

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Alimentation et Nutrition
Option : Industrie laitière



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Obtention et caractérisation d'une protease
coagulante de *Penicillium sp***

Présenté par :

BOUYOUCEF Yassmina & TAOUZINET Asma

Soutenu le : 16 Juin 2016

Devant le jury composé de :

Mme: IKHNACHE Ferroudja

MAA

President

M^{elle} : BEL HAMICHE Nabila

MAA

Encadreur

M^r :BOUKHALFA Farid

MAA

Examineur

Année universitaire : 2015 / 2016

REMERCIEMENTS

En premier lieu nous remercions Allah le tout puissant pour la volonté et le courage qu'il nous a donné pour réaliser ce modeste travail.

Nos sincères remerciements vont aussi à M^{me} Ikhnache d'avoir accepté de présider ce travail ; à M_R Boukhalifa qui a consacré son temps pour l'examen de notre travail.

On tient à exprimer nos remerciements aux techniciens et aux ingénieurs des laboratoires, de technologie alimentaire, microbiologie alimentaire, biochimie, mycologie et biologie animale pour avoir mis à notre disposition tous les moyens nécessaires, tout au long de notre stage en particulier M^{me} Kharbachi.

En fin, nous tenons à remercier tous ceux ou celles qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de notre travail.

DEDICACE

JE dédie ce modeste travail à :

Ma très chère maman pour son sacrifices et son soutien, que dieu la garde tout près de nous s'il le veut.

Mes chers frères sofiane et oualid.

Mon fiancé Nabil.

Ma grande mère, mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines.

Mes amies Sonia, Lydia, Kenza, Fahima, Akila, Yasmine, Sonia.

Que Dieu vous protège tous « Asma »

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

A Allah, le clément, le Miséricordieux ; nous rendons grâce à Allah le tout puissant qui nous a permis de voir ce jour solennel.

A mes parents :

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection, je ne saurais vous remercier tout ce que vous avez fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent, que Dieu vous garde et vous accorde longue vie.

A ma unique sœur Samah, et son époux Nabil et leur fils Sofiane

A mes frères : Boualem, Yanis, Rahim et Aymene

A mes tantes Noura, Salihah sans oublier leurs conjoints et leurs enfants

A mes amies de promo Alimentation et Nutrition et spécialement à mes amies proches : Lydia, Nasma, Razika, Sara, Iyes et Kossaila

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

Que Dieu vous protège tous « Yassmina »

Liste des abréviations

AC : activité coagulante

BBC : Coomassie Brilliant Blue

BSA : sérum albumine bovine

CMP : Caséino Macro Peptide

FML : fermentation sur milieu liquide

FMS : Fermentation sur milieu solide

OGM : organismes génétiquement modifiée

PDA : Potato Dextrose Agar

T_c : temps de coagulation

UP : unité de présure

US : unité de soxhlet

Liste des figures

Figure 1 : Modèle de formation des micelles.....	9
Figure 2 : Mécanisme de la coagulation du lait par la présure.....	11
Figure 3 : Préparation et répartition du substrat (Son de blé).....	16
Figure 4 : Paillasse de travail.....	17
Figure 5 : Inoculation du milieu.....	18
Figure 6 : Agitation lors de l'extraction.....	18
Figure 7 : Evolution de l'activité coagulante au cours de la croissance de <i>Penicillium sp.</i>	21
Figure 8 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante.....	23
Figure 9 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante.....	24
Figure 10 : Effet de la concentration en CaCl ₂ du lait sur l'activité coagulante.....	26
Figure 11 : Influence de la concentration en extrait coagulant sur l'activité coagulante..	27
Figure 12 : Stabilité thermique de l'extrait enzymatique du <i>penicilium sp</i> et de la présure.....	28
Figure 13 : Courbe étalon de la B.S.A (Annexe A).	
Figure 14 : Mesure du temps de coagulation par méthode de Berridge (Annexe B).	

Liste des Tableaux

Tableau I : La composition moyenne du lait de vache.....8

Tableau II : Les principaux avantages et inconvénients de la FMS.....13

Tableau III : La liste de matériel et produits utilisés lors de la pratique (annexe D).

SOMMAIRE

Introduction.....	1
--------------------------	----------

CHAPITRE I : PARTIE THEORIQUE

I.	Les enzymes coagulantes des industries laitières.....	3
1.	La Présure	3
2.	Les succédanés de présure.....	4
2.1.	Les succédanés d'origine végétale	4
2.2.	Les succédanés d'origine animale.....	5
2.3.	Les succédanés d'origine microbienne.....	5
2.3.1.	Les succédanés bactériens.....	5
2.3.2.	Les succédanés fongiques.....	6
II.	Le lait.....	7
1.	Le caractère du lait.....	7
2.	La composition globale.....	8
3.	Les caséines.....	9
4.	Mécanismes de la coagulation du lait.....	10
4.1.	La coagulation acide.....	10
4.2.	La coagulation par la présure.....	11
4.3.	La coagulation mixte.....	12
5.	Les facteurs influençant sur la coagulation du lait.....	12
5.1.	Effet de pH.....	12
5.2.	Effet de température.....	12
5.3.	Effet de la concentration en chlorure de calcium(CaCl ₂).....	12
5.4.	Effet de la concentration en enzyme.....	12
III.	Le genre <i>Penicillium</i>	12
1.	Généralités sur le genre <i>Penicillium</i>	12
2.	Taxonomie.....	13
3.	Les protéases produites par le <i>penicillium sp</i>	13

IV.	Fermentation en milieu solide	14
1.	Définition de la fermentation en milieu solide.....	14
2.	Les avantages et les inconvénients de la FMS.....	14

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

I.	Matériel biologique et milieu de culture.....	16
II.	Obtention de l'extrait coagulant de <i>Penicillium sp</i>	17
1.	Revivification de la souche <i>Penicillium sp</i>	17
2.	Préparation de l'inoculum.....	17
3.	Ensemencement du milieu.....	17
4.	Extraction de l'enzyme.....	18
III.	Etude des extraits coagulants.....	18
1.	Mesure de l'activité coagulante.....	18
2.	Dosage des protéines.....	19
IV.	Caractérisation de l'extrait coagulant brut.....	19
1.	Détermination de la température optimale d'activité.....	19
2.	Influence de pH du lait	20
3.	Détermination de la concentration optimale de CaCl ₂	20
4.	Influence de la concentration en extrait enzymatique.....	20
5.	Etude de la stabilité thermique de l'extrait enzymatique.....	20

Chapitre III. RESULTATS ET DISCUSSION

I.	Mesure de l'activité coagulante.....	21
II.	Caractérisation de l'extrait enzymatique brut.....	22
1.	Influence de température sur l'activité coagulante.....	22
	Influence de pH du lait sur l'activité coagulante.....	24
2.	Influence de la concentration en CaCl ₂ sur l'activité coagulante.....	25
3.	Influence de la concentration en extrait sur l'activité coagulante.....	27
4.	Etude de la stabilité thermique de l'extrait enzymatique.....	28

Conclusion.....	30
------------------------	-----------

INTRODUCTION

Introduction

La présure principale coagulante dans l'industrie fromagère est traditionnellement obtenue à partir de la caillette de jeunes veaux.

