéries et de levures étroitement associées à une matrice spongieuse (Figure 2). Tous les grains examinés recèlent des bactéries en forme de bacille ; des bactéries en forme de coque y sont par contre sporadiquement observables [26].

Ils ont relevé de ces observations microscopiques une absence d'agencement structuré entre les bactéries et les levures. Tous s'accordent à dire que les bactéries et les levures sont inégalement réparties dans le grain. Toutefois, tandis que certains observent une plus grande concentration de levures à la surface du grain et une plus grande concentration de bactéries à l'intérieur du grain, d'autres observent le contraire [26].

2.2.2. Microflore des grains de kéfir

2.2.2.1. Composition microbienne qualitative des grains de kéfir

Les études publiées sur la composition microbienne de grains de kéfir mettent en lumière une microflore complexe, souvent composée de plusieurs espèces de bactéries lactiques et de levures, parfois associées à d'autres micro-organismes [26].

La microflore identifiée à partir de grains de kéfir comprend de nombreuses espèces, associées dans les grains de kéfir en diverses combinaisons [28].

Parmi les bactéries lactiques recensées, la majorité des espèces appartient au genre *Lactobacillus*. Elle inclut des espèces homofermentaires : *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefiranofaciens* ; et des espèces hétérofermentaires facultatives ou obligatoires : *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. kefiri*, *Lb. paracasei*, *Lb. parakefiri*, *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus*. Les autres bactéries lactiques, représentées dans une moindre diversité d'espèces que les lactobacilles, appartiennent aux genres homofermentaires *Lactococcus* (*L. lactis*), *Pediococcus* et *Streptococcus* (*St. thermophilus*) ainsi qu'aux genres hétérofermentaires *Leuconostoc* (*Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis*) et *Weissella* (*W. viridescens*) [28].

Les levures isolées à partir des grains comprennent de nombreuses espèces incapables de fermenter le lactose : *Candida friedrichii*, *Candida inconspicua*, *Candida maris*, *Candida tenuis*, *Kazachstania exigua*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torasporula delbrueckii*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces sp.* , et seulement deux espèces capables de fermenter le lactose : *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces marxianus* [28].

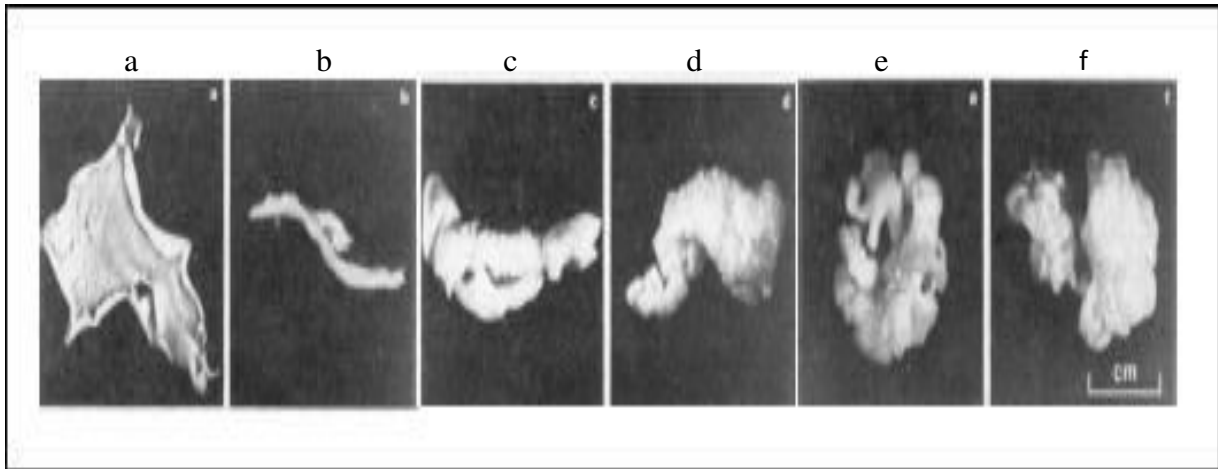


Figure 1 : Illustration de grains de kéfir [25] ; a : grain en forme de "feuille" ; b : grain en forme de "feuille enroulée" ; c & d : grain de forme non définie ; e & f : grain en forme de "chou-fleur".

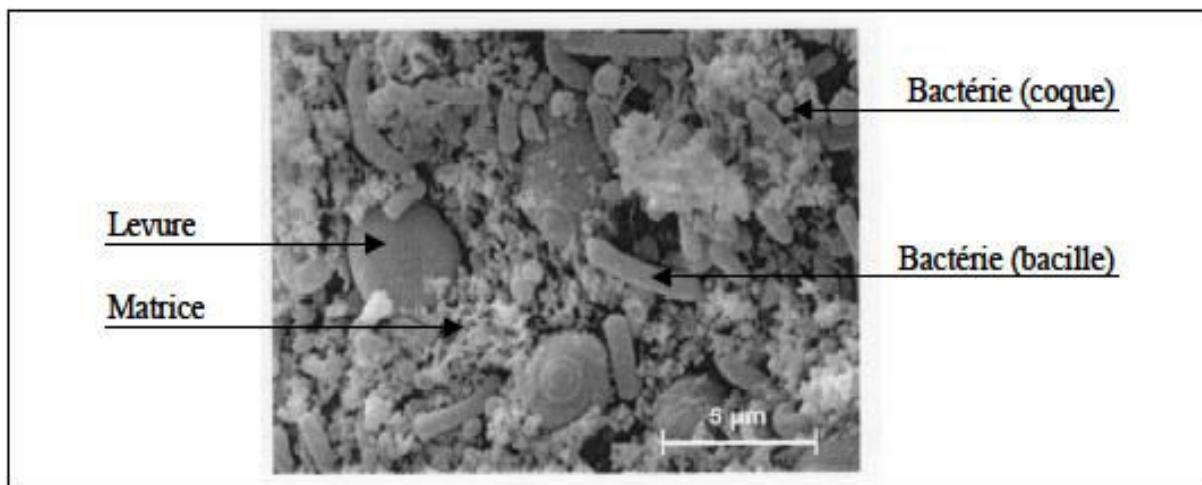


Figure 2 : Illustration d'un grain de kéfir en grossissement de 7000 X [27].

Les autres micro-organismes, identifiés occasionnellement dans des grains de kéfir, comprennent des bactéries d'intérêt alimentaire : *Acetobacter sp.* et *Micrococcus sp.* , et des bactéries contaminantes : *Acinetobacter sp.* , *Bacillus sp.* , *Enterobacter sp.* , *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* et *Sphingobacterium sp.* [28].

2.2.2.2. Composition microbienne quantitative des grains de kéfir

Du point de vue quantitatif, les grains de kéfir renferment un nombre variable de bactéries lactiques et de levures [26].

La flore bactérienne lactique des grains de kéfir est présentée comme dominante par rapport à celle des levures [23]. La comparaison des données publiées relatives aux dénombrements des différents groupes microbiens montre qu'effectivement la population de bactéries lactiques domine, ou est à toute la moins présente en quantité équivalente à celle des levures, dans la plupart des grains de kéfir [26]. Chiffrée, la représentativité de cette population est alors variable : comprise entre 83 % et 90 % de la flore totale de grains bulgares [29], la population de bactéries lactiques est 1000 fois plus élevée que celle des levures dans des grains turques [27]. Dans certains grains toutefois, la population des levures est plus abondante que celle des bactéries lactiques [30], [31].

La flore bactérienne des grains de kéfir est le plus souvent dominée par des lactobacilles [26], mais peut être dominée par des coques lactiques. Dans ce cas, les coques lactiques représentent jusqu'à 65 % de la flore totale du grain [29].

La composition microbienne de grains de kéfir n'inclut pas nécessairement des espèces appartenant à chacun des types fermentaires de lactobacilles : certaines comprennent exclusivement des lactobacilles hétérofermentaires et d'autres, un unique lactobacille homofermentaire. Toutefois, lorsque des spécimens appartenant à chacun des types fermentaires de lactobacilles sont quantifiés dans des grains, les homofermentaires sont plus abondants que les hétérofermentaires [26].

La flore bactérienne non lactique des grains de kéfir, considérée comme contaminantes, a rarement fait l'objet d'une approche quantitative [30], les bactéries non lactiques, toutes espèces confondues, représentent de 6,6 % à 33,3 % de la flore des grains. Parmi la flore

bactérienne non lactique identifiée dans des grains de kéfir, figurent des bactéries acétiques [26].

2.3. Préparation traditionnelle du kéfir

Traditionnellement, le lait est fermenté à partir de grains de kéfir. En production domestique, le lait est incubé à température ambiante. La quantité de grains ajoutés au lait et la durée d'incubation sont ajustées en fonction de la température de la pièce et du produit final souhaité : plus ou moins acide, mousseux, visqueux, cette pratique se traduit par un taux d'ensemencement variant de 2 % à 10 % et une incubation de 18 à 24 heures à une température comprise entre 20 °C et 25 °C [32]. Les grains de kéfir sont alors séparés du lait fermenté à l'aide d'un tamis. Rincés à l'eau, ils peuvent être réutilisés pour d'autres ensemencements [26].

Ce procédé simple est matériellement peu pratique à mettre en œuvre pour une production industrielle de kéfir. D'autant plus que, pour la préservation des grains, le matériel ne peut contenir d'alliage métallique [33].

2.4. Composition du lait fermenté

La qualité du kéfir, tant au niveau du goût que de sa valeur nutritionnelle ou diététique, dépend de celle du lait et des transformations résultant de l'activité des différents micro-organismes présents dans le ferment. La diversité de la composition microbienne des ferments et des pratiques déterminant leur développement engendre une grande diversité de kéfirs. Les traits communs à ces kéfirs, mais développés avec des intensités variables, sont l'acidification, la présence d'alcool et d'un fond levuré, ainsi qu'une texture onctueuse et mousseuse. Au niveau sensoriel, le kéfir traditionnel est décrit comme étant plus onctueux et plus crémeux mais aussi plus acide et plus amer qu'un yaourt [26].

2.4.1. Acides organiques

L'acide lactique du kéfir est presque exclusivement sous la forme de son isomère L(+), forme la plus assimilable par l'organisme humain. Les teneurs en acide lactique communément citées pour le kéfir, et confirmées par les mesures de Lacrosse, sont comprises entre 6 et 10 g.l⁻¹. Il semblerait cependant qu'elles puissent être beaucoup plus élevées : une teneur de 15 g.l⁻¹.

¹ a en effet été mesurée dans un lait fermenté à partir de grains argentins. Ces teneurs sont, dans l'ensemble, comparables à celles d'un yaourt [26].

Le kéfir peut contenir des quantités relativement élevées d'acide acétique : $0,9 \text{ g.l}^{-1}$ alors que celle d'un yaourt est de $0,2 \text{ g.l}^{-1}$. Ce composé contribue probablement à la perception "acide" du kéfir [26].

2.4.2. Lactose

La quantité de lactose restant après fermentation varie de 20 g.l^{-1} à 35 g.l^{-1} . D'autre en mesurent toutefois une quantité moindre dans un kéfir traditionnel : 14 g.l^{-1} [26].

Malgré la présence de lactose résiduel, le kéfir peut, être consommé sans problème par les personnes intolérantes au lactose. A quantités égales, le lactose ingéré par l'intermédiaire de kéfir est effectivement mieux digéré et mieux toléré par l'homme adulte que celui ingéré par la consommation de lait [34]. Cette amélioration de la digestion et de la tolérance au lactose proviendrait de la libération, dans le tube digestif, de β -galactosidase microbienne [26].

2.4.3. Protéines, matière grasse et acide linoléique conjugué

Les teneurs en protéines, en MG et en acide linoléique conjugué (CLA) du kéfir sont essentiellement déterminées par celles du lait utilisé. Du point de vue digestibilité, les protéines du kéfir seraient équivalentes à celles des laits caillés [26].

La teneur en MG du kéfir dépend du choix du lait utilisé : entier, demi-écrémé ou écrémé. Elle diminue toutefois après la fermentation lactique. Du kéfir préparé à partir d'un lait à 3,5 % de MG affiche un taux compris entre 3,0 % et 3,1 % [26].

La teneur du lait en isomères t9, t11 du CLA est augmentée après fermentation par des grains de kéfir [35], car les *Lactobacillus* principalement *Lb. acidophilus* présente dans les grains de kéfir utilise l'acide linoléique qui est le produit de la lipolyse de la MG du lait pour synthétiser le CLA et qui est ensuite convertie par hydrogénation et isomérisation en isomères [36].

Cette composante isomérique du CLA ne représente toutefois qu'une petite fraction de l'ensemble des isomères du CLA [26].

2.4.4. Alcool et CO₂

La teneur en éthanol du kéfir dépend du procédé de fabrication appliqué. Elle est plus élevée dans le kéfir traditionnel que dans le kéfir industriel. Un lait acidifié à partir de grains a une teneur en éthanol comprise entre 0,1 % et 0,3 %. La teneur en alcool dans les kéfirs industriels atteint par contre au maximum 0,04 % [26].

De même que pour la teneur en éthanol, l'enrichissement en CO₂ du kéfir dépend du procédé appliqué. Pour un lait acidifié à partir de grains de kéfir, le taux de CO₂ est compris entre 0,08 % et 0,2 %. Il peut toutefois être beaucoup plus élevé : 3 % de CO₂ ont été mesurés dans un lait acidifié à partir de grains argentins [26].

2.5. Kéfir et santé

2.5.1. Le kéfir est une source incroyable de plusieurs nutriments

Les bactéries lactiques transforment le lactose contenu dans le lait en acide lactique, c'est pourquoi le kéfir a le même goût que le yaourt, mais une consistance plus légère. 175 ml de kéfir au lait contiennent [37]:

- Protéines : 6 g.
- Calcium : 20% des AJR.
- Phosphore : 20% des AJR.
- Vitamine B12 : 14% des AJR.
- Riboflavine (B2) : 19% des AJR.
- Magnésium : 5% des AJR.
- Une quantité décente de vitamine D.

Ceci vient avec environ 100 calories, 7-8 g de glucides et 3-6 g de matière grasse en fonction du type de lait utilisé [37].

Le kéfir contient aussi une grande variété de composés bioactifs, y compris des acides organiques et des peptides qui contribuent à ses bienfaits sur la santé [37].

Des versions de kéfir sans produits laitiers peuvent être fabriquées avec de l'eau de noix de coco, du lait de noix de coco, ou d'autres liquides sucrés. Ceux-ci n'auront pas le même profil nutritionnel que le kéfir à base de lait [37].

2.5.2. Le kéfir est un probiotique plus puissant que le yaourt

Certains microorganismes peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé quand ils sont ingérés. Connus sous le nom de probiotiques, ces microorganismes peuvent avoir une influence sur la santé de plusieurs façons, y compris la digestion et le contrôle du poids. Le yaourt est l'aliment probiotique le plus connu dans l'alimentation occidentale, mais le kéfir est en fait une meilleure source de probiotiques [38].

Les graines de kéfir contiennent environ 30 souches de bactéries et de levures, en faisant une source très riche de probiotiques divers. Les autres produits laitiers fermentés sont fabriqués avec beaucoup moins de souches, et ne contiennent pas de levures [37].

Les probiotiques tels que le kéfir peuvent aider à restaurer l'équilibre de la flore bactérienne dans les intestins. Ceci est la raison pour laquelle ils sont très efficaces pour de nombreuses formes de diarrhée [39].

Il existe également plusieurs preuves que les probiotiques et les aliments probiotiques peuvent aider avec toutes sortes de problèmes digestifs, ceci inclut le syndrome du côlon irritable (IBS), les ulcères causés par une infection à *H. pylori*, et beaucoup d'autres [39].

2.5.3. Le kéfir possède des propriétés antibactériennes puissantes

Certains probiotiques dans le kéfir sont censés protéger contre les infections. Ceci comprend le probiotique *Lactobacillus kefir*, qui est propre au kéfir. Les études montrent que ce probiotique peut inhiber la croissance de certaines bactéries pathogènes, y compris la Salmonelle, *Helicobacter pylori* et *E. coli* [37].

Le Kefiran, un type de polysaccharide présent dans le kéfir, possède aussi des propriétés antibactériennes [40].

2.5.4. Le kéfir peut améliorer la santé des os et diminuer le risque d'ostéoporose

L'ostéoporose (os « poreux ») est caractérisée par une détérioration du tissu osseux, et c'est un problème majeur dans les pays occidentaux. C'est surtout commun chez les femmes âgées, et augmente dramatiquement le risque de fractures [37].

Assurer un apport adéquat en calcium est l'un des moyens les plus efficaces pour améliorer la santé osseuse et ralentir la progression de l'ostéoporose [37].

Le kéfir fabriqué à partir de produits laitiers entiers est non seulement une bonne source de calcium, mais aussi de vitamine K. Ce nutriment joue un rôle important dans le métabolisme du calcium, et il a été prouvé que le prendre en supplément avec celui-ci réduit jusqu'à 81% le risque de fractures [37].

De récentes études sur les animaux ont démontré que le kéfir peut augmenter l'absorption du calcium par les cellules osseuses. Cela mène à une amélioration de la densité osseuse, ce qui devrait aider à prévenir les fractures [37].

2.5.5. Le Kéfir peut prévenir contre le cancer

Le cancer est une des principales causes de mort dans le monde. Cela se produit quand il y a une croissance anormale et incontrôlée de cellules dans le corps, comme les tumeurs [37].

Les probiotiques présents dans les produits laitiers fermentés sont censés inhiber la croissance tumorale, en réduisant la formation des composés cancérigènes, ainsi que par la stimulation du système immunitaire [37].

Ce rôle protecteur a été démontré dans plusieurs études dans des tubes à essais. Une étude a démontré que l'extrait de kéfir réduit le nombre de cellules du cancer du sein humain de 56%, contre seulement 14% pour l'extrait de yaourt [35]. Cependant, il ne faut pas prendre cela trop au sérieux vu que c'est loin d'être prouvé sur les humains vivants qui respirent [37].

2.5.6. Le Kéfir est généralement bien toléré par les gens qui ont une intolérance au lactose

Les bactéries lactiques dans les produits laitiers fermentés (comme le kéfir et le yaourt)

transforment le lactose en acide lactique, de sorte que ces aliments soient beaucoup plus faibles en lactose que le lait [39].

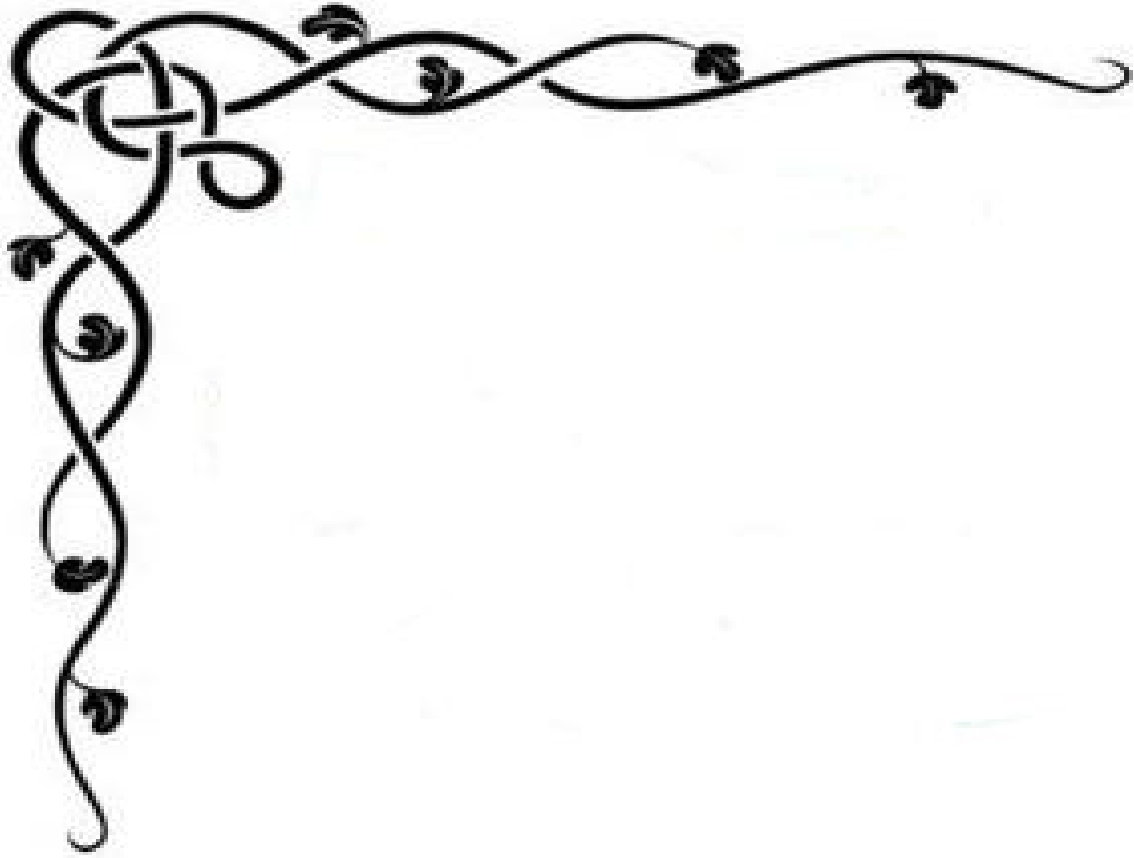
Ils contiennent également des enzymes qui peuvent aider à décomposer encore plus le lactose. Grâce à ça, le kéfir est généralement bien toléré par les personnes ayant une intolérance au lactose, du moins par rapport au lait ordinaire [39].

2.5.7. Le Kéfir peut considérablement diminuer les symptômes d'allergie et d'asthme

Les réactions allergiques sont causées par des réactions inflammatoires contre des substances environnementales inoffensives. Les personnes ayant un système immunitaire plus sensible que les autres sont plus sujettes aux allergies, qui peuvent provoquer d'autres conditions médicales telles que l'asthme [37].

Dans des études animales, il a été démontré que le kéfir avait des propriétés de suppression des réponses inflammatoires liées à l'allergie et l'asthme. Des études humaines sont nécessaires pour mieux explorer ces effets [37].

Cette boisson est également conseillée en cas d'encombrement bronchique et elle a également la réputation d'améliorer les problèmes de peau comme l'eczéma ou la dermatite atopique [39].



Matériel et Méthodes



1. Matériel biologique

Le présent travail a été réalisé grâce à la collaboration de deux laboratoires :

- Laboratoire de Génétique biochimie et Biotechnologie Végétales, Département de Biochimie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Université des frères Mentouri Constantine.
- Laboratoire du complexe de transformation laitière SAFILAIT SARL de Constantine.

L'étude a porté sur 4 échantillons de laits provenant de différentes origines animales (chamelle, chèvre, vache et un lait reconstitué). Les échantillons sont collectés dans des conditions hygiéniques, conditionnés dans des bouteilles stériles et congelés à -20°C afin d'analyser leur propriétés physicochimique, biochimique et profils protéiques avant et après ajout des grains de Kéfir.

Les échantillons sont représentés dans le tableau 3 :

Lait	Région de provenance	Date de collecte
Lait de chamelle	Biskra	05/03/2017
Lait de vache	Skikda	07/03/2017
Lait de chèvre	Constantine	11/03/2017
Lait reconstitué de sachet	Constantine	Acheté du commerce

2. Méthodes d'analyses

2.1. La fermentation des laits avec les grains de kéfir

Nous pesons 50g des grains de Kéfir après les avoir rincé, puis nous les mettons dans 500ml de chaque échantillon du lait (vache, chèvre, chamelle, et lait reconstitué). Nous laissons fermenter à une température ambiante et dans l'obscurité pendant 24h, 48h et 72h.

Nous effectuons un prélèvement de 500 µl après 24h, 48h et 72h de chaque échantillon des laits fermentés puis nous les mettons au congélateur.

2.2. Analyses physico-chimiques

2.2.1. Mesure du pH

La valeur du pH a une importance exceptionnelle par l'abondance des indications qu'elle donne sur la richesse du lait en certains de ces constituants, sur son état de fraîcheur ou sur sa stabilité [41]. Le pH des différents laits est mesuré à l'aide d'un pH mètre selon la méthode électro métrique [42].

2.2.2. Détermination de l'acidité Dornic

L'acidité titrable du lait est exprimée en « degré Dornic » c'est-à-dire en décigramme d'acide lactique par litre de lait [43]. Il s'agit du titrage de l'acidité par la soude Dornic (N/9) en présence de phénol phtaléine comme indicateur [44].

À l'aide d'une pipette graduée, nous prélevons 10 ml de lait auxquels nous ajoutons 2 à 3 gouttes de phénol phtaléine à 1 %. Nous procédons au titrage par NaOH jusqu'à l'apparition d'une couleur rose claire qui indique la fin du titrage. L'acidité en degré Dornic est égale au volume de NaOH consommé multiplié par 10 [41].

2.3. Analyses biochimiques

2.3.1. Détermination de la matière grasse (Méthode GERBER)

Le principe de cette méthode est basé sur la dissolution de la matière grasse à doser par l'acide sulfurique. Sous l'influence d'une force centrifuge et grâce à l'adjonction d'une faible quantité d'alcool iso amylique, la matière grasse se sépare en couche claire dont les graduations du butyromètre révèlent le taux [42].

Nous introduisons dans un butyromètre 10ml d'acide sulfurique. Ensuite, à l'aide d'une pipette graduée, nous ajoutons 11 ml de lait tout en évitant un mélange prématuré du lait avec l'acide. Puis, nous versons sur la surface du lait d'alcool iso- amylique. En bouchant le butyromètre, nous procédons à l'agitation jusqu'à ce que la caséine soit entièrement dissoute. Puis, nous plaçons le butyromètre dans la centrifugeuse à 1000-1200 tours pendant 5 à 6 minutes. La teneur en matière grasse exprimée en g/L est égale à $(N-N') \times 10$ avec [44]:

- N : la valeur atteinte par le niveau supérieur de la phase grasse.
- N' : la valeur atteinte par le niveau inférieur de phase grasse. Lecture directe donne le résultat.

2.3.2. L'humidité et la matière sèche

Il s'agit de mesurer la perte d'eau du lait après un séchage par un dessiccateur muni d'un système électronique (Infrarouge) permettant de calculer le taux de matière sèche restante [45].

Nous prenons une coupelle et on la pèse à l'aide du dessiccateur, nous tarons, nous ajoutons 3g du lait et nous l'étalons sur la coupelle. Nous Baissons le capot de l'appareil; départ automatique de l'analyse. La fin d'évaporation se manifeste lorsque la perte du poids reste constante. Le dessiccateur indique directement en pourcentage le taux d'humidité et la matière sèche sur l'écran.

2.3.3. Dosage du lactose

Le lactose est dosé selon la méthode de BERTRAND(1988). Le lait est déféqué par l'hexacyanoferrate de zinc ; une solution cupro-alcaline est réduite à chaud par le filtrat obtenu. Le précipité d'oxyde cuivreux formé est oxydé par une solution de sulfate ferrique et le sulfate ferreux formé est dosé par manganimétrie en présence d'orthophénantroline ferreuse comme indicateur [46].

Prélever à la pipette, sur l'échantillon préparé, 20ml de lait, ou peser à 1 mg près, environ 20g de lait. Dans la fiole jaugée de 200ml, introduire successivement la prise d'essai :

- 2ml de solution d'hexacyanoferrate de potassium Agiter.
- 2ml de solution d'acétate de zinc, Agiter. Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée tout en mélangeant. Ajouter alors à la pipette 2ml d'eau distillée (pour tenir compte du volume du précipité). Agiter. Laisser reposer 10 à 15 minutes et filtrer.
- Dans la fiole conique, introduire :
 - 10ml du filtrat obtenue après défécation, exactement mesuré.
 - 10ml d'eau distillée.
 - 20ml de solution cuivrique.
 - 20ml de solution tartro-alcaline.

Porter le mélange à ébullition modérée et maintenir celle-ci pendant exactement 3 minutes. Refroidir ensuite immédiatement le contenu de la fiole sous un courant d'eau froide et laisser déposer le précipité d'oxyde cuivreux formé. Le liquide surnageant doit demeurer de couleur bleue. Dans le cas contraire, recommencer la détermination sur une dilution appropriée [46].

Verser le liquide surnageant sur un filtre en amiante ou en verre fritté en activant la filtration par aspiration. Il faut éviter d'entraîner le précipité avec le filtrat et de le laisser au contact de l'air [46].

Laver trois fois le précipité d'oxyde cuivreux avec 20ml d'eau distillée bouillie froide, décanté et filtrer à chaque fois le liquide sur le filtre. Rejeter ce filtrat. Dissoudre ensuite le précipité par une quantité suffisante de solution ferrique (20 à 30ml). Filtrer la solution obtenue sur le même filtre en ayant soin de dissoudre complètement tout le précipité et de recueillir le filtrat dans la fiole conique à filtrer propre. Rincer la fiole et le filtre avec trois fois 20ml d'eau distillée bouillie froide. Titrer par la solution de permanganate de potassium [46].

Le virage est obtenu lorsque la couleur passe du vert pâle au rose. Soit V le nombre de millilitres de solution de permanganate de potassium nécessaires [46].

1 ml de KMnO_4 correspond à 6,35 mg de cuivre dans la prise d'essai. Les tables de G.BERTRAND donnent en fonction de KMnO_4 , le lactose exprimé en lactose hydraté contenue dans la prise d'essai (**voir tableau dans l'annexe**)

2.4. Analyse des profils protéique par Electrophorèse monodimensionnelle

2.4.1. Principe

Les techniques électrophorétiques sont basées sur le principe de la mobilité différentielle des molécules protéiques dans un support soumis à un courant électrique. Cette mobilité est en fonction de la charge électrique, de la dimension et la forme des protéines, de l'intensité du champ électrique, la température de l'électrolyte [47].

2.4.2. Extraction des protéines

L'extraction des protéines a été réalisée dans des conditions dénaturantes et réductrices à partir de lait de vache, chamelle, chèvre et lait reconstitué avant et après fermentation avec les grains de Kéfir et sur le lait total et après centrifugation à 10000 t/min pendant 10 min [47].

50 μl du lait frais et fermenté, total et centrifugé (culot et surnageant) sont mélangés avec 100 μl de solution d'extraction contenant 35% (V/V) de glycérol, 22% (V/V) de tris/HCl 1M pH 6.8, 43% (V/V) d'eau distillé, 7% (P/V) de SDS et quelques grains de bleu de bromophénol, 2.5% (V/V) de β -mercaptoéthanol sont rajoutés au mélange pour réduire les protéines du lait. Après agitation au vortex puis une agitation à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 15 minutes à une température ambiante ; les échantillons sont incubés à 65°C pendant 30 minutes puis

centrifugés à 10000 T/ min pendant 30 secondes. Les surnageant contenant les protéines du lait dissociés et réduites sont récupérés [47].