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

Ces problèmes sont aggravés, dans les pays musulmans par des raisons religieuses, dues aux rituelles de l'abattage, et interdiction de certains agents coagulants tel que la pepsine porcine.

Ces raisons ont fait que de nombreuses recherches ont été entreprises afin de trouver des succédanés efficaces et compétitifs utilisables industriellement.

Selon le ministère de commerce, l'Algérie se considère l'un des plus grands consommateurs du lait et ses dérivés au Maghreb avec une moyenne de 110 L / personne/année, reste encore dépendante des entreprises étrangères du point de vue matière première et agent coagulant (Nouani *et al.*, 2009), où le développement d'une production fromagère nationale basée sur des enzymes coagulants extraites à partir des sources locales, constitue le début du chemin de l'indépendance par la réduction des coûts d'importation.

Plusieurs protéases, de différentes origines ont les capacités de coaguler le lait mais peu d'entre elles sont utilisées, comme succédanés de présure. Cela est due à leur activité protéolytique élevée qui s'exprime par une action excessive et non spécifiques sur les caséines.

Plusieurs recherches ont été activement pressées ces dernières années, visant à la mise en évidence des enzymes de remplacement dits succédanés de la présure de différentes origines (animales, végétales et microbiennes), capables de coaguler le lait et d'assurer des meilleurs rendements fromagers, l'industrie est à présent capable de produire, en quantité pratiquement illimité.

A cet objectif, la présure est remplacée par une souche fongique *Penicillium sp.* Pour cela, nous avons réalisé une étude en deux parties :

- Obtention de protéase coagulante le lait à partir d'une culture de *Penicillium sp.*
- Caractérisation de l'extrait coagulant brut contre la présure animale.

CHAPITRE I

PARTIE THEORIQUE

I. Les enzymes coagulantes des industries laitières

Différentes enzymes sont utilisées à l'échelle industrielle pour la coagulation du lait et la fabrication des fromages.

1. La Présure

La présure est une enzyme protéolytique, extraite de la quatrième poche de l'estomac (abomasum ou caillette) des jeunes ruminants nourris exclusivement au lait (avant sevrage). (Eck et Gillis, 1997). Selon Mahaut (2000), la Présure est un extrait liquide ou pâteux provenant de la macération des caillettes des jeunes ruminants dans une saumure de NaCl, elle est composée de chymosine et de pepsine.

La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale (Eck et Gillis, 1997). Elle est sécrétée inactive sous forme de prochymosine dans la caillette. Sous l'action de l'acidité (ions H_3O^+) du milieu, elle devient active. C'est une holoprotéine, de 35 kDa, appartenant au groupe des protéases acides. Elle comporte 323 acides aminés. Elle est stable aux pH (5.3 à 6.3), inactivée aux pH (vers 7.5) et dénaturée à pH 8. L'inactivation thermique à lieu 50 °C, elle est totale à 61°C (Scriban, 1999).

La pepsine est extraite de l'estomac des mammifères adultes ou du pro ventricules de volailles. Elle hydrolyse la plupart des protéines naturelles telles que la caséine, la globuline, et certaines enzymes telles que la trypsine, la papaïne et les amylases. Elle attaque préférentiellement les peptides contenant de la L-Phénylalanine ou de la L-Tyrosine et plus généralement les acides aminés à noyau aromatique (Boughallout, 2007).

2. Les succédanés de présure

La forte demande de la présure par les industries fromagères et le prix relativement élevé de ce coagulant ont conduit à l'approvisionnement de plus en plus difficile de la présure traditionnelle. Par ailleurs, dans certains pays, pour des raisons philosophiques ou religieuses, l'utilisation de la présure est interdite. A cet égard, des recherches ont été entreprises, ces dernières années, afin d'exploiter d'autres sources potentielles de coagulases, capables de remplacer la présure désignées sous le terme de succédanés de présure.

2.1. Les Succédanés d'origine végétale

De très nombreuses préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures. Dans les régions chaudes, on exploite également à cette fin plusieurs plantes dont on extrait des principes coagulants : la ficine provenant du latex du figuier, la papaïne est issue du papayer et la bromelaine de l'ananas (Eck et Gillis, 1997). Cependant, selon les travaux de Degreeen(1977) et ceux de Lopez *et al* (1996), l'activité protéolytique élevée de ces préparations compromet leur intérêt en technologie laitière.

2.2. Les Succédanés d'origine animale

L'appareil digestif de certains mammifères secrète diverses protéases autres que la présure notamment la trypsine, chymotrypsine et la pepsine. Les deux premières enzymes bien que capables de coaguler le lait, ont donné de mauvais résultats en fromagerie à cause de leur activité protéolytique très élevée (350 à 650 μg de tyrosine. $\text{ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Selon Ramet (1990), la pepsine porcine a permis d'obtenir des résultats plus satisfaisants cette protéase a un caractère plus acide qui décroît fortement au-dessus du pH 6.3. Au pH du lait frais, la coagulation n'a pas lieu. Les meilleurs résultats sont obtenus à l'aide de mélange de présure et de pepsine porcine pour la fabrication de fromages acides

La pepsine bovine apparait voisine de la présure, son activité est moins dépendante du pH que celle de la pepsine porcine. Il faut, néanmoins, signaler que dans certains pays pour des raisons philosophiques ou religieuses, la présure porcine n'est pas utilisée.

D'autres protéases d'origine animale ont été également expérimentées avec succès et présentent des potentialités qui permettent leurs utilisations en industrie fromagère. Selon Ramet (1990) et Cuvillier (1999), la pepsine extraite d'abats de poulet a été utilisée avec succès dans la fabrication de fromages locaux en Israël.

Enfin, une pepsine a été isolée de la muqueuse gastrique du phoque au Canada et donne de bons résultats dans la fabrication de cheddar (Shamsuzzuman *et al.*, 1985 ; Cuvillier, 1999).

2.3. Les Succédanés d'origine microbienne

Le développement de la biotechnologie a provoqué un regain d'intérêt pour la production, à partir de micro-organismes, de protéases susceptibles de remplacer la présure. Parmi les avantages que présentent les enzymes de fermentation par rapport à ceux d'origine animale et végétale, on peut citer :

- La croissance rapide sur substrat bon marché.
- La production illimitée d'enzymes en utilisant des techniques simples. La quantité produite dépend du volume de la culture mis en œuvre ; elle n'est donc pas tributaire d'une source de matière première fluctuante ou à approvisionnement difficile.
- La culture rapide avec un bon rendement pouvant être augmenté par amélioration génétique des souches, la maîtrise et l'optimisation des conditions de fermentation.
- La conservation des propriétés sécrétrices des souches dans le temps.