2.4.3. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide

La technique d'électrophores utilisée est celle décrite par [48], modifiée par [49]. La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu, en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) [47].

Les ponts disulfures sont rompus par l'action du β mercaptoéthanol et les liaisons faible sont détruites par le SDS, ceci abouti à la formation d'un complexe SDS- protéine dénaturée, le SDS a pour but de masquer la charge des protéines par une charge négative, il annule ainsi le fractionnement en fonction de la charge électrique, et assure donc une séparation selon la taille, la conformation et la masse moléculaire [47].

2.4.3.1. Préparation des gels

La technique SDS-PAGE nécessite la préparation de deux types de gels : un gel de séparation à T=12.8 % et un gel de concentration à T=2.8 %. Ces deux gels sont préparés à base d'acrylamide à 40% (p/v), de N, N'-méthylène bis-acrylamide à 2 % (p/v), du SDS à 10% (p/v) et de Tris-HCl 1M, tamponnés à pH 8.8 pour le gel de séparation, et à pH 6.8 pour le gel de concentration. Ces deux gels sont polymérisés en présence de catalyseurs, le TEMED et de l'APS [47].

Le gel de séparation (separating gel) permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire, alors que le gel de concentration (stacking gel) permet de stocker les impuretés et de tasser les protéines avant leur entrée dans le gel de séparation [47].

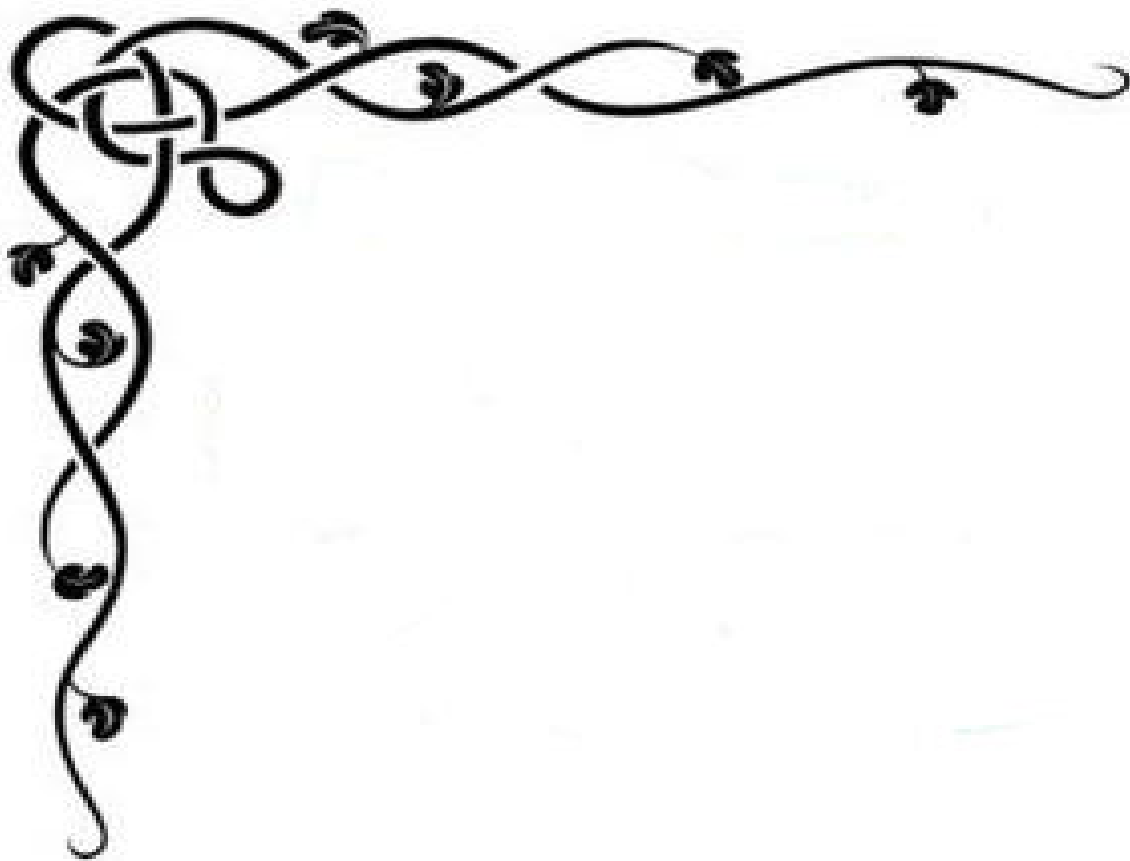
On prépare le gel de séparation en premier puis on le coule entre deux plaques de verre verticales, en laissant un vide d'environ 4 cm pour le gel de concentration, à fin de niveler la surface du gel de séparation et de le protéger de l'air, on ajoute une fine couche de butanol. La polymérisation s'effectue à une température ambiante pendant environ 45 minutes. Ensuite, le gel de concentration est préparé, bien mélangé puis coulé au dessus du gel de séparation après avoir éliminé la couche de butanol, puis des peignes à 15 puits sont délicatement insérés. Le gel de concentration prend en l'espace de 20 à 40 min, les peignes sont retirées soigneusement pour ne pas détruire les puits formés, on verse le tampon de migration dans les puits puis on procède au dépôt des échantillons à raison de 8 μ l [47].

2.4.3.2. La migration

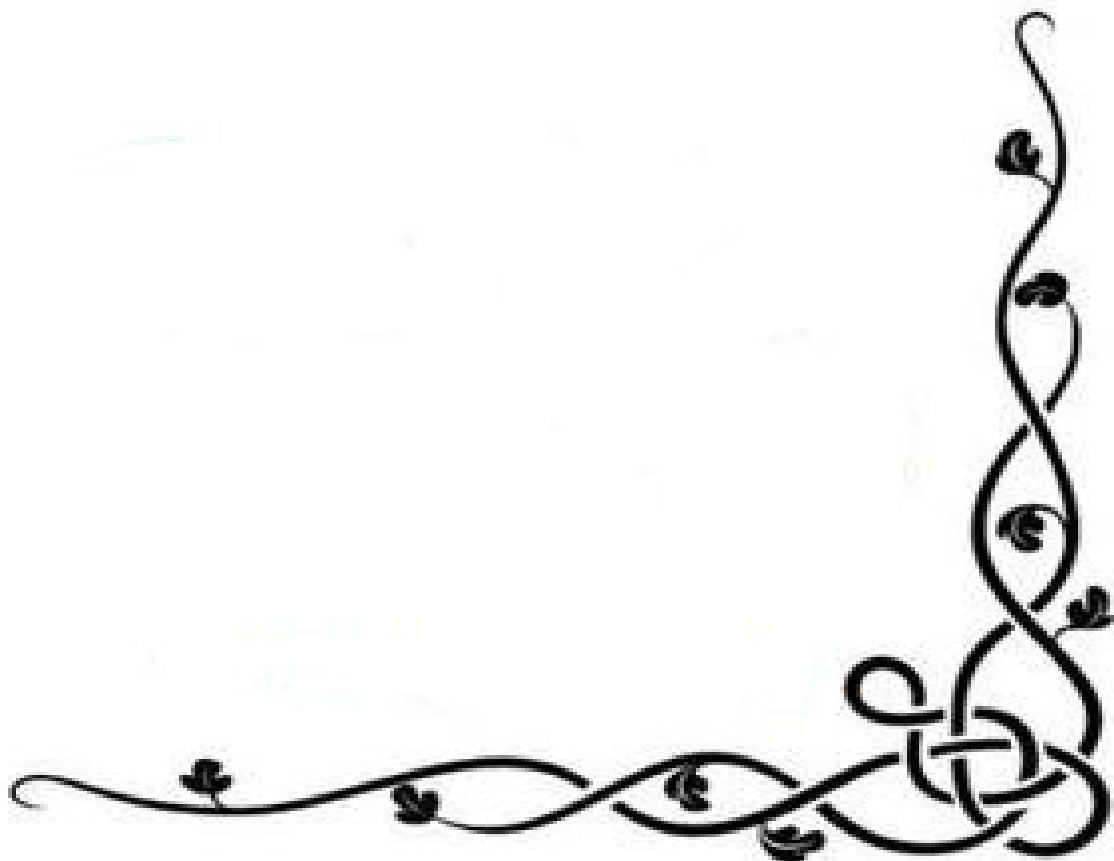
Le bac supérieur qui porte les deux plaque est rempli de tampon de migration à un niveau qui dépasse celui des gels, on le place dans la cuve d'électrophorèse ou le bac inférieur, rempli au paravent de solution de tampon de tel sorte que les faces inférieures des gels soient immergés. La cuve d'électrophorèse est maintenue à une température constante à 4°C grâce à un système de refroidissement. Le gel est soumis à une intensité constante de 20.7 mA, et une tension variable ne dépassant jamais le maximale de 50 v dans des conditions de nuit. Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode et sont séparées selon leur encombrement moléculaire [47].

2.4.3.3. Coloration et décoloration des gels

Les gels sont recouverts de solution de coloration contenant un fixateur de protéines le TCA à 60% et le bleu de Coomassie R250 à 1% (p/v), ils sont placés en agitation pendant 24h. Les gels sont ensuite décolorés par l'eau du robinet [47].



Résultats et Discussion



1. Paramètres physico-chimiques

Les résultats des paramètres physico-chimiques des différents laits frais et fermentés sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Caractérisation physico-chimiques des échantillons de lait de vache, chèvre, chamelle, et lait reconstitué frais et fermentés

Les échantillons	pH	Acidité (°D)
Chèvre F	6.04	16
Chèvre 24 h	3.96	87
Chèvre 48 h	3.34	119
Chèvre 72 h	3.17	157
Chamelle F	5.23	25
Chamelle 24h	3.58	109
Chamelle 48h	3.06	129
Chamelle 72h	2.91	174
Vache F	5.96	15
Vache 24h	4.44	67
Vache 48h	3.76	117
Vache 72h	3.45	117
Lait reconstitué F	6.12	12
Lait reconstitué 24h	3.45	107
Lait reconstitué 48h	3.02	122
Lait reconstitué 72h	2.83	155

F : frais

1.1. pH

La variation des valeurs du pH est due à l'origine du lait analysé mais aussi probablement au stade de lactation et au type d'alimentation [50]. La valeur du pH du lait de chamelle collecté est égale à (5.23), il serait légèrement plus acide que les laits de vache, chèvre et le lait reconstitué qui ont des pH respectifs égaux à (5.96), (6.04), (6.12) (Tableau 4).

Le pH du lait fermenté est en diminution successive en fonction de la durée de fermentation (24h, 48h et 72h). Le lait de chamelle et de sachet après fermentation sont plus acides que le lait de chèvre et de vache (figure 3).

Cela s'explique par l'augmentation du taux des ions (H⁺) qui résultent de la fermentation lactique d'une part et alcoolique d'autres part ; induites par les bactéries et les levures qui se trouvent dans les grains de kéfir.

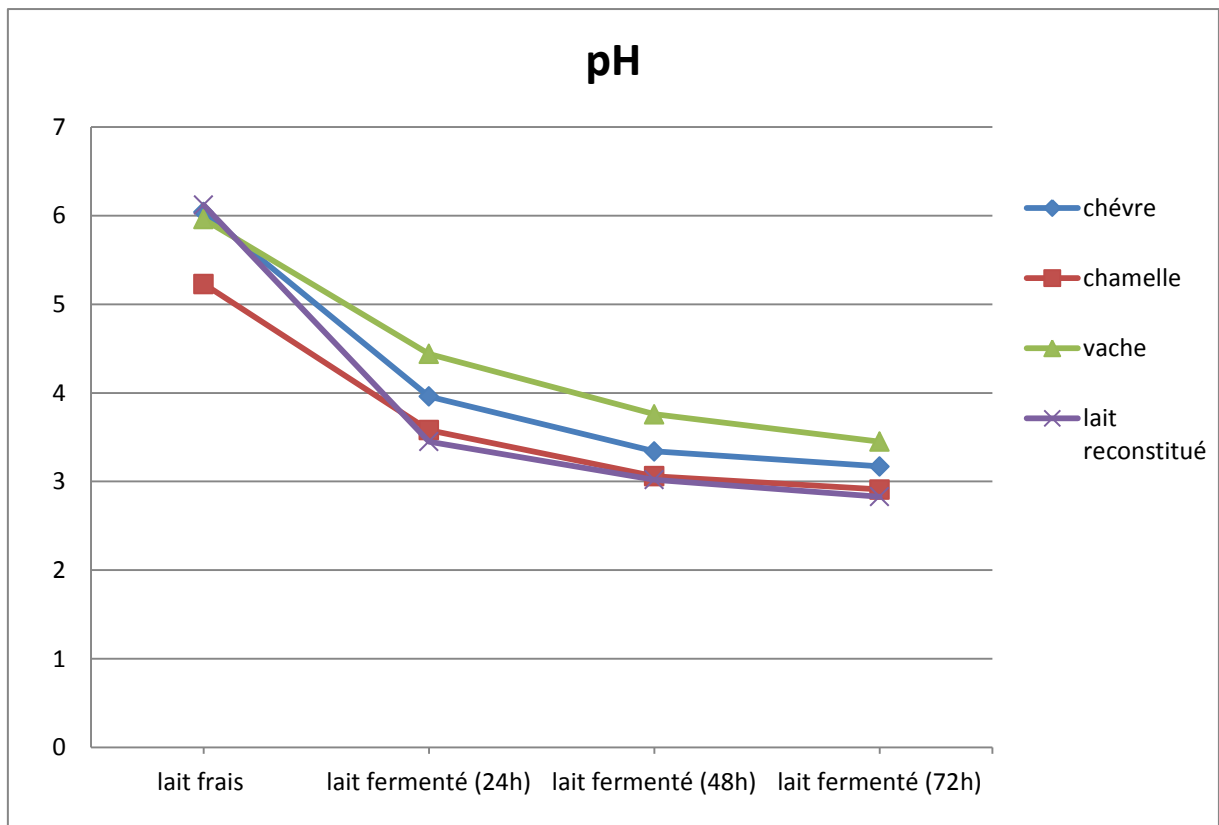


Figure3 : variation du pH des différents laits (chèvre, chamelle, vache et lait reconstitué) en fonction de leurs durées de fermentation.

1.2. Acidité titrable

Les variations dans la valeur d'acidité sont généralement dues à la variation de l'alimentation des animaux, aux conditions environnementales ainsi qu'à la période de lactation [51]. Les échantillons du lait de vache analysés (tableau 4) présentent une acidité titrable de l'ordre de 15 °D autant que les échantillons des laits de chèvre et lait reconstitué présentent des valeurs respectivement égales à 16 °D et à 12°D alors que le lait de chamelle présente une acidité très élevée par rapport aux autres et qui égale à 25 °D (tableau 4). L'acidité a montré une augmentation significative après la fermentation des différents laits.

Aussi, il a été remarqué que l'aspect physique des différents laits change en fonction de la durée de fermentation (figure 4).

Après 24h de fermentation, on obtient un lait de vache caillé ; alors que le lait de chèvre, de chamelle, et le lait reconstitué ont une consistance ferme. Après 48h et 72h de fermentation, tous les échantillons ; le lait de vache, de chèvre, de chamelle, et le lait reconstitué ont une consistance ferme.

L'augmentation de l'acidité des différents échantillons s'explique par la présence des bactéries qui se trouvent aux grains de kéfir. Ces bactéries utilisent le lactose en le transformant en acide lactique; et pour cela l'acidité du lait fermenté s'accroît et devient supérieure à la valeur observée dans le lait frais.

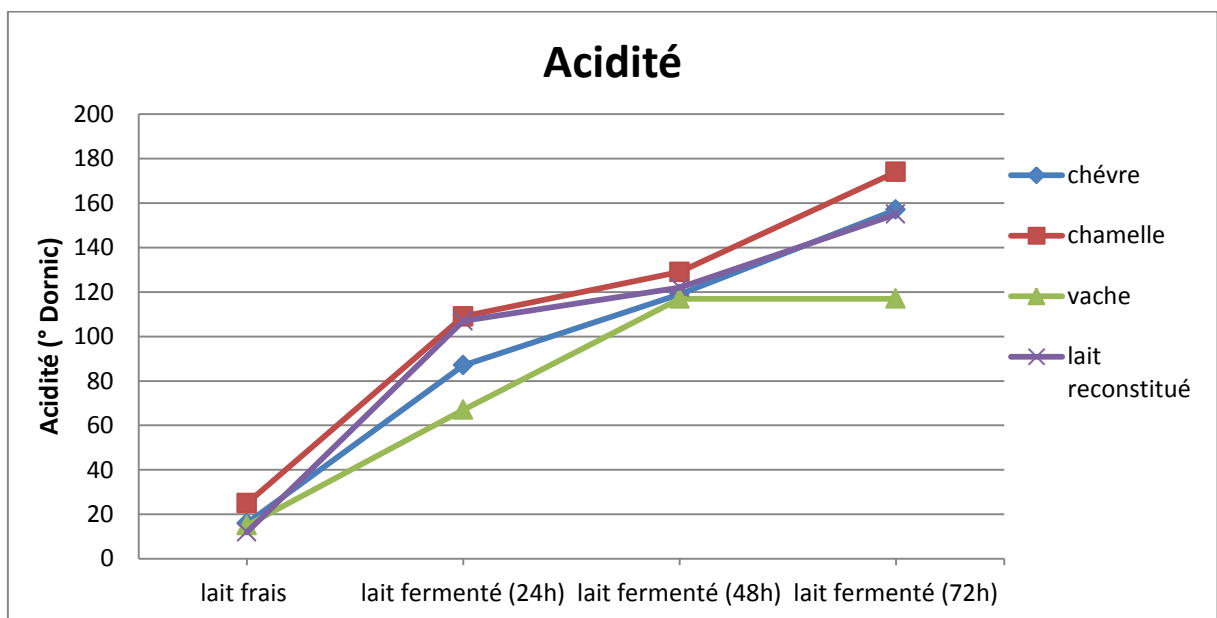


Figure 4 : variation de l'acidité des différents laits (vache, chèvre, chamelle et lait reconstitué) en fonction de leurs durées de fermentation.

2. Composition biochimique

Les résultats des compositions biochimiques des échantillons du lait frais et fermentés sont donnés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Paramètres biochimiques des échantillons de lait de vache, chèvre, chamelle, et lait reconstitué frais et fermentés.

Les échantillons	Matière grasse (g/l)	Matière sèche (%)	Humidité (%)	Lactose hydraté (g/l)
Chèvre F	62	14.87	85.12	26.1
Chèvre 24 h	60	14.58	85.42	17.6
Chèvre 48 h	60	13.26	86.73	7.6
Chèvre 72 h	59	7.62	92.38	2.3
Chamelle F	39	12.84	87.15	25.6
Chamelle 24h	28	9.64	90.36	22.8
Chamelle 48h	25	9.08	90.92	9.9
Chamelle 72h	22	8.46	91.54	2.8
Vache F	41	13.51	86.48	33.5
Vache 24h	19	6.78	93.22	13.3
Vache 48h	17	6.73	93.26	2.3
Vache 72h	10	5.53	94.47	0.9
Lait reconstitué F	15	9.34	90.65	15.7
lait reconstitué 24h	15	8.37	92.1	15.2
Lait reconstitué 48h	14	7.90	91.62	14.7
Lait reconstitué 72h	12	7.39	92.61	13.8

F : frais

2.1. Teneur en matière grasse

Ils ont estimé que d'autres facteurs comme la saison, le stade de lactation et le nombre de mises bas sont susceptibles d'interférer sur les taux obtenus [54]. La teneur moyenne en matière grasse du lait de vache analysé est égale à (41g). Elle semble légèrement plus faible que celle du lait de chèvre (62g) mais plus forte que celles du lait de chamelle et du lait reconstitué (39g et 15g respectivement) (Tableau 5).

La teneur en matière grasse diminue au cours de la fermentation jusqu'à ce qu'elle atteigne des valeurs très basses après 72h, on observe une diminution significative de la matière grasse dans le lait de vache contrairement aux autres types de laits qui ont marqué une faible diminution (Figure 5).

La diminution de la matière grasse peut être due à la sécrétion des enzymes lipolytiques par les bactéries et les levures des grains de kéfir, et qui hydrolysent les lipides et en particulier les triglycérides en acides gras et en glycérol.

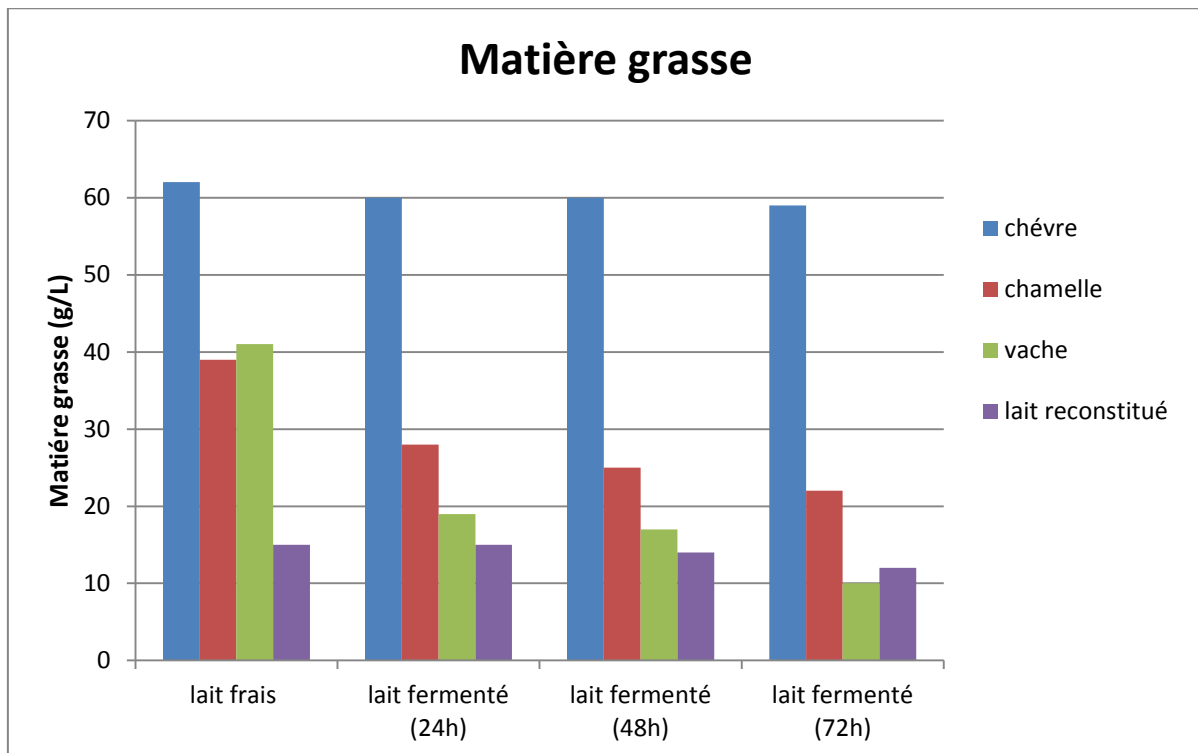


Figure 5 : variation du taux de la matière grasse des différents échantillons (lait de vache, chèvre, chamelle et le lait reconstitué) en fonction de leur durée de fermentation.

2.2. Taux de matière sèche totale

La teneur en matière sèche du lait varie en fonction du stade de lactation [52]. Ainsi, elle diminue suite à la diminution du taux de matière grasse et azotée [53]. Le taux en matière sèche totale de l'échantillon du lait de vache analysé est égal à (13.51 %). Celle-ci semble plus faible par rapport à celle du lait de chèvre (14.87 %). Mais elle est supérieure à celle du lait de chamelle (12.84%) et du lait reconstitué (9.34%) (Tableau 5).

Le taux de la matière sèche diminue au fur et à mesure que la fermentation se déroule, cela pourra être expliqué par la diminution de la matière grasse, le lactose et la matière azotée (figure 6).

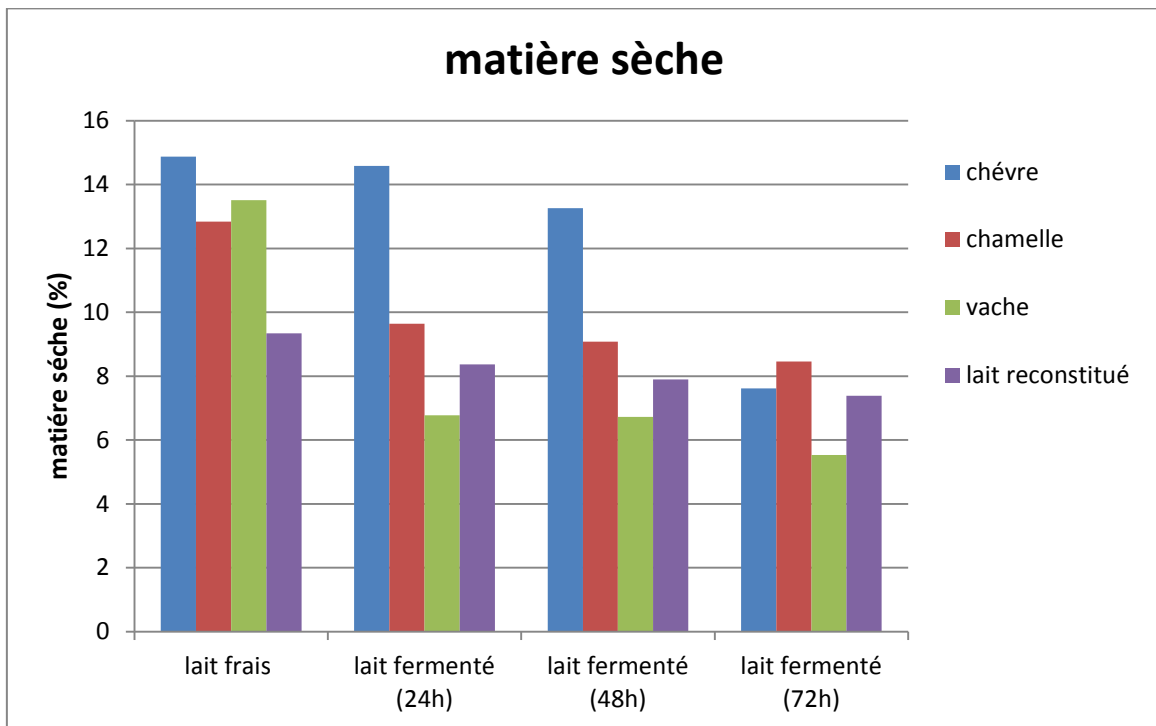


Figure 6 : variation du taux de la matière sèche des différents échantillons (lait de vache, chèvre, chamelle et le lait reconstitué) en fonction de leur durée de fermentation.

2.3. Teneur en lactose

La teneur moyenne en lactose du lait de vache analysé est égale à (33.5 g/l). Elle est supérieure à celle du lait de chèvre, chamelle, et lait reconstitué qui présentent des valeurs respectivement égales à (26.1 g/l), (25.6 g/l) et (15.7 g/l) (Tableau 5).

Le taux du lactose diminue au cours de la fermentation jusqu'à ce qu'il touche des valeurs presque nulles dans le lait de vache, chèvre et chamelle contrairement au lait reconstitué qui garde la même teneur en lactose (figure 7).

On explique cela par la présence d'une enzyme qui est la β -galactosidase sécrétée par les bactéries qui se trouvent dans les grains de kéfir et qui hydrolyse le lactose en oses simples. Sa présence pourrait expliquer le fait que le kéfir est consommé sans problème par les personnes intolérantes au lactose.

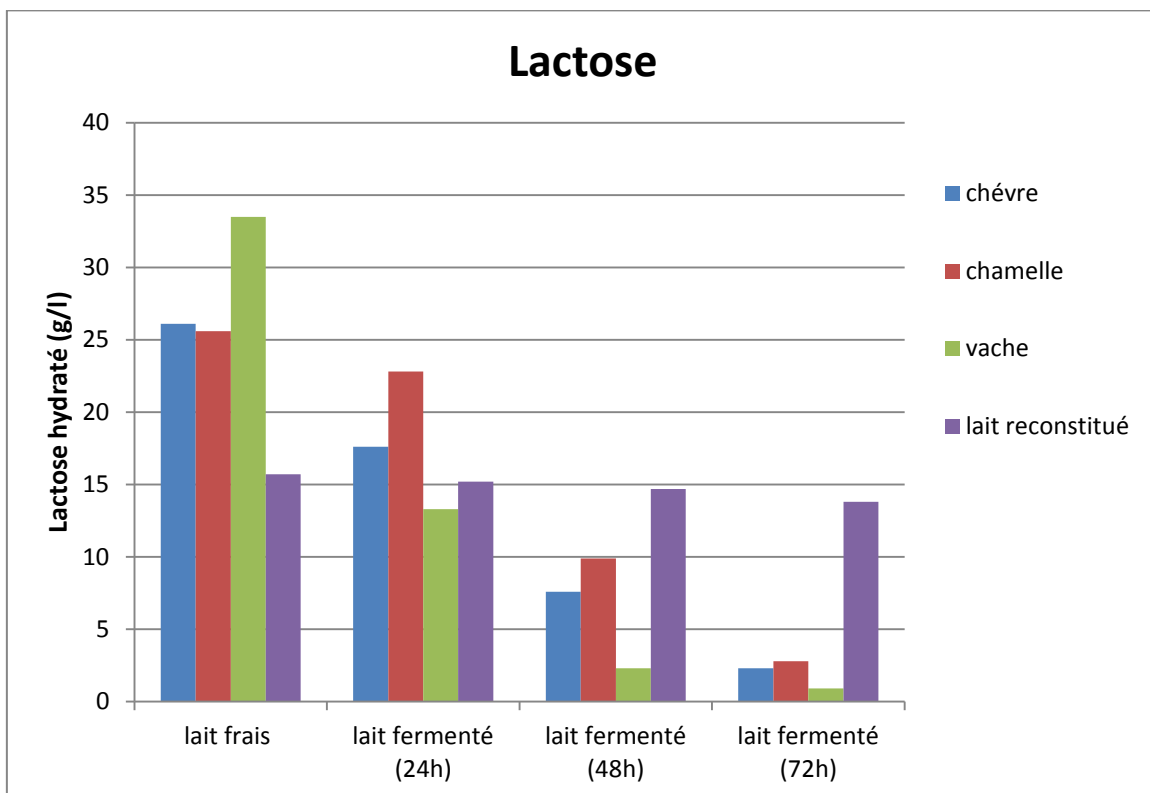


Figure 7 : variation du taux du lactose des différents échantillons (lait de vache, chèvre, chamelle et le lait reconstitué) en fonction de leur durée de fermentation.