Ces avantages l'emportent sur les inconvénients liés aux industries de fermentation (investissement lourd, consommation d'énergie, risque de contamination, etc....).

2.3.1. Les succédanés bactériens

Le genre *Bacillus* est le plus étudié pour la production d'enzymes coagulantes, en particuliers : *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus polymexa*.

Des souches ont été isolées localement telle que *Bacillus subtilis* S3 et *Bacillus coagulans* (Chemlal, 1998) et *Bacillus subtilis* LC₃₃ (Matoub, 2000). Selon ces auteurs, les extraits obtenus présentent des caractéristiques cinétiques relativement analogues à celles de la présure commerciale. Cependant, l'utilisation des enzymes bactériennes n'a pas dépassé le stade expérimental. Des essais assez poussés avec ces préparations coagulantes ont indiqué la présence d'une activité protéolytique trop élevée par comparaison à la présure dans les mêmes conditions de la coagulation du lait (Mahon et Brown, 1985).

2.3.2. Les succédanés fongiques

Ces dernières années, de très nombreux travaux sont portés sur la recherche de protéase d'origine fongique, qui au plan pilote, ont donnés très tôt des résultats souvent comparables et parfois supérieurs à ceux obtenus avec la présure, et ont été rapidement validés en fabrication industrielles.

Partie Théorique

Différentes préparations sont commercialisées sur le marché international par les laboratoires spécialisés et sont employées à plus ou moins grande échelle selon les pays (Wahba et El-Abassy, 1989 ; Eck et Gillis, 1997). Parmi les espèces fongiques à pouvoir coagulant, seules trois moisissures sont exploitées par les grandes usines de fermentation en vue de la production de coagulases.

Le *Mucor Pusillus* produit une coagulase avec un rendement élevé seulement en culture solide (Aunstrup, 1980). C'est une moisissure banale mésophile du sol, de laquelle la firme Japonaise METTO-SANGYO, a extrait une préparation commercialisée par NOURY.

Le *Mucor Miehei* est adapté à la fermentation submergée. Il secrète une protéase acide à aspartate ayant un poids moléculaire d'environ de 38 000 Da et contient une seule chaîne peptidique avec 6% de carbohydrates. L'extrait coagulant est commercialisé par

- La firme Française RAPIDASE sous la dénomination Fromase.
- La Danoise NOVO sous le nom de Rennilase.
- La firme Américaine MILES sous l'appellation de Marzyme.
- La firme Danoise BOLL HANSEN sou le nom de Hannilase.

L'*Endothia parasitica*, parasite du châtaignier, est cultivée en culture submergé. La préparation coagulante, est commercialisée sous le nom de « Suparen ».

Ces préparations enzymatiques ont été soumises à des contrôles hygiéniques est toxicologiques sévères afin de déterminer l'absence d'antibiotiques et d'aflatoxines (Noor-Deviliet *et al.*, 1983).

II. Le lait

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes : « Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée ». Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (Luquet, 1985). Quelle que soit l'espèce, la fonction première du lait est de nourrir la progéniture jusqu'à ce qu'elle soit sevrée (Vilain, 2010).

1. Le caractère du lait

Blanc, mat ou opalescent, le lait a une odeur très faible, une saveur douceâtre faiblement sucrée. C'est un mélange de très grande complexité ; il est constitué de trois phases :

- Une phase aqueuse, le lactosérum, dont les constituants prédominants sont le lactose et un ensemble de protéines globulaires.
- Une émulsion de matière grasse sous forme globulaire.
- Une suspension de caséine, liée à des sels minéraux sous forme de micelle.

Ainsi, le lait peut être considéré comme une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse, comprenant de nombreux éléments dont les uns sont à l'état dissous et les autres sous forme colloïdale.

2. La composition globale

Le lait est riche en protéines, matière grasse, lactose, vitamines et sels minéraux. Les teneurs moyennes du lait de vache en ses principaux groupes de constituants sont illustrées dans le tableau I. Outre sa complexité et son hétérogénéité, le lait présente, selon Marti et (Coulon, 1995), une grande variabilité dans sa composition avec la race, l'espèce, l'individu, la saison et l'alimentation de l'animal. La composition moyenne des principaux constituants des divers types de lait, est indiquée dans le tableau I (Alais, 1984).

La composition de ces laits est assez voisine en ce qui concerne la proportion en lactose et en minéraux, mais la teneur en matière grasse et en protéine est variable. Elle est très importante dans le lait de brebis et de bufflesse et à un degré moindre dans le lait de vache et de chèvre.

Tableau I : La composition moyenne du lait de vache (Mathieu, 1998).

Les teneurs du lait en ses différents Constituants (g/l)	
Constituants minéraux	
Eau	902
Constituants salins minéraux	6.2
Gaz dissous	0.1
Constituants organiques	
Constituants salins organiques	1.7
Lactose	49
Matière grasse	38
Protéines ou constituants azotés protéiques	32
• Caséine	26
• Protéines dites solubles	6
Constituants azotés non protéiques	1.5

3. Les caséines

La micelle de caséine est une particule sphérique formée par l'association des caséines (α_1 , α_2 , β et κ), de quelques fragments peptidiques (les caséines γ) issus de la protéolyse de la caséine β et de composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphate

Partie Théorique

(Brule et Lenoir, 1990). Les caséines du lait ont la caractéristique essentielle de précipiter à pH 4,65 à température ambiante et de ne pas être insolubilisée par le chauffage à 100°C. Les quatre types de caséines, n'ont ni les mêmes propriétés physico-chimiques, ni les mêmes masses moléculaires (Terrien et Fournier, 1998). De nombreux modèles, concernant l'organisation de la micelle, ont été émis le plus récent, selon (Linden et Lorient, 1994), est celui de D.G. Schimdt. Ainsi, la micelle est composée d'un noyau hydrophobe, entouré d'une couche polaire rassemblant les parties riches en groupements phosphoriques et groupements hydrophiles ; la caséine κ s'y trouvait concentrée. La croissance des micelles s'arrête lorsque la surface externe est occupée par les groupements hydrophiles (Figure1).

Quelle que soit la structure réelle, la micelle est composée, dans le lait de vache, de l'association d'environ 11 000 molécules de caséines α_1 , α_2 , β et κ en proportions relatives 4-1-4-1,3 (d'après Holt, 1992) de phosphate et citrate de calcium et magnésium (Tarodo de la Fuente *et al.*, 1999). Deux facteurs sont responsables de la stabilité des micelles :

- A pH 6,7, dans un lait frais, elles portent une charge négative et se repoussent.
- Grâce aux parties hydrophiles des caséines, elles fixent une grande quantité d'eau et sont, de ce fait, caractérisées par un degré d'hydratation élevé.