3. Fractionnement des protéines

3.1. Analyse des profils électrophorétiques

La lecture des diagrammes consiste à révéler la mobilité de chacune des bandes protéiques en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation.

3.1.1 Analyse des protéines dénaturées et réduites

Les diagrammes électrophorétiques des 16 échantillons du lait frais et fermenté analysés renferment 38 bandes décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines du lait de haut et de faible poids moléculaire avec des mobilités allant de 13 à 210 mm (Figures 8, 9, 10 et 11).

Nous avons identifié 38 bandes protéiques réparties comme suit : 19 bandes protéiques dans la zone 1 des protéines de HPM et 19 bandes protéiques dans la zone 2 des protéines de FPM.

L'observation du profil électrophorétique de l'ensemble des protéines du lait frais et fermenté, révèle des variations dans la composition protéique. En effet les différences résident

dans les deux zones contenant les bandes B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B19 et les bandes B20, B21, B24, B25, B27, B28, B29, B30, B31, B32, B33, B34, B35, B36 respectivement, qui sont les plus variables qualitativement et quantitativement. La variation de ces dernières est représentée dans les tableaux 6 et 7.

Des différences sont observées entre les types de lait utilisés (vache, chèvre, chamelle et lait reconstitué) mais aussi dans la composition protéique des différents laits avant et après leurs fermentations aux grains de kéfir.

Nous constatons que les bandes B4 (vache), B12 (chèvre), apparaissent après 24h de fermentation, tandis que la bande B9 (vache) apparait après 48h de fermentation (Figures 8 et 9 et tableau 6).

Nous remarquons aussi la disparition de certaines bandes protéiques à titre d'exemple les bandes B7 (chèvre) et B4 (vache) disparaissent après 24h et 48h de fermentation respectivement. Alors que les bandes B1, B3, B4, B5, B8, B13, B26 (vache), et B5, B8, B10, B14, B16, B35 (chèvre), disparaissent après 72h de fermentation (Figures 8 et 9 et tableau 6)

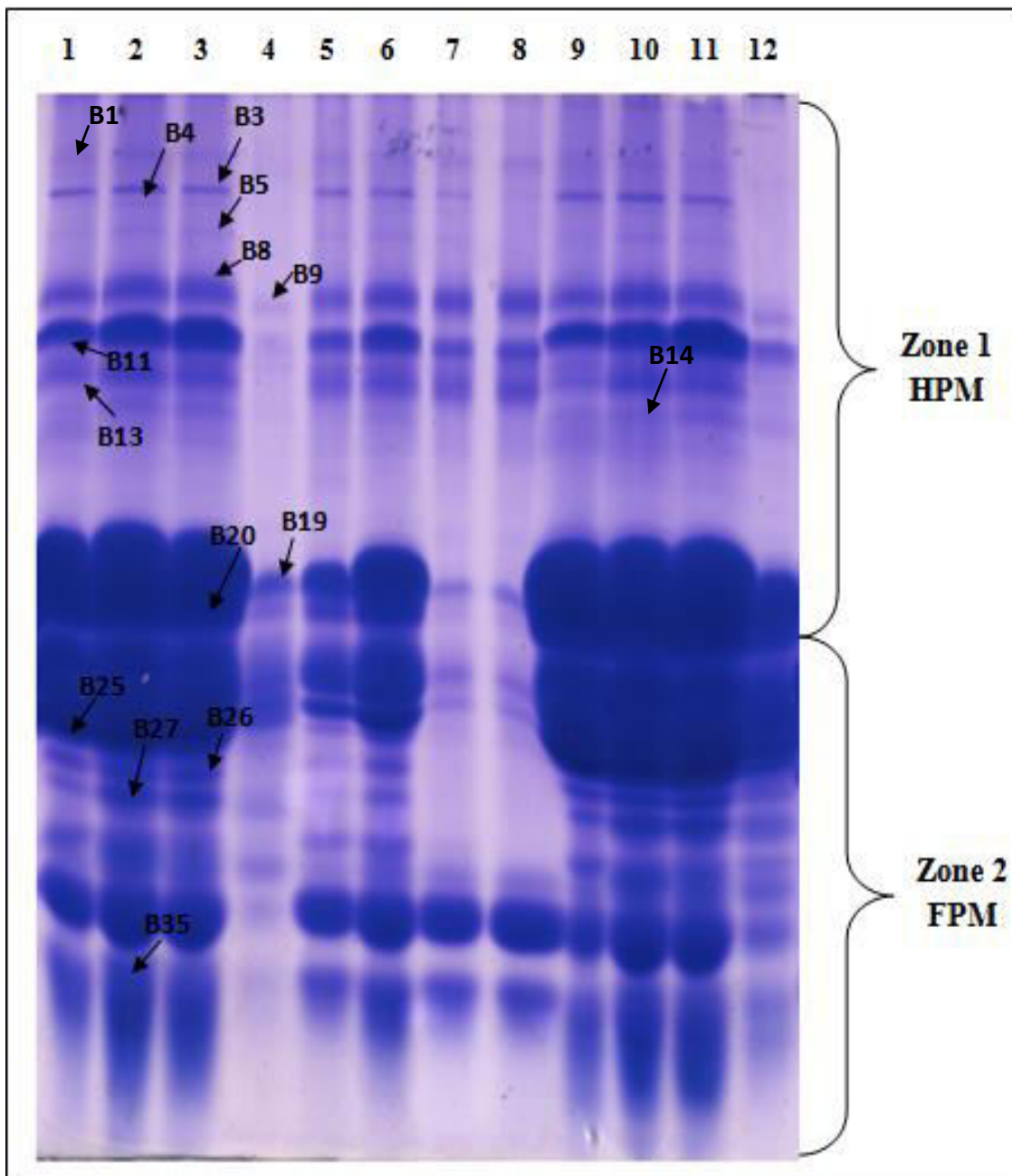


Figure 8 : profils électrophorétiques des protéines du lait de vache dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS-PAGE. 1 : V0T, 2 : V24T, 3 : V48T, 4 : V72T, 5 : V0S, 6 : V24S, 7 : V48S, 8 : V72S, 9 : V0C, 10 : V24C, 11 : V48C, 12 : V72C. (V : vache).

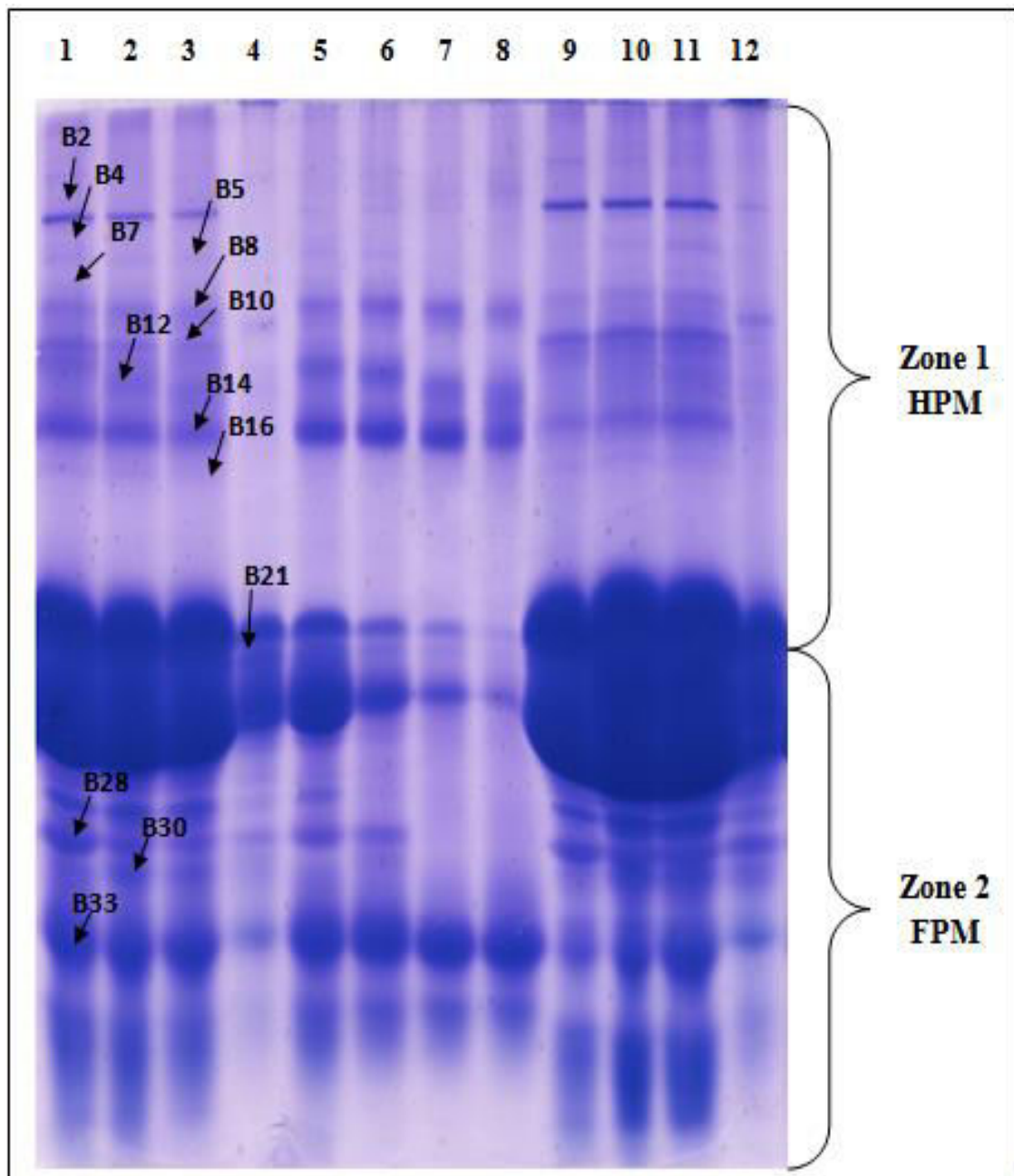


Figure 9 : profils électrophorétiques des protéines du lait de chèvre dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS- PAGE. 1 : RE0T, 2 : RE24T, 3 : RE48T, 4 : RE72T, 5 : RE0S, 6 : RE24S, 7 : RE48S, 8 : RE72S, 9 : RE0C, 10 : RE24C, 11 : RE48C, 12 : RE72C. (RE : chèvre).

Tableau 6 : Variation des bandes protéiques présentent dans le lait de vache et chèvre avant et après fermentation.

bandes	Vache				Chèvre			
	0h	24h	48h	72h	0h	24h	48h	72h
B1	P(traces)	P(++)	P(+)	A(0)	P(+)	P(traces)	P(traces)	P(traces)
B2	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(traces)	P(traces)	A(0)	A(0)
B3	P(+)	P(++)	P(+)	A(0)	P(++)	P(+)	P(+)	A(0)
B4	A(0)	P(traces)	P(traces)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B5	P(traces)	P(+)	P(traces)	A(0)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	A(0)
B6	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B7	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(traces)	P(traces)	A(0)	A(0)
B8	P(+)	P(++)	P(++)	A(0)	P(+)	P(+)	P(+)	A(0)
B9	A(0)	A(0)	A(0)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	P(traces)
B10	P(+)	P(++)	P(++)	P(traces)	P(++)	P(+)	P(+)	A(0)
B11	P(+)	P(++)	P(++)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	P(traces)
B12	P(traces)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	A(0)	P(+)	P(+)	P(traces)
B13	P(+)	P(++)	P(++)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B14	P(traces)	P(+)	P(+)	P(traces)	P(++)	P(traces)	P(traces)	A(0)
B15	P(traces)	P(traces)	P(traces)	A(0)	P(++)	P(++)	P(+)	A(0)
B16	P(traces)	A(0)	A(0)	A(0)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	A(0)
B17	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B18	P(traces)	P(+)	P(traces)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B19	P(+++)	P(++)	P(++)	P(+)	P(+++)	P(++)	P(++)	P(traces)
B20	P(++)	P(+++)	P(+++)	P(+)	P(+++)	P(++)	P(++)	P(+)
B21	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(++)	P(+)	P(+)	P(+)
B25	P(++)	P(+)	P(+)	P(traces)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B26	P(+)	P(++)	P(++)	A(0)	P(+)	P(++)	P(++)	P(traces)
B27	P(+)	P(++)	P(++)	P(+)	P(+)	P(++)	P(++)	P(traces)
B28	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+++)	P(++)	P(++)	P(+)
B29	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B30	P(+)	P(++)	P(++)	A(0)	P(traces)	P(++)	P(+)	P(traces)
B33	P(+)	P(++)	P(++)	P(traces)	P(+++)	P(++)	P(++)	P(+)
B34	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B35	P(+)	P(++)	P(++)	P(traces)	P(+)	P(++)	P(+)	A(0)
B36	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)

Concernant les variations quantitatives, nous constatons que dans le lait de vache les bandes B19 et B25 sont les bandes les plus concentrées avant la fermentation du lait tandis que les bandes B8, B11, B13, B20, B27 et B35 sont les bandes les plus concentrées après sa fermentation (figure 8).

Dans le lait de chèvre les bandes B14, B19, B20, B28 et B33 sont les bandes les plus concentrées avant fermentation, alors que les bandes B19, B20, B26, B27, B28, B30 sont les bandes les plus concentrées après sa fermentation (figure 9).

En revanche, la comparaison entre les échantillons du lait de chamelle et le lait reconstitué montre que les bandes B9 et B13 (lait reconstitué) apparaissent après 24h de fermentation, tandis que la bande B25 (lait reconstitué) apparaît après 48h (figure 11 et tableau 7).

Nous remarquons aussi la disparition de la bande protéique B33 (chamelle) après 24h de fermentation (figure 10 et tableau 7).

Concernant les variations quantitatives, nous constatons que dans le lait de chamelle les bandes B4, B9, B31 et B36 sont les bandes les plus concentrées avant la fermentation alors que les bandes B10, B20 et B34 sont les bandes les plus concentrées après fermentation (figure 10 et tableau 7).

Concernant le lait reconstitué les bandes B8, B19, B24 et les bandes B9, B10, B33 sont les bandes les plus concentrées avant et après fermentation respectivement (figure 11 et tableau 7).

Ces bandes sont considérées comme étant les bandes les plus variables quantitativement et qualitativement, elles sont fortement concentrées chez certains échantillons, avec une concentration modérée chez d'autres. Elles se trouvent également à l'état de traces chez certains échantillons et absentes chez d'autres (tableaux 6 et 7).