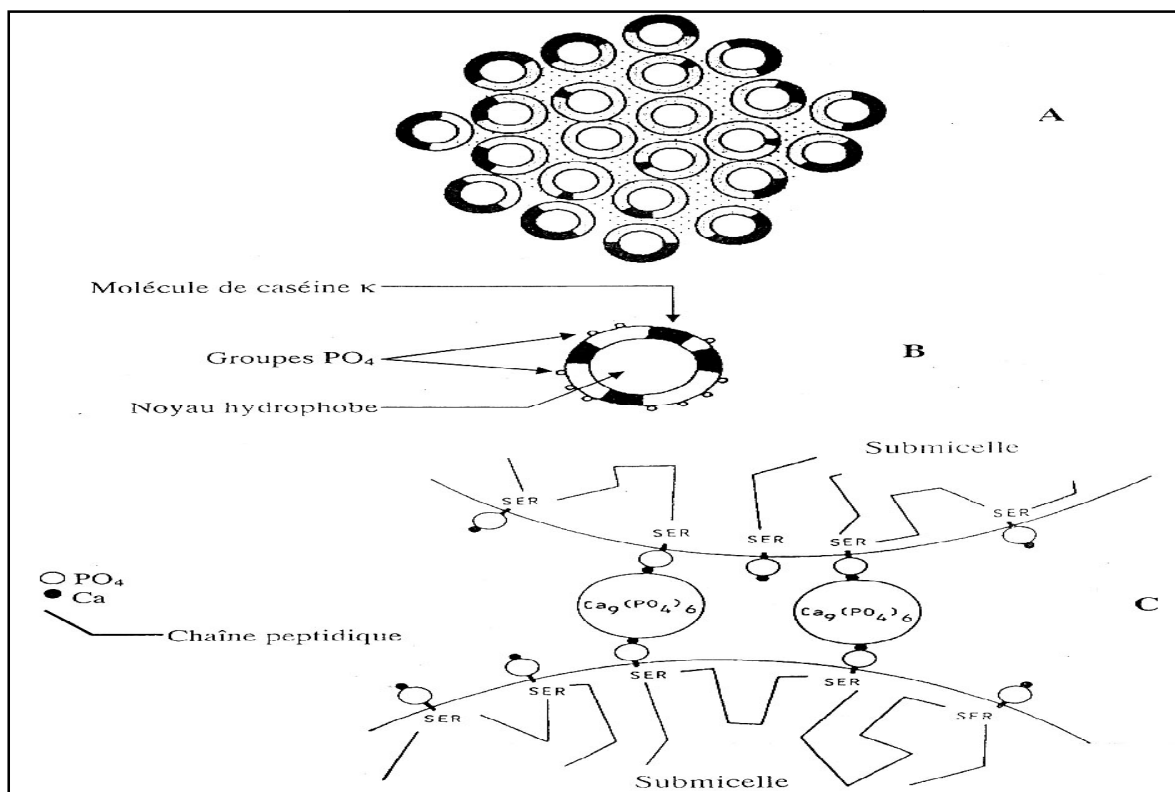


Figure 1 : Modèle de formation des micelles selon Schimdt (Ramet, 1990). A : micelle, B : submicelle, C : pontage de deux submicelles.

4. Mécanisme de la coagulation du lait

La coagulation du lait, en industrie fromagère, est une étape essentielle qui nécessite l'emploi d'un agent coagulant. Elle peut être obtenue soit par abaissement du pH et/ou par addition de la présure. Bien qu'issus de mécanismes très différents, les deux voies de coagulation aboutissent à la formation d'un coagulum résultant de la déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine. Cette dernière, associée à des minéraux, forme un réseau tridimensionnel spécifique du mode de la coagulation appliqué, donnant soit un gel lactique soit un gel présure.

4.1. La coagulation acide

Le lactose se transforme progressivement, sous l'action des bactéries lactiques, en acide lactique. Cette acidification du lait entraîne une neutralisation des charges négatives portées par les caséines et, par conséquent, une diminution du potentiel de surface des micelles. Il en résulte une solubilisation des éléments stabilisateurs des micelles (le phosphate de calcium) qui se désagrègent en submicelles.

Lorsque le pH est voisin de 5, la charge des submicelles est très réduite et la précipitation s'amorce (point isoélectrique de la caséine), la neutralisation des charges est complète ; les micelles des caséines flocculent et se soudent formant au repos un gel homogène qui emprisonne le lactosérum et occupe entièrement le volume du lait. Au cours de la déminéralisation du complexe phosphocaséinate de calcium, le calcium colloïdal migre dans le sérum. Le gel lactique obtenu est perméable, friable, fragile et ne permettra qu'un égouttage limité.

4.2. La coagulation par la présure

La coagulation par l'action des enzymes protéolytiques se déroule en deux étapes. La première est purement enzymatique. Elle correspond à une protéolyse très limitée et très spécifique de la caséine par la présure selon (Lenoir *et al.*, 1985). En effet, la chymosine, principale composante de la présure, exerce une action spécifique sur la caséine κ en hydrolysant sa liaison très labile (Phe105-Met 106). Ainsi, la molécule de la caséine κ se scinde en deux segments inégaux : la paracaséine κ qui reste intégrée à la micelle, est insoluble et acide, et le caséinomaclopeptide qui se dissocie de la micelle, il est soluble, acide et est éliminé dans le lactosérum (Figure 2).

Le détachement du caséinomacropéptide de la micelle la rend instable. En effet, il se produit la réduction des charges négatives de la micelle et de son degré d'hydratation. Ainsi, ses facteurs de stabilité se trouvent affectés. Des liaisons s'établissent entre les micelles modifiées permettent leur agrégation et la formation d'un gel dans la mesure où il n'est pas agité ; c'est la phase de coagulation (McMahon et Brown, 1984 ; Khalid *et al.*, 1990 ; Mietton *et al.*, 1994 ; Tarodo de la Fuente *et al.*, 1999 ; Schorsch *et al.*, 2002). Il faut, toutefois, signaler qu'une réaction de protéolyse générale se déroule, dès la première phase de coagulation enzymatique, sur toutes les caséines sous l'effet de la chymosine. Le gel présure est très minéralisé, ce qui lui permet sa cohésion et sa fermeté avant le déclenchement de la synérèse. (Mietton *et al.*, 1994 ; Tarodo de la Fuente *et al.*, 1999).

4.3. La coagulation mixte

Ce type de coagulation consiste en l'action de la présure et l'acidification du lait. C'est la voie la plus utilisée dans les industries fromagères en particuliers pour la fabrication des fromages frais (petit suisse, demisels....) et des fromages à pâte molle (Camembert, Brie...).

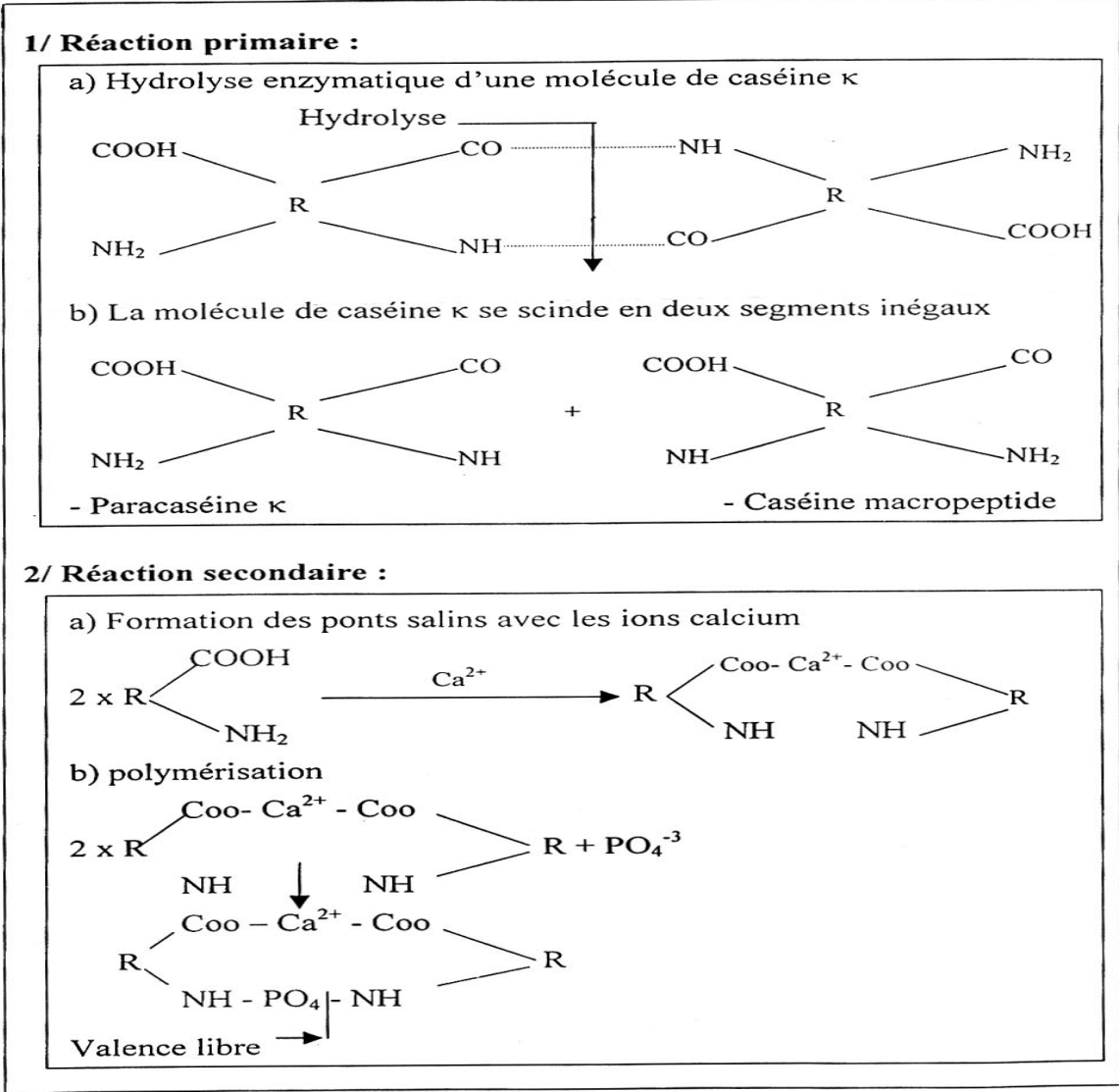


Figure 2 : Mécanisme de la coagulation du lait par la présure (Garnier *et al.*, 1968 in : Alais, 1984).

5. Les facteurs influençant sur la coagulation du lait

5.1. Effet de pH

Le pH du lait exerce une influence sur le temps de coagulation et la fermeté de gel. En effet, Selon (Mahaut *et al.*, 2003), en passant de pH 6.7 à pH 5.6, la vitesse de coagulation est multipliée par 30. Ceci résulte d'une augmentation de la vitesse d'hydrolyse, multipliée par 7, et d'un plus faible pourcentage d'hydrolyse nécessaire à l'agrégation, cet accroissement de la vitesse de la coagulation entraîne une diminution de temps de raffermissement.

5.2. Effet de température

Le phénomène de coagulation est fortement dépendant de la température, la présure possède un maximum d'activité dans un intervalle de la température de 40°C à 42°C. La coagulation ne se produit pas à une température inférieure à 10°C, devient extrêmement lente entre 10 et 20°C et est nulle au-delà de 65°C. (Mahaut *et al.*, 2003).

5.3. Effet de la concentration en chlorure de calcium (CaCl₂)

La réticulation du gel lors de la coagulation du lait par présure, impliquant des liaisons phosphocalciques, est particulièrement influencée par la teneur et la nature du calcium présent. L'addition de CaCl₂ entraîne une augmentation de calcium colloïdale ayant pour conséquence une augmentation de la taille des micelles et un abaissement du pH par association du groupement phosphorique et carboxylique des protéines (Mahaut *et al.*, 2003). Ainsi, un lait pauvre en calcium coagule lentement et le gel obtenu est mou. L'addition de chlorure de calcium peut rassurer l'aptitude du lait à la coagulation. (Lenoir, 1985 et Balcone, 1996).

5.4. Effet de la concentration en enzyme

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme, ce qui peut se formaliser selon l'équation empirique suivant selon (Mahaut *et al.*, 2003)

$$T_c = K / E + t_a$$

Avec :

T_c : temps de coagulation (s).

K : inverse de la constante de vitesse (mol.s/ l).

E : concentration en enzyme (mol/l).

t_a: temps écoulé entre la fin de réaction enzymatique et le point de coagulation (s).

III. Le genre *penicillium*

1. Généralités sur le genre *penicillium*

Le nom de *Penicillium* est donné à un genre de champignons (moisissures), avec un thalle entièrement mycélien. Ils sont considérés comme des deutéromycètes ou fungi imparfaits, il

Partie Théorique

comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores, ainsi la vitesse de croissance du thalle du mycélium à différentes températures et sur différents milieux (Pitt, 1988). Certains *Penicillium* présentent une reproduction sexuée avec formation d'ascocarpes. Ils sont classés, suivant les caractères de la paroi ascocarpique dans le genre TALAROMYCES ou EUPENICILLIUM.

De nombreuses espèces de *penicillium* sont utilisées au niveau industriel pour la fabrication des fromages à titre d'exemple *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum* (Botton *et al.*, 1990).

2. Taxonomie

Selon (INSQ, 2001), La classification de *Penicillium* est résumée comme suivant :

Règne : Fungi

Phylum : Ascomycota

Classe : Euascomycetes

Ordre : Eurotiales

Famille : Trichomaceae

Genre : *Penicillium*

Espèce : spp

3. Les protéases produites par le *Penicillium sp*

La production d'enzymes par l'espèce *P. roqueforti* varie en fonction des conditions de culture (Moreau, 1980). Les espèces *P. camemberti* et *P. roqueforti* possèdent des systèmes protéolytiques présentant entre eux de très grandes analogies et synthétisent tous deux une aspartyl protéase, une métalloprotéase, et des exopeptidases (aminopeptidases et carboxypeptidases). Le niveau de production des diverses enzymes protéolytiques de *P.camemberti* étudié sur un assez grand nombre de souches varie relativement peu d'une souche à l'autre.