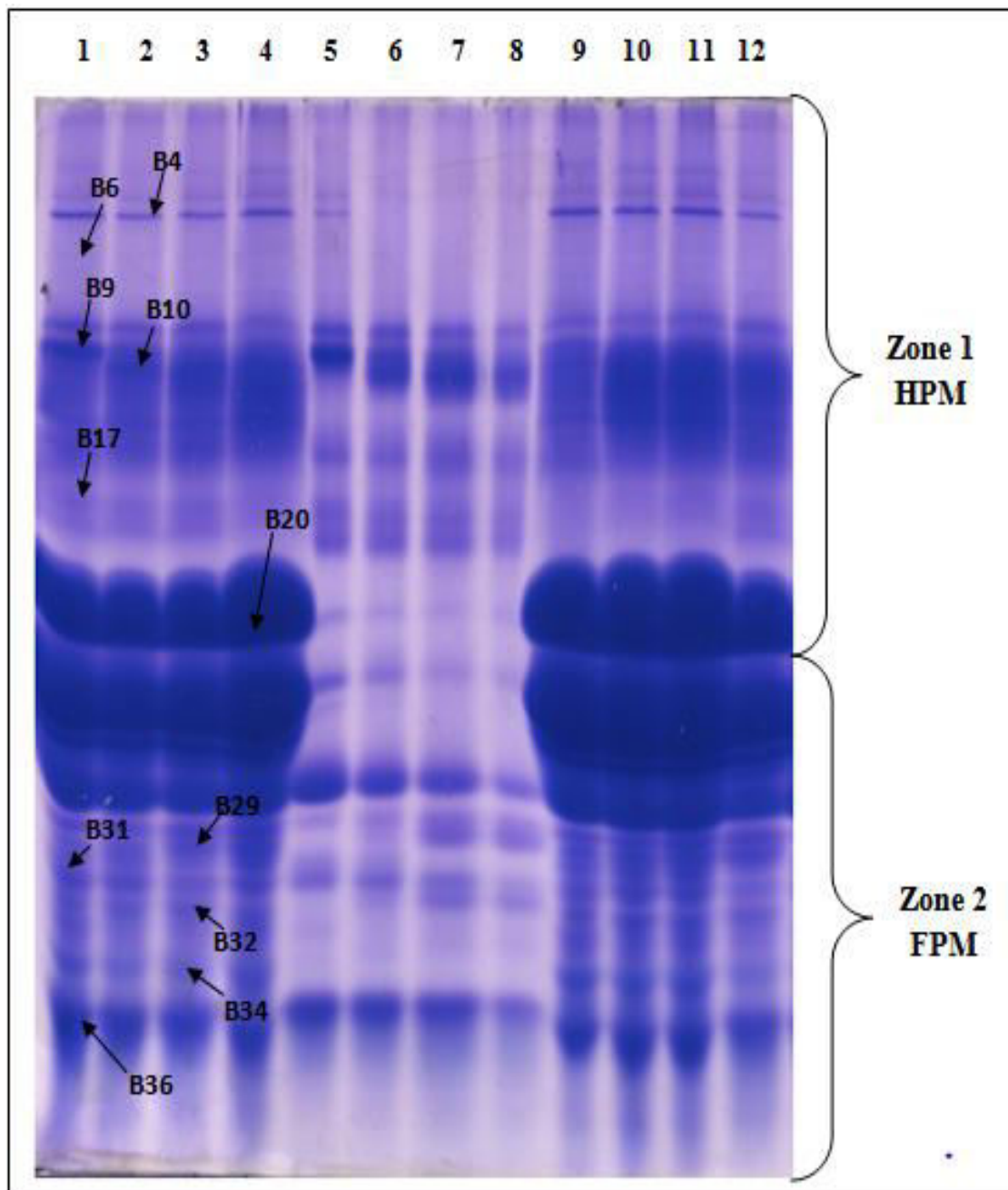


Figure 10 : profils électrophorétiques des protéines du lait de chamelle dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS-PAGE. 1 : CH0T, 2 : CH24T, 3 : CH48T, 4 : CH72T, 5 : CH0S, 6 : CH24S, 7 : CH48S, 8 : CH72S, 9 : CH0C, 10 : CH24C, 11 : CH48C, 12 : CH72C. (CH: chamelle)

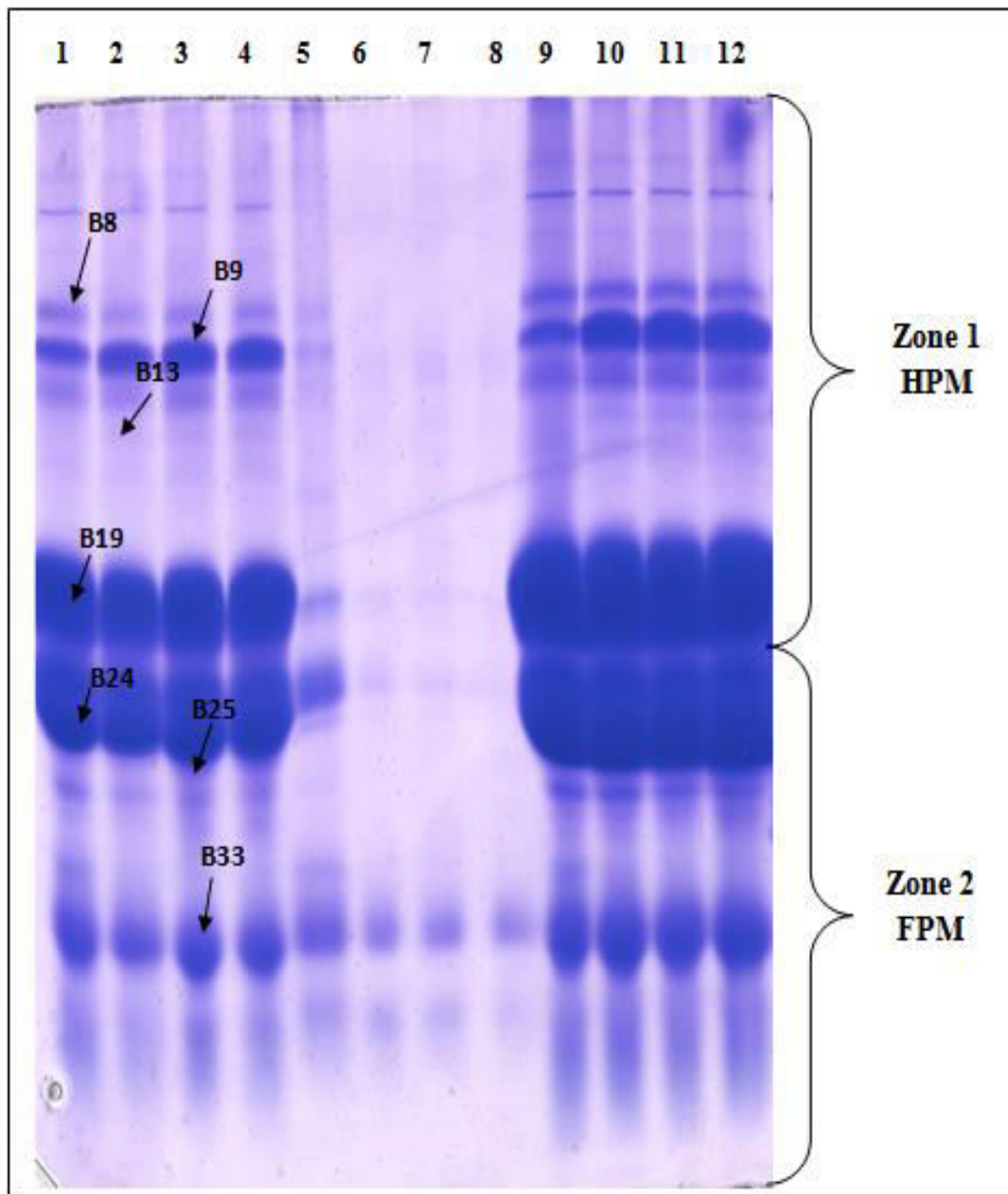


Figure 11 : profils électrophorétiques des protéines du lait reconstitué dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS- PAGE. 1 : L0T, 2 : L24T, 3 : L48T, 4 : L72T, 5 : L0S, 6 : L24S, 7 : L48S, 8 : L72S, 9 : L0C, 10 : L24C, 11 : L48C, 12 : L72C. (L : lait reconstitué).

Tableau7 : Variation des bandes protéiques présent dans le lait de chamelle et lait reconstitué avant et après fermentation

Bandes	Chamelle				Lait reconstitué			
	0h	24h	48h	72h	0h	24h	48h	72h
B4	P(++)	P(+)	P(+)	P(++)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B5	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	P(traces)
B6	P(traces)	P(traces)	P(traces)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B7	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B8	P(traces)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	P(++)	P(+)	P(++)	P(++)
B9	P(++)	P(+)	P(+)	P(+)	A(0)	P(+)	P(+)	P(+)
B10	P(+)	P(++)	P(+)	P(traces)	P(++)	P(+++)	P(+++)	P(+++)
B11	P(traces)	P(+)	P(++)	P(++)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B12	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	P(traces)
B13	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(++)	P(++)
B15	P(+)	P(+)	P(+)	P(traces)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B16	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(traces)	P(traces)	P(traces)	P(traces)
B17	P(traces)	P(traces)	P(+)	P(traces)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B18	P(+)	P(+)	P(++)	P(traces)	P(++)	P(traces)	P(traces)	P(traces)
B19	P(+)	P(++)	P(++)	P(+++)	P(+++)	P(++)	P(+++)	P(+++)
B20	P(+)	P(++)	P(++)	P(+++)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B21	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B24	P(+)	P(+)	P(+)	P(+)	P(++)	P(+)	P(++)	P(++)
B25	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(traces)	P(traces)
B28	P(++)	P(+)	P(++)	P(+++)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B29	P(traces)	P(traces)	P(+)	P(+)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B31	P(++)	P(+)	P(traces)	P(++)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B32	P(traces)	P(+)	P(+)	P(+)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B33	P(traces)	A(0)	A(0)	A(0)	P(++)	P(+)	P(++)	P(++)
B34	P(+)	P(traces)	P(traces)	P(+)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
B35	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(traces)	P(++)	P(+)
B36	P(++)	P(+)	P(traces)	P(traces)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)

On peut également trouver des variabilités qualitatives en comparant la composition protéique des différents types de lait où on distingue quelques bandes protéiques qui sont présentes dans un type de lait et absentes dans un autre. À titre d'exemple les bandes B25, B13, se trouvent seulement dans le lait de vache et le lait reconstitué. Les bandes protéiques B2, B7, B21 se trouvent que dans le lait de chèvre mais absentes dans les autres types de lait. On distingue d'autres bandes protéiques spécifiques au lait de chamelle qui sont les bandes B6, B17, B29, B32, B34 et B36 (tableaux 6 et 7).

3.2. Etablissement des diagrammes type

L'analyse des diagrammes électrophorétiques montre que ces derniers présentent de nettes différences en composition protéique à la fois qualitative et quantitative pour les différents échantillons du lait frais et fermenté. Un tel ensemble de résultats peut être alors exploité en estimant le degré de différence (ou d'analogie) entre les diagrammes des échantillons considérés deux à deux. Cette représentation nous permet donc de conserver une image réelle des gels pouvant servir comme base de données pour l'analyse de l'effet des grains de kéfir sur la composition protéique du lait. Nous reportons dans les tableaux ci-dessous des diagrammes types des protéines du lait des échantillons frais et fermentés. (1 : Présence de la bande, 0 : Absence de la bande, M : mobilité, E : échantillon, h : heure.).

L'analyse de la composition protéique du culot et surnageant des différents types de lait avant et après fermentation nous a permis de distinguer que :

- Les bandes B2 est absente dans le culot des différents types du lait (tableau 4 annexe).
- Les bandes B6, B14, B38 sont absentes dans le surnageant des différents types du lait (tableau 3 annexe).

D'autres bandes protéiques se trouvent dans les deux fractions du lait (culot et surnageant) tel que les bandes B23 et B33 (tableaux 3,4 annexe).

Toutes ces différences observées dans la composition protéique des différents laits avant et après leurs fermentations aux grains de Kéfir sont considérés comme étant des différences qualitatives.

3.3. Indice de similarité des diagrammes protéiques

Pour quantifier l'analogie ou la dissemblance des diagrammes, on calcule un indice de similarité ou de dis-similarité [55]. L'indice de similarité (IRS) est calculé en rapportant l'IAS (indice de similarité absolue) au nombre total (N) des composants présents dans l'un au moins des diagrammes des échantillons comparés. L'IAS présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes entre les deux diagrammes. On considère qu'une bande n'est pas significativement différente d'une autre lorsqu'elles sont de même mobilité et/ou qu'elles ne se distinguent pas par au moins deux classes de concentration.

$$IRS = IAS/N \times 100$$

Les valeurs de l'IRS sont rassemblées dans les tableaux 11, 12 et 13.

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances et inversement, lorsque les diagrammes apparaissent très voisins.

La plupart des échantillons restent différenciables car leurs diagrammes présentent au moins une différence significative.

3.3.1. Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites cas du lait total :

Les indices de similarités ont été effectués pour les 16 échantillons. Ils sont représentés sous forme de matrice (tableau 11). Il en ressort que l'indice de similarité se situe entre 35 et 100%.

La valeur d'IRS la plus élevée de cette condition est de 100%, cette dernière se présente entre les échantillons V48 et V24, Ch72 et Ch24, L72 et L48... (Ces deux présentent des diagrammes identiques avec la même composition protéique).

Les valeurs des IRS entre les échantillons L24 et V72 (IRS= 50%), V72 et V0 (IRS= 58%), Ch0 et V0 (IRS= 57%) sont considérées comme valeurs moyennes. Des valeurs moins élevées sont observées entre les échantillons Re72, V72 (IRS= 43%), L0 et Ch0 ((IRS= 39%), L0 et Ch24 ((IRS= 36%), cela signifie que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances, donc ces échantillons présentent une composition en protéines différente qui peut être dans certains cas le résultat de l'effet des grains de kéfir.

Tableau 8 : Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites cas du lait total.

V0	V24	V48	V72	Re0	Re24	Re48	Re72	Ch0	Ch24	Ch48	Ch72	L0	L24	L48	L72	
100	92	92	58	62	71	76	38	57	54	54	54	65	70	74	74	V0
	100	100	55	62	66	70	38	62	59	59	59	59	64	68	68	V24
		100	55	62	66	70	38	62	59	59	59	59	64	68	68	V48
			100	39	43	46	43	41	37	37	37	43	50	54	54	V72
				100	93	86	46	60	57	57	57	52	57	55	55	Re0
					100	92	52	55	53	53	53	57	62	60	60	Re24
						100	56	59	56	56	56	61	67	64	64	Re48
							100	39	35	35	35	48	48	46	46	Re72
								100	96	96	96	39	44	43	43	Ch0
									100	100	100	36	41	40	40	Ch24
										100	100	36	41	40	40	Ch48
											100	36	41	40	40	Ch72
												100	85	81	81	L0
													100	95	95	L24
														100	100	L48
															100	L72

3.3.2. Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites dans le cas de surnageant :

Les indices de similarité réalisés pour les 16 échantillons sont représentés dans le tableau 12. L'indice de similarité se situe entre 0% et 94%. Les valeurs des IRS entre L'échantillon L72 et les échantillons Ch24, Ch48, Ch72 (IRS= 0%), L24 et Ch24 (IRS= 4%), L0 et L24 (IRS= 37%)... sont considérées comme valeurs faibles, cela signifie que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances, donc ces laits sujets présentent une composition en protéines très dissemblables.

Des valeurs moyennes d'indice de similarité ont été observées entre les échantillons V24 et V72 (IRS= 65%), Re0 et V0 (IRS= 55%), Re48 et V48 (IRS= 50%), Re0 et Re72 ((IRS= 46%)...

La valeur d'IRS la plus élevée de cette condition est de 94%, cette dernière se présente entre les échantillons Ch48 et Ch72. (les deux échantillons se retrouvent compatibles).

Tableau9 : Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites dans le cas de surnageant.

V0	V24	V48	V72	Re0	Re24	Re48	Re72	Ch0	Ch24	Ch48	Ch72	L0	L24	L48	L72	
100	85	91	78	55	57	46	44	46	40	37	33	56	21	25	9	V0
	100	77	65	57	53	43	41	48	37	30	31	52	24	28	8	V24
		100	86	48	55	50	48	39	33	30	27	54	23	27	9	V48
			100	43	44	50	48	38	32	33	30	48	26	25	11	V72
				100	72	54	46	48	41	38	39	41	17	21	9	Re0
					100	71	62	39	38	30	31	42	23	27	9	Re24
						100	87	32	26	27	28	41	31	37	13	Re48
							100	29	23	24	25	45	36	43	15	Re72
								100	68	56	59	36	9	4	5	Ch0
									100	85	89	25	4	4	0	Ch24
										100	94	21	4	4	0	Ch48
											100	18	4	4	0	Ch72
												100	37	44	12	L0
													100	86	22	L24
														100	28	L48
															100	L72

3.3.3. Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites cas de culot :

Les indices de similarités ont été effectués pour les 16 échantillons, l'indice de similarité se situe entre 38 et 100 %.

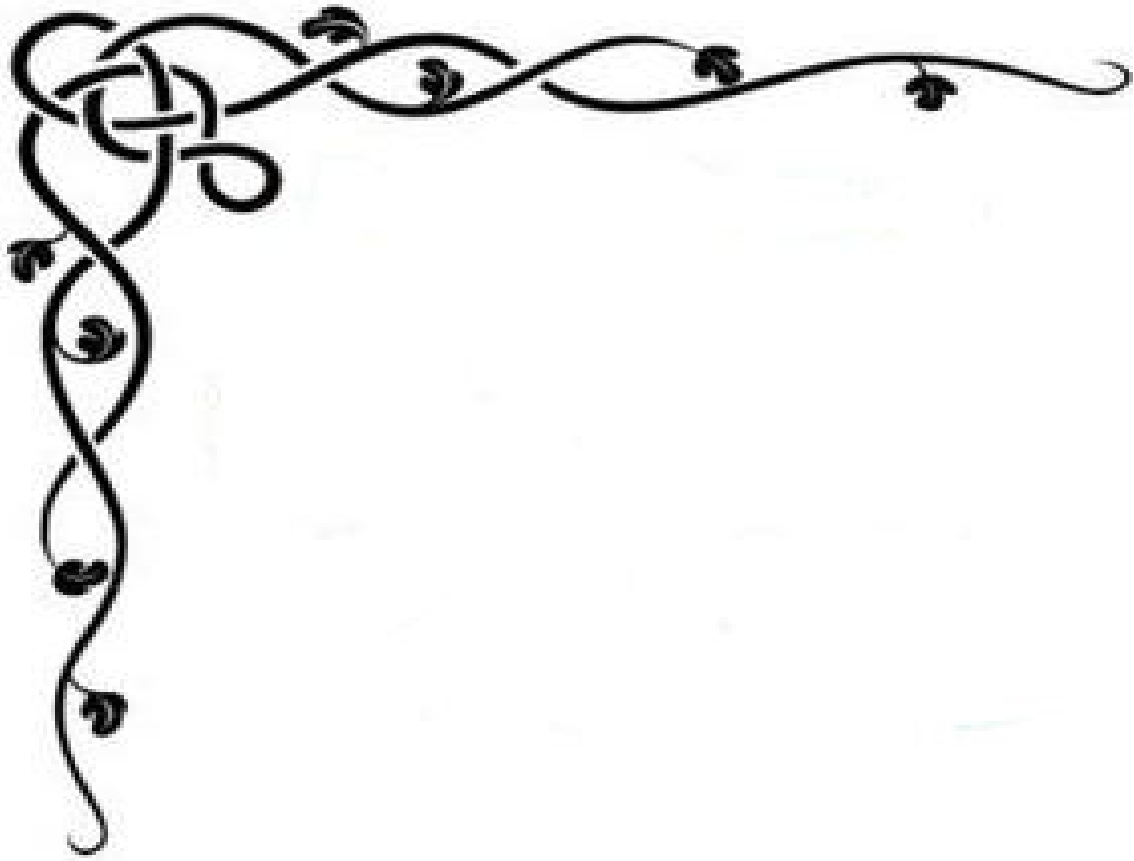
D'après le tableau 13: La valeur la plus faible est retrouvée entre l'échantillon L0 et Ch0, Ch24, Ch72 (IRS=38%), ce qui signifie que les diagrammes présentent des dissemblances. Les valeurs moyennes d'indice de similarité ont été trouvées entre les échantillons Ch0 et Re0 (IRS=55%), Ch72 et V72 (IRS=47%)...

La valeur d'IRS maximale est estimée à 100%, entre les trois échantillons V24 et V48, Ch0 et Ch24, L48 et L72.

Tableau10 : Indice de similarité des protéines du lait dénaturées et réduites dans le cas de culot.

V0	V24	V48	V72	Re0	Re24	Re48	Re72	Ch0	Ch24	Ch48	Ch72	L0	L24	L48	L72	
100	96	96	67	61	64	67	48	56	56	57	56	78	85	81	81	V0
	100	100	64	59	62	64	47	59	59	60	59	75	82	78	78	V24
		100	64	59	62	64	47	59	59	60	59	75	82	78	78	V48
			100	46	50	52	54	52	52	48	47	50	58	54	54	V72
				100	96	92	62	55	55	59	53	57	59	55	55	Re0
					100	96	67	61	61	62	59	55	62	59	59	Re24
						100	69	63	63	64	58	57	64	61	61	Re48
							100	55	55	52	45	42	44	41	41	Re72
								100	100	93	79	38	44	41	41	Ch0
									100	93	79	38	44	41	41	Ch24
										100	86	40	46	43	43	Ch48
											100	38	41	45	45	Ch72
												100	91	87	87	L0
													100	96	96	L24
														100	100	L48
															100	L72

Il existe une relation entre l'hétérogénéité électrophorétique des protéines du lait et les différentes origines du lait ainsi que leurs durées de fermentation aux grains de kéfir. Les échantillons dont les diagrammes sont très proches ont généralement une composition protéique voisine et présentent naturellement des ressemblances protéiques proches et des indices de similarités élevés témoignant de l'effet des grains de kéfir. A l'inverse, ceux dont les diagrammes sont très différents, présentent des ressemblances protéiques éloignées et des IRS faibles, témoignant également de l'effet des grains de kéfir.



Conclusion et Perspectives



Ce travail a été effectué pour étudier les paramètres physicochimiques et biochimiques des laits de différentes origines animales additionnés de grains de kéfir, et apprécier l'effet de ces derniers sur la composition protéique du lait par application de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle 'SDS-PAGE'.

Les résultats des analyses physicochimiques et biochimiques du kéfir ont montré que la composition de ce dernier dépend de la durée de fermentation et l'origine des laits utilisés, et que plusieurs composés présentent des variations très importantes.

La méthode de séparation des protéines utilisée est celle de [48], modifiée par [49]. Le choix de cette méthode était dans le but d'avoir une meilleure expression des protéines. Pour cela, la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été réalisée dans des conditions dénaturantes et réductrices. L'utilisation de ces critères pour le fractionnement des protéines du lait nous a fourni des diagrammes satisfaisants et nous a permis de :

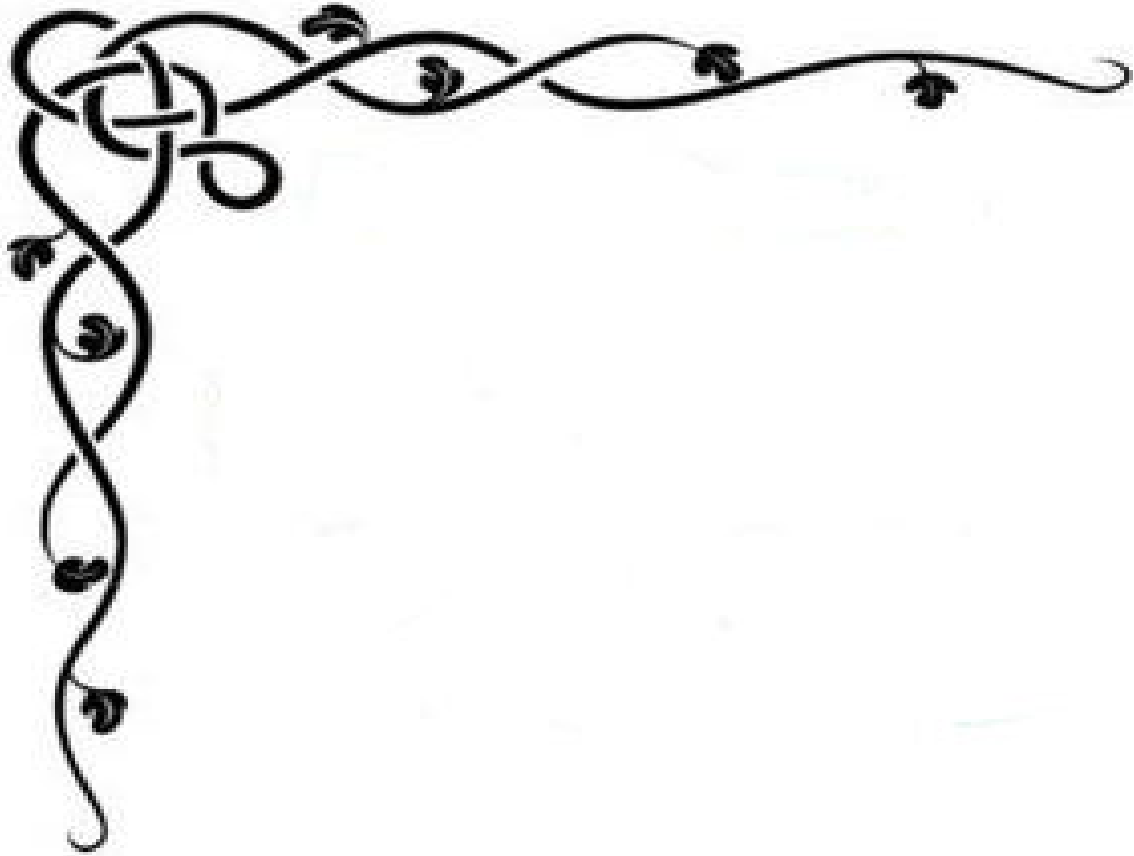
- Comparer les profils électrophorétiques des échantillons du lait frais avec ceux qui sont fermentés et de remarquer que chacun d'eux possède un profil protéique qui lui est propre est qui peut ressembler ou pas à celui d'un autre échantillon par l'apparition ou la disparition d'une ou plusieurs protéines.
- Comparer les profils électrophorétiques des échantillons de différentes origines (vache, chèvre, chamelle, et lait reconstitué) et de remarquer également que chacun d'eux possède un profil protéique qui lui est propre est qui peut ressembler ou pas à celui d'un autre échantillon par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs protéines.
- Comparer les profils électrophorétiques du culot et surnageant de chaque échantillon et d'apprécier la composition protéique de chaque fraction.
- Révéler les mobilités relatives de chacune des bandes protéiques de haut et de faible poids moléculaire.
- Dénombrer des bandes protéiques communes entre les différents échantillons.
- Distinguer les différences dans la composition protéiques des laits de différentes origines d'une part et des laits frais et fermentés d'autre part.

En outre, l'analyse statistique effectuée en calculant l'indice de similarité, a permis d'apprécier numériquement la diversité des protéines du lait dans les conditions dénaturantes et réductrices.

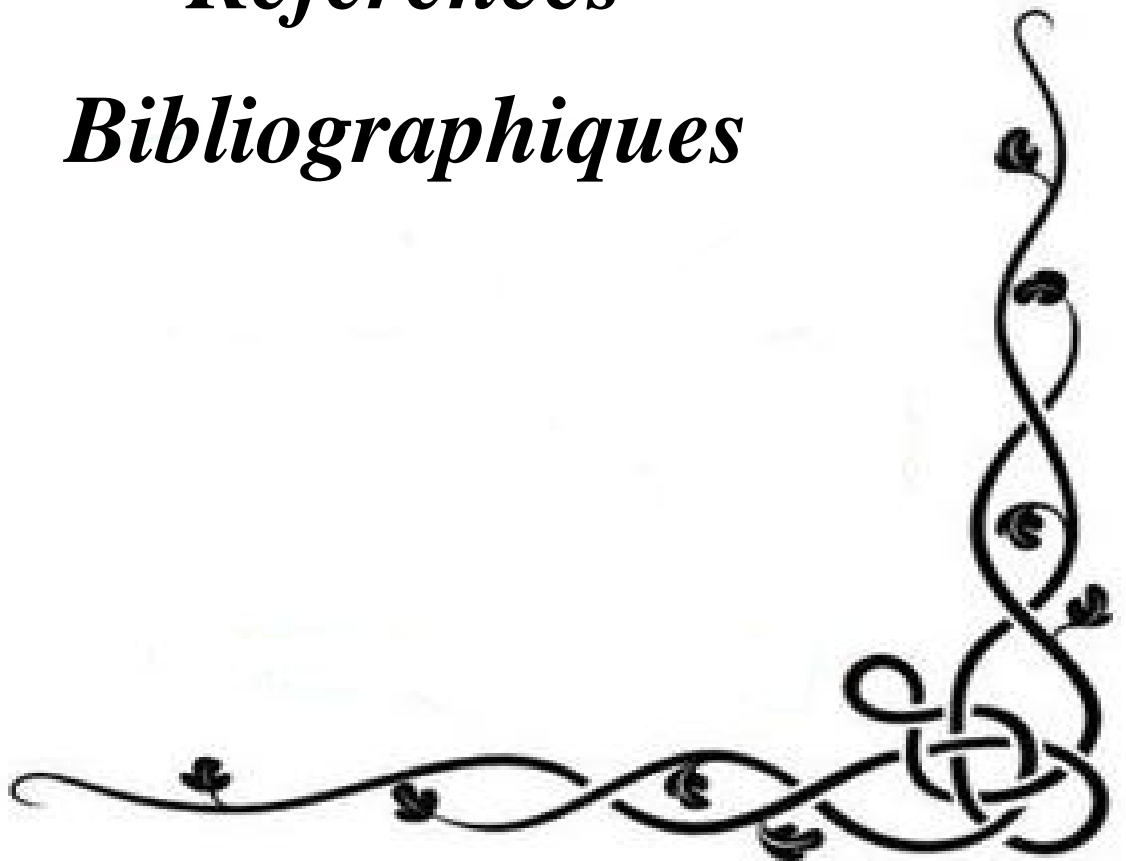
L'analyse des gels a permis de déceler 38 bandes protéiques de mobilités différentes (19 bandes protéiques de HPM et 19 bandes protéiques de FPM). Une nette différence est observée entre le profil des échantillons frais et ceux qui sont fermentés, également entre les échantillons des laits de différentes origines et aussi entre les échantillons du culot et de surnageant.

L'application de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants mais elle reste insuffisante pour identifier les différences dans la composition protéique des laits fermentés qui est induite par les grains de kéfir.

En perspectives, une amélioration de l'étude sur les protéines du lait fermenté aux grains de kéfir est envisagée par l'utilisation d'une technologie permettant une séparation bidimensionnelle de haute résolution. Cela consiste en la séparation des protéines sur des strips préfabriqués lors d'une première dimension en fonction du point isoélectrique, puis lors d'une deuxième dimension en fonction du poids moléculaire dans le but d'obtenir un grand nombre de spots bien résolus. Ce travail sera poursuivi par la caractérisation de ces spots par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines qui apparaissent et/ ou disparaissent après la fermentation du lait.