L'action *in vitro* des enzymes protéolytiques sur les caséines met en évidence une analogie d'action entre les enzymes de *P. camemberti* et *P. roqueforti*. Cette analogie est plus marquée pour les aspartyl protéases que pour les métalloprotéases. La protéolyse est qualitativement assez proche dans les camemberts et les fromages à pâte persillée et reflète bien l'homologie observée au niveau des systèmes protéolytiques des deux moisissures (Cerning, 1987).

IV. Fermentation en milieu solide

1. Définition de la fermentation en milieu solide

Le terme fermentation en milieu solide est la traduction de « solid state fermentation » ou de « solid substrat fermentation », expressions désignant toute fermentation dans laquelle le substrat n'est pas liquide ; l'eau ne doit pas occuper la totalité des espaces libres et ne doit pas s'écouler librement (Hasseltine, 1972). La fermentation en milieu solide (FMS) est une culture microbienne qui se développe en surface et à l'intérieur d'une matrice poreuse et en absence de tout écoulement liquide. La matrice poreuse peut être constituée d'un substrat humide ou d'un support inerte capable d'absorber les nutriments qui se trouvent à l'état dissous. Ces milieux peuvent être soit des graines ; des céréales ou des produits végétaux organiques ou minéraux granulés ou fragmentés (Raimbault, 1980 ; Trejo-Hernandez, 1992).

La fermentation en milieu solide est considérée comme une méthode prometteuse pour la production d'enzymes microbiennes, de métabolites secondaires ou des composés bioactifs.

2. Les avantages et les inconvénients de la FMS

La fermentation en milieu solide présente une multitude d'avantages et inconvénients par rapport à la fermentation en milieu liquide (FML). Les avantages et les inconvénients sont résumés dans le tableau II. (Losane *et al.*, 1985 ; Hasseltine, 1987 ; Pandey et Soccol, 2000).

Partie Théorique

Tableau II : Les principaux avantages et inconvénients de la FMS.

Les avantages	Les inconvénients
<ul style="list-style-type: none">• Simplicité et moins d'espace de travail nécessaire• Moins de perte d'eau, ce qui permet d'éviter le problème des effluents liquides, à traiter dans le cas de la FML avec un matériel utilisé moins complexe d'où réduction des couts et énergie requise• Absence d'un contrôle rigoureux des paramètres de la fermentation à cause de simplicité des milieux de culture, en effet le substrat de fermentation est généralement très simple et le plus souvent naturel• Grande reproductibilité et le produit final (spores) est facilement récupérable et peut être utilisé directement ou après un simple séchage• Le volume du produit entreposé est réduit, d'où la diminution du cout de stockage• Utilisation directe des spores ou des cellules en suspension comme inoculum avec une faible aération• Si on a affaire à une extraction d'enzyme, la quantité du solvant utilisée est très réduite• La technologie de production d'enzymes commerciales par FMS est simple, elle ne porte pas sur OGM (Raimbault,1980).	<ul style="list-style-type: none">• Le risque d'une élévation de température à cause de problèmes de transfert de chaleur• Choix limité des microorganismes utilisables en raison du faible taux d'humidité.• La mesure de la qualité d'eau utilisée avec une grande précision afin d'obtenir le pourcentage d'humidité le plus favorable pour les microorganismes.• Le procédé de la FMS est plus lent que ceux de la FML• Difficulté de la régulation de certains paramètres (pH, température, d'O₂ et de CO₂...) surtout à grande échelle.• Difficulté d'estimation de la biomasse et transfert limité de la chaleur et de masse, ce qui impose une certaine porosité du substrat.• Difficulté de contrôle et d'automatisation de la fermentation (Durand, 1983).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique et milieu de culture

Au cours de notre expérimentation, nous avons utilisé une souche fongique *Penicillium sp*, faisant partie de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Université de Bejaia)

Le choix de cette souche repose essentiellement sur son aptitude à produire les coagulases. Elle est conservée à 4°C sur gélose inclinée (PDA). Un repiquage bimestriel est nécessaire afin de garder la vitalité de la souche.

Le milieu de culture utilisés est de type solide (fermentation en surface), dans le but d'optimiser une meilleure culture donnant une meilleure production d'enzyme, nous avons utilisés le son de blé comme substrat de fermentation, il est composé de

- Son de blé humidifié avec 150 ml d'une solution à base de caséine (annexe C).

Ce milieu est réparti à raison de 40 g par Erlenmeyer de 250 ml puis stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.



Figure 3 : Préparation et répartition du substrat (Son de blé)



Figure 4 : la paillasse de travail

II. Obtention de l'extrait coagulant de *Penicillium sp*

1. Revivification de la souche *Penicillium sp*

La souche conservée à 4 °C sur un milieu gélosé incliné a été repiquée sur des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé (PDA). La culture fongique est incubée à 30°C pendant 5 à 7 jours.

2. Préparation de l'inoculum

Après ensemencement des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA et leur incubation à 30°C pendant 5 jours, les spores sont libérées à l'aide d'une solution de tween 80 (0,1 %), puis filtrés avec de la laine de verre stérile.

3. Ensemencement du milieu

Le filtrat sert à inoculer les milieux de culture contenus dans les Erlenmeyers. Les milieux ainsi ensemencés sont incubés à 30°C pendant 7 jours.

4. Extraction de l'enzyme

L'extraction de l'enzyme est réalisée chaque jour pendant 7 jours, 200 ml de l'eau distillée sont ajoutés dans chaque Erlenmeyer. Après agitation mécanique à température ambiante, le contenu est filtré à travers la gaze puis centrifugé à 4000 tours pendant 30 min à 4 °C.



Figure 5 : Inoculation du milieu



Figure 6 : Agitation lors de l'extraction

III. Etude des extraits coagulants

1. Mesure de l'activité coagulante

L'activité coagulante est déterminée selon la méthode de Berridge (1945) modifiée par Collin *et al.*, (1977). Cette méthode permet d'exprimer l'activité de l'extrait enzymatique en unité de présure (UP), qui correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour coaguler 10 ml de substrat standard en 100 secondes à 35°C.

L'unité de présure est calculée selon l'expression suivante

$$UP = (10 \times V) / (T_c \times v)$$

Avec :

V : volume de lait (substrat de Berridge)* ajusté à pH 6.4 et porté à 35°C (ml).

v : volume de l'extrait enzymatique (ml).

T_c : temps de coagulation (secondes).