Références
Bibliographiques



Références bibliographiques

- [1]-SENOUSSI C., 2011. Les protéines sériques du lait camelin collecté dans trois régions du sud algérien : essais de séparation et caractérisation de la fraction protéose peptone. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister. Tizi-Ouzou. 1-10p.
- [2]-ATHENA Z., ANIFANTAKIS E., 1988. Le kéfir Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production : Le Lait. Grèce. 4: 373-392p.
- [3]-POUGHEON S. et GOURSAUD J., 2001. Le lait : caractéristiques physicochimiques In DEBRY G. Lait : nutrition et santé. Tec et Doc. Paris. 6:566p.
- [4]-GHAOUES S., 2011. Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister. Constantine. 3-19p.
- [5]-FREDOT E., 2006. Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Tec et Doc. Lavoisier. 25:397p.
- [6]-JEANTET R., CROGUENNEC T., MAHAUT M. et *al.*, 2008. Les produits laitiers. Tec et Doc. Lavoisier. 2:185p.
- [7]-JAOUEN J. 1986.Composition du lait de chèvre et de nombreux facteurs.153p.
- [8]-MICHEL A., Composition et valeur nutritive du lait. Institut Babcock.USA. 4p. http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/fr/de_28.fr.
- [9]-BRULE G., 1987. Le lait matière première de l'industrie laitière. CEPIL-INRA. Paris. 132p.
- [10]-INCA A., 1987. Centre International pour l'Elevage en Afrique : Bulletin du CIPEA. 27:3p.
- [11]-VIGNOLA C., 2002. Science et Technologie du lait: Transformation du lait. Ed POLYTECHNIQUE. Canada. 1-29p.
- [12]-SOLEIDAD V. 2009. Fractionnement de protéines du lait par filtration dynamique. Thèse présentée pour l'obtention du grade de doctorat. L'université de technologie Compiègne.
- [13]-JOUAN P., 2002. Lactoprotéines et lactopeptides: Propriétés biologiques. Ed INRA. Paris. 77p.
- [14]-MARTINET J., HOUDEBINE L., 1993. Biologie de la lactation. Ed INSERM. Paris. 493p.
- [15]-DIMBINIRINA P., 2011. Projet de création d'une unité de fabrication semi-industrielle de fromage à partir de lait de chèvre dans la région d'Ambatolampy. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur en génie chimique. Ecole supérieure polytechnique d'Antananarivo.135 p.

Références bibliographiques

- [16]-ROUDAUT H., LEFRANCQ E., 2005. Alimentation théorique : Science des aliments. Ed DOIN. France. 116-115p.
- [17]-PATRICK F., TIMOTHY P., PAUL L., 2000. Fundamentals of Cheese Science. Ed ASPEN. USA. 43p.
- [18]-LAURE, DANIELLE, MARIE et *al.*. 2007. Bilan du taux de contamination et étude préparatoire au dosage de résidus de produits phytosanitaires dans le lait de grand mélange bovin. Thèse Présentée à l'université Claude Bernard : Médecine. Lyon. 184p.
- [19]-SAIFI S., YEZLI W., 2013. Comparaison du lait maternel avec le lait de vache, de chèvre et de chamelle et leur évolution au cours de l'allaitement. Mémoire pour l'obtention du diplôme de master : Biochimie appliquée. Université 20 Août 1995. Skikda. 7-10p.
- [20]-KEMP N., 1984. Kefir: the champagne of cultured dairy products. *Cult. Dairy Prod. J.* 19: 29-30p.
- [21]-LIPATOV N., 1978. Fermented milks other than yoghurt. A lectur. *Dairy Congr. Sessions Scientifiques et Techniques.* 43 :15p.
- [22]-JAMOTTE P., 1974. Note technique sur le kéfir. Station laitière de l'Etat. Belgique.
- [23]-KOSIKOWSKI F., 1982. Fermented milks. Ed *Cheese and fermented milk foods.* USA. 37-48p.
- [24]-PIDOUX M., 1984. Les kéfirs : kéfirs lactés et kéfirs sucrés. *Tech. Lait.* 29-33p.
- [25]-MARSHALL V., COLE W., 1984. Studies on kefir. *Bull. Int. Dairy Fed.* XIII: 179p.
- [26]-VERONIQUE L., 2008. Caractérisation du consortium microbien d'un grain de kéfir. Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique. Belgique.14-34p.
- [27]-GUZEL-SEYDIM Z., WYFFELS J., SEYDIM A. et *al.*, 2005. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. *Int. J. Dairy Technol.* 58: 25-29p.
- [28]-GARBERS I., BRITZ T., WITTHUHN R., 2004. PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 687-693p.
- [29]-SIMOVA E., BESHKOVA D., ANGELOV A. et *al.*, 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1-6p.

Références bibliographiques

- [30]-ANGULO L., LOPEZ E., LEMA C., 1993. Microflora present in kefir grains of the Galician region. *J. Dairy Res. Spain.* 60: 263-267p.
- [31]-WITTHUHN R., SCHOEMAN T., BRITZ T., 2004. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *Int. J. Dairy Technol.* 57: 33-37p.
- [32]-WSZOLEK M., TAMINE Y., MUIR D. et *al.*, 2001. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.* 34: 251-261p.
- [33]-LIBUDZISZ Z., PIATKIEWICZ A., 1990. Kefir production in Poland. *Int. Dairy Ind.* 55: 31-33p.
- [34]-HERTZLER S. CLANCY S., 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J. Am. Diet. Assoc.* 130: 582-587p.
- [35]-GUZEL-SEYDIM Z., SEYDIM A., GREENE A. et *al.*, 2006. Determination of antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids. *Int. J. Dairy Technol.USA.* 59: 209-215p.
- [36]- VIEIRA C., ÁLVARES T., GOMES L. et *al.*, 2015. Kefir Grains Change Fatty Acid Profile of Milk during Fermentation and Storage. *PLOS ONE J. Grèce.* 10: 11-13p.
- [37]-<http://therapeutesmagazine.com/9-bienfaits-du-kefir-sur-la-sante/#lSzydrvzBwfXRj6I.99>
- [38]-VERONIQUE L., RADEGONDE M., GILBERT B., 2009. Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation règlementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ. Belgique.* 3: 459-466p.
- [39]-<http://www.femmeactuelle.fr/sante/alimentation-equilibree/kefir-vertus-bienfaits-sante-31831>
- [40]-MAEDA H., ZHU X., OMURA K. et *al.*, 2004. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors.* 22: 197-200p.
- [41]-MATHIEU J., 1998. Initiation à la physicochimie du lait. Guides technologique des IAA. Ed LAVOISIER Tec et Doc. Paris. 220p.
- [42]- AFNOR, 1980. Lait produit laitiers: méthodes d'analyse. Paris. 33-34p
- [43]- AFNOR, 1985. Quality control of dairy products - physical and chemical analyses, Ed AFNOR. Paris. 321p.

Références bibliographiques

- [44]- MANSOUR L., 2015. Etude de l'influence des pratiques d'élevage sur la qualité du lait: effet de l'alimentation. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en sciences : agronomie, production animale.
- [45]-AKLI B., 2011. Analyse physico-chimique et microbiologie de lait UHT demi-écrémé. Centre de formation professionnelle EL HIDAB. Sétif.
- [46]-ORELAIT M., 1985. Office régional du lait et des produits laitiers de l'est. Avant projet de code d'hygiène et de la qualité du lait et des produits laitiers. I : 138P.
- [47]-HAMZA B., 2008. Fractionnement des protéines sériques par électrophorèse sur gel polyacrylamide. Mémoire pour l'obtention du diplôme de licence : biologie appliquée. Université des frères Mentouri. Constantine. Constantine. 100-102p.
- [48]-LAEMMLI U., 1970. Clivage of structural proteins during the assembly of bacteriophage. Aspects fondamentaux. Paris.
- [49]-SING N., SHEPHERD K., CORNISH G., 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. J. of Cereal Sci. 203-208p.
- [50]-KADRI M., 2008. Détermination de la composition minérale du lait camelin collecté dans le sud est algérien (El oued, Ghardaïa et Ouargla) : cas des oligoéléments. Thèse d'ingénieur en sciences biologiques. Université d'Ouargla.
- [51]-ABU-TARBOUSH H., 1996. Comparison of growth and proteolytic activity of yogurt starters in whole milk from camels and cows. J. Dairy Sci. 79:366-371p.
- [52]-BENGOUMI M., FAYE B., TRESSOL J., 1994.composition minérale du lait de chamelle du sud marocain. Actes du colloque : "dromadaires et chameaux animaux laitiers". Mauritanie.
- [53]-FAO, 1995. Le lait et produits laitiers dans la nutrition humaine. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome.
- [54]-EL-AMINE M., WILCOX J., 1992. Composition of Majaheim camels. J. Dairy Sci. 75:3155-3157p.
- [55]-OUADIAA D., AZIZ D., 2016. Recherche préliminaire des biomarqueurs des maladies « Alzheimer et Parkinson » dans la salive humaine. Université des frères Mentouri. Constantine. 48p.

Annexe

Tableau1 : la correspondance entre la quantité de lactose hydraté, exprimée en gramme, et le volume de la solutionde permanganate de potassium 0,1 N.

KMnO ₄ 0,1N	Lactose hydraté	KMnO ₄ 0,1N	Lactose hydraté	KMnO ₄ 0,1N	Lactose hydraté
5,0	23,8	8,9	43,0	12,8	63,1
5,1	24,1	9,0	43,5	12,9	63,6
5,2	24,6	9,1	44,0	13,0	64,1
5,3	25,1	9,2	44,5	13,1	64,7
5,4	25,6	9,3	45,0	13,2	65,2
5,5	26,1	9,4	45,5	13,3	65,7
5,6	26,6	9,5	46,0	13,4	66,2
5,7	27,1	9,6	46,5	13,5	66,8
5,8	27,6	9,7	47,1	13,6	67,3
5,9	28,0	9,8	47,6	13,7	67,8
6,0	28,5	9,9	48,1	13,8	68,4
6,1	29,0	10,0	48,6	13,9	68,9
6,2	29,5	10,1	49,1	14,0	69,4
6,3	30,0	10,2	49,6	14,1	69,9
6,4	30,5	10,3	50,1	14,2	70,5
6,5	31,0	10,4	50,6	14,3	71,0
6,6	31,5	10,5	51,2	14,4	71,5
6,7	32,0	10,6	51,7	14,5	72,0
6,8	32,5	10,7	52,2	14,6	72,6
6,9	33,0	10,8	52,7	14,7	73,1
7,0	33,5	10,9	53,2	14,8	73,6
7,1	34,0	11,0	53,7	14,9	74,1
7,2	34,5	11,1	54,2	15,0	74,7
7,3	35,0	11,2	54,8		
7,4	35,5	11,3	55,3		
7,5	36,0	11,4	55,8		
7,6	36,5	11,5	56,3		
7,7	37,0	11,6	56,8		
7,8	37,5	11,7	57,4		
7,9	38,0	11,8	57,9		
8,0	38,5	11,9	58,4		
8,1	39,0	12,0	58,9		
8,2	39,5	12,1	59,9		
8,3	40,0	12,2	60,0		
8,4	40,5	12,3	60,5		
8,5	41,0	12,4	61,0		
8,6	41,5	12,5	61,5		
8,7	42,0	12,6	62,1		
8,8	42,5	12,7	62,6		

Composition des gels d'électrophorèse

Gel de séparation : T : 12.8 % C : 0.97%

- Acrylamide 40% 12.4ml
- Bis acrylamide 2% 2.4ml
- Eau permutée 8.6ml
- Tampon Tris-HCL pH 8.8 ,15.2ml
- SDS 10% 0.40ml
- APS 1% 1ml
- TEMED 0.020ml

Gel de concentration T : 2.8 % C : 1.42%

- Acrylamide 40% 1ml 1ml
- Bisacrylamide 2% 0.3 ml
- Eau permutée 10.2 ml
- Tampon tris-HCL pH 6.8 , 1.7ml
- SDS 10% 0.14ml
- APS 1% 0.70ml
- TEMED 0.014

Tableau 2 : diagrammes types des protéines du lait frais et fermenté dans des conditions dénaturantes et réductrices pour le cas du lait total.

bandes	M/E	Vache				Chèvre				Chamelle				Lait reconstitué			
		0h	24h	48h	72h	0h	24h	48h	72h	0h	24h	48h	72h	0h	24h	48h	72h
1	13	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	16	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	21	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
4	24	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
5	29	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
6	32	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
7	35	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	42	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
9	46	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
10	50	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
11	51	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
12	55	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
13	60	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
14	66	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
15	71	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
16	76	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
17	84	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
18	90	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
19	103	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
21	114	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
22	118	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	123	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	130	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	136	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
26	141	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	147	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	152	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
29	155	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
30	158	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	163	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
32	168	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
33	172	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
34	182	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
35	187	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
36	189	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
37	198	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
38	210	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0

Thème : Etude des paramètres physicochimiques et biochimiques et analyse des profils protéiques de laits additionnés de grains de kéfir.

Résumé

Le kéfir est un lait fermenté, produit principalement à partir des laits de vache, de brebis ou de chèvre à l'aide de « grains de kéfir ». La région d'origine de cette boisson est le Sud du Caucase, sous des noms très variés. La dénomination la plus fréquente est « kéfir » qui est d'origine turque.

Les grains de kéfir sont décrits comme étant de "petites masses ridées, à consistance gélatineuse, de grosseur variable", ou encore de "petites masses blanches élastiques, en forme de chou-fleur". Observés en microscopie électronique, les grains de kéfir révèlent la présence de bactéries et de levures étroitement associées à une matrice spongieuse.

L'objectif de ce travail vise à étudier les paramètres physicochimiques et biochimiques des laits de différentes origines animales additionnés de grains de kéfir et apprécier l'effet de ces derniers sur la composition protéique du lait par électrophorèse monodimensionnelle.

Pour cela des laits de différentes origines (vache, chèvre, chamelle, lait reconstitué) ont été fermentés et analysés à l'état frais (0h) et après ensemencement (24h, 48h et 72h). Nous avons ensuite comparés les résultats des paramètres physicochimiques, biochimiques et les profils électrophorétiques des protéines du lait avant et après fermentation.

Les résultats des analyses physicochimiques et biochimiques du kéfir ont montré que la composition de ce dernier dépend de la durée de fermentation et l'origine des laits utilisés, et que plusieurs composés présentent des variations très importantes.

L'analyse des gels a permis de dénombrer 38 bandes protéiques de mobilité et d'intensité différentes dans les conditions dénaturantes et réductrices.

Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines, une étude statistique a été effectuée en calculant, l'indice de similarité.

Plusieurs variations quantitatives et qualitatives importantes ont été trouvées entre les laits de différentes origines d'une part, et entre les laits frais et fermentés de la même origine d'autres part.

Laboratoire de Génétique biochimie et Biotechnologie Végétales, Département de Biochimie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Université des frères Mentouri Constantine

Mots clés : Lait, grain de kéfir, composition physicochimique, protéines, électrophorèse

Jury d'évaluation :

- Président du jury : Prof. KHELIFI Douadi, UFMC
- Examineur : Dr. BECHKRI Sakina, UFMC
- Encadreur : Dr. BELLIL Inès, UFMC