*Le substrat de Berridge est préparé par addition de 12 g de lait écrémé à 100 ml de CaCl₂ à 0.01 M. Après 30 min d'agitation lente, le pH est ajusté à 6.4. La température du lait est ramenée à 35°C afin de mesurer le temps de coagulation qui correspond à l'apparition des premiers flocons sur la paroi interne du tube dans les conditions de réaction (Figure 14, Annexe B)

2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique a été réalisé selon la méthode de (Bradford, 1976). Le principe de ce dosage est basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coumassie après liaison avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration protéique contenue dans les extraits, cette concentration est déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie en utilisant le sérum albumine bovine (B.S.A.). (Figure 13, Annexe A).

IV. Caractérisation de l'extrait coagulant brut

La caractérisation l'extrait enzymatique brut consiste à la détermination des conditions optimales de l'activité coagulante en fonction de certains facteurs.

La mesure de l'activité coagulante est déterminée en mesurant le temps de coagulation selon la méthode de (Berridge, 1945) modifiée par (collin *et al.*, 1977).

1. Détermination de la température optimale d'activité

La température optimale de coagulation du lait a été déterminée en portant le lait à différentes températures de 30°C à 75 °C avec un intervalle de 5°C.

2. Influence de pH du lait

L'influence de pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été déterminée en faisant varier le pH du lait de 5,0 à 8 avec un intervalle de 0,5.

3. Détermination de la concentration optimale de CaCl_2

L'influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante a été déterminée en faisant varier la concentration du lait en ions CaCl_2 de 0,00 à 0,09M avec un intervalle de 0,01M.

4. Influence de la concentration en extrait enzymatique

Les activités coagulantes ont été déterminées en faisant varier la concentration en protéines de l'extrait enzymatique de 0,02 à 0,2 mg / ml avec intervalle de 0,02 mg/ml.

5. Etude de la stabilité thermique de l'extrait enzymatique

La stabilité thermique de l'extrait a été étudiée en mesurant son activité coagulante résiduelle après maintien de l'extrait enzymatique à des températures variables de 30 °C à 80 °C pendant 15min. L'activité coagulante résiduelle est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité initiale, et déterminée selon les conditions standards de mesure.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Mesure de l'activité coagulante

Afin d'évaluer l'aptitude de *Penicillium sp* à produire des protéases coagulantes le lait nous avons utilisé un milieu de type solide avec solution caséine ; les résultats de l'activité coagulante sont illustrés dans la figure 7.

Cette figure montre l'augmentation de l'activité coagulante de protéase fongique en parallèle avec l'augmentation de durée d'incubation jusqu'à atteindre sa valeur optimale de production d'enzyme après 144 heures de la fermentation. De là on remarque l'abaissement de leur activité, qui due peut être à la diminution des conditions favorables de croissance de souche, soit manque de substrat (source de carbone) , l'oxygène (diffusion d'eau) ou pH du milieu nécessaires à la croissance et la production d'enzyme.

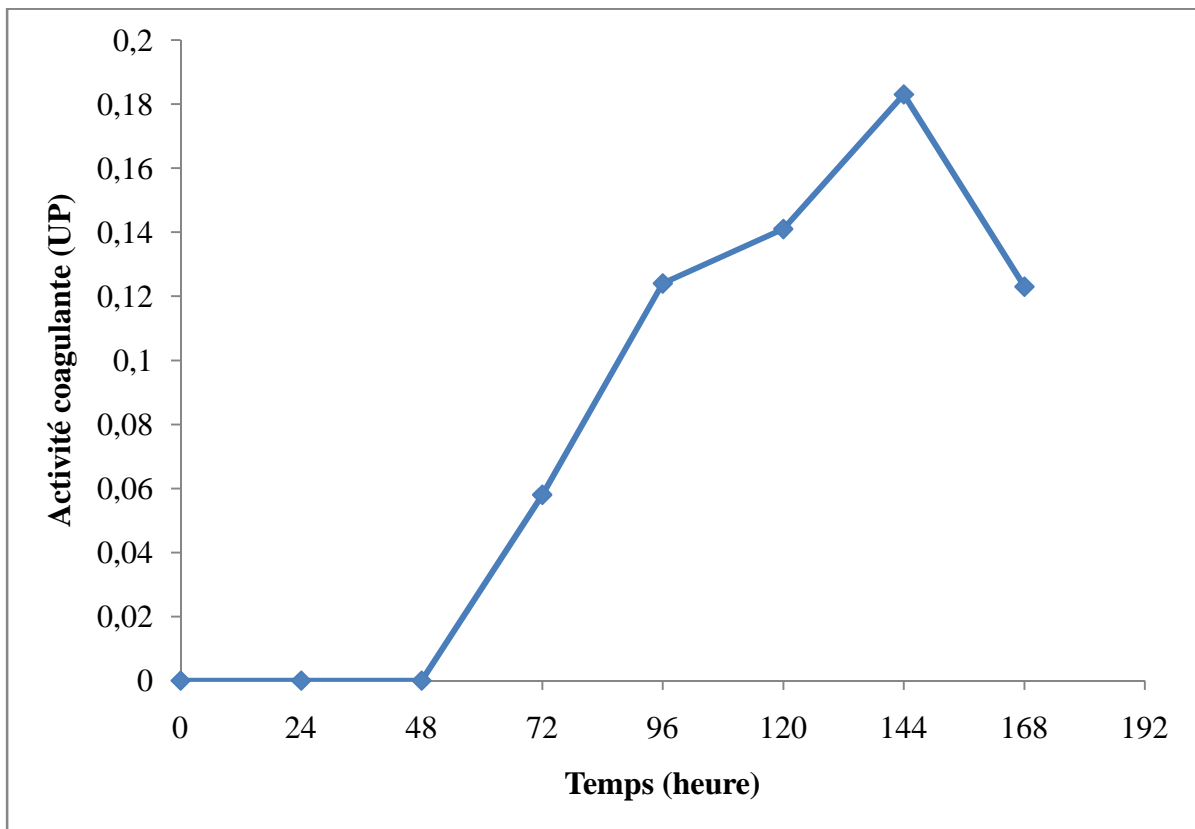


Figure 7 : Evolution de l'activité coagulante au cours de la croissance de *Penicillium sp*.

Des travaux précédents, de fermentation solide sur le son de blé, sur *Aspergillus niger* (Bensmail, 2012), *Aspergillus Oryzea* (Shata, 2005), (Belhamiche, 2001) sur *Mucor Pusillus* sur milieu solide et milieu synthétique. Et une notre résultat sur *Rhizopus microsporus* sur son de riz (Sumantha *et al.*, 2005) sont montrés l'obtention d'une activité coagulante optimale après

72 heures de fermentation a la même température (à 30°C), ces résultats sont différente à celle de nous résultats, qui peut être due aux différents facteurs comme les caractéristiques intrinsèque de souche (capacité d'utilisé le substrat et production d'enzyme), comme il peut due à la concentration d'inoculum dans le substrat.

II. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

L'Activité coagulante optimale sur le lait de l'extrait coagulant brut en fonction de certains paramètres physico-chimique a été déterminée par la mesure du temps de coagulation du lait.

1. Influence de température sur l'activité coagulante

La détermination de la température optimale d'activité coagulante de préparations coagulantes a été réalisée en mesurant le temps de coagulation à différentes températures du lait allant de 30°C à 80°C.

La figure 8 présente le comportement de deux enzymes étudiée. L'optimum d'action pour la coagulase brut de *Penicillium sp* et de présure animale est obtenu aux températures du lait égal 70°C et 50 °C respectivement. Au-delà de ces températures, on remarque l'abaissement de l'activité coagulante de deux enzymes jusqu'à s'annule à 80°C pour la coagulase fongique et à 60 °C pour la présure animale, qui due à la destruction totale de deux enzymes à ces température.

Par ailleurs, l'extrait coagulant fongique, comparé à la présure animale, se montre actif à 75°C. A cette température, la présure est complètement détruite. Comme elle montre que chaque enzyme à sa température d'activité optimale.

D'après les résultats obtenus, la température a un effet sur le temps de coagulation du lait (vitesse de réaction enzymatique), et sur la thermosensibilité de l'enzyme coagulante (coagulase fongique comme à se dénaturer à 80°C, la présure commence à se dénaturer à 55°C et est totalement dénaturée à 60°C).

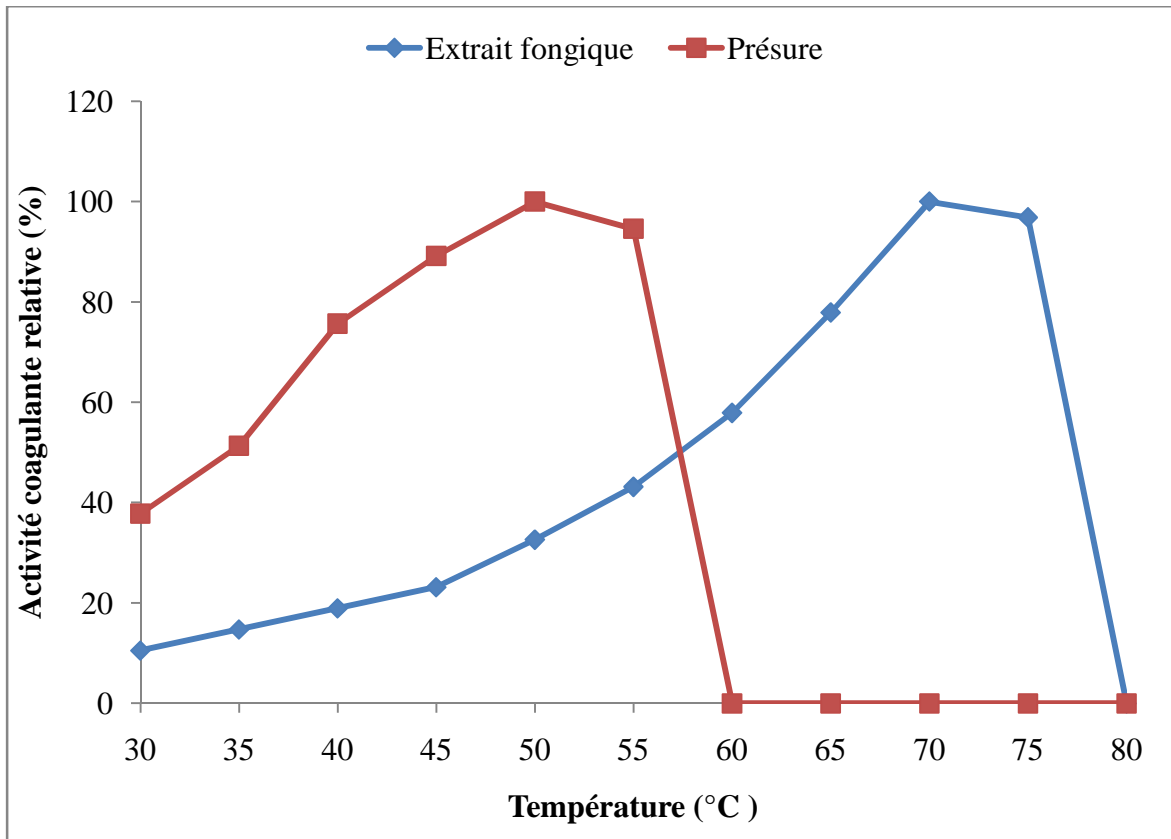


Figure 8 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante.

La présure présente une activité coagulante optimale à une température de 40°C (Garnot et Martin, 1980).

Selon (Somkuti et Babel, 1968 ; Iwasaki *et al.*, 1979 ; Mahechwari *et al.*, 2004), l'activité coagulante optimale de protéase de *Mucors pusillus* est obtenu à une température de 55°C, le même résultat a été obtenu par (Cavalcanti *et al.*, 2004), sur la protéase coagulante de *Nocardiopsis sp.*

La protéase d'*Aspergillus niger* brut et purifiée, ont une activité coagulante optimale à une température de 45 °C (Bensmail, 2012). Par ailleurs (Kumar *et al.*, 2005), l'enzyme sécrétée par *Rhizopus oryzae*, présente un optimum thermique de 60°C, température optimale d'action des enzymes de *Bacillus* (Madsen et Qvist, 1997 ; Matoub, 2000).

(Goursaud, 1999), a observé un optimum d'action à une température 52°C à 62°C pour les préparations fongiques coagulantes de *Mucors meihei*, *Mucors pusillus* et *Endothioparasitica*. Belhamiche (2001 ; 2005), dans une étude de coagulase fongique brut et purifié de *Mucors pusillus*, a noté une activité coagulante optimale à une température de 70°C et 50°C respectivement.

Résultats et discussion

(Modler *et al.*, 1979), ont notés une activité coagulante optimale à 45°C de coagulase de *Penicillium roqueforti*. D'autre part (Morsli, 1996), a indiqué des températures des coagulases purifiées de l'artichaut, du figuier et de poulet de 60°C, 80°C et 40°C respectivement.

Selon ces études, la température est en générale plus élevée pour les enzymes de microorganismes et de végétaux par comparaison aux protéases animales, en effet, l'Avantage de ces enzymes réside en leur capacité.

La déstabilisation des micelles, en effet, l'élévation de température accroît le taux de calcium et de phosphore dans la micelle et par suite ses dimensions (Brule et Lenoir, 1990).

2. Influence de pH du lait sur l'activité coagulante

La détermination de pH optimale d'activité des préparations coagulantes a été réalisée en mesurant le temps de coagulation à différentes pH du lait de 5 à 8.

Influence de pH du lait sur l'activité coagulante de la coagulase fongique de *Penicillium sp* et de présure animal est illustrée dans la figure 09. D'après les résultats obtenus la figure montre une activité coagulante optimale à pH 5 pour les deux extraits. Cette activité diminue vis-à-vis avec l'alcalinisation du lait jusqu'à l'inactivation à pH 8 de l'extrait fongique et à pH 7,5 de présure animale.

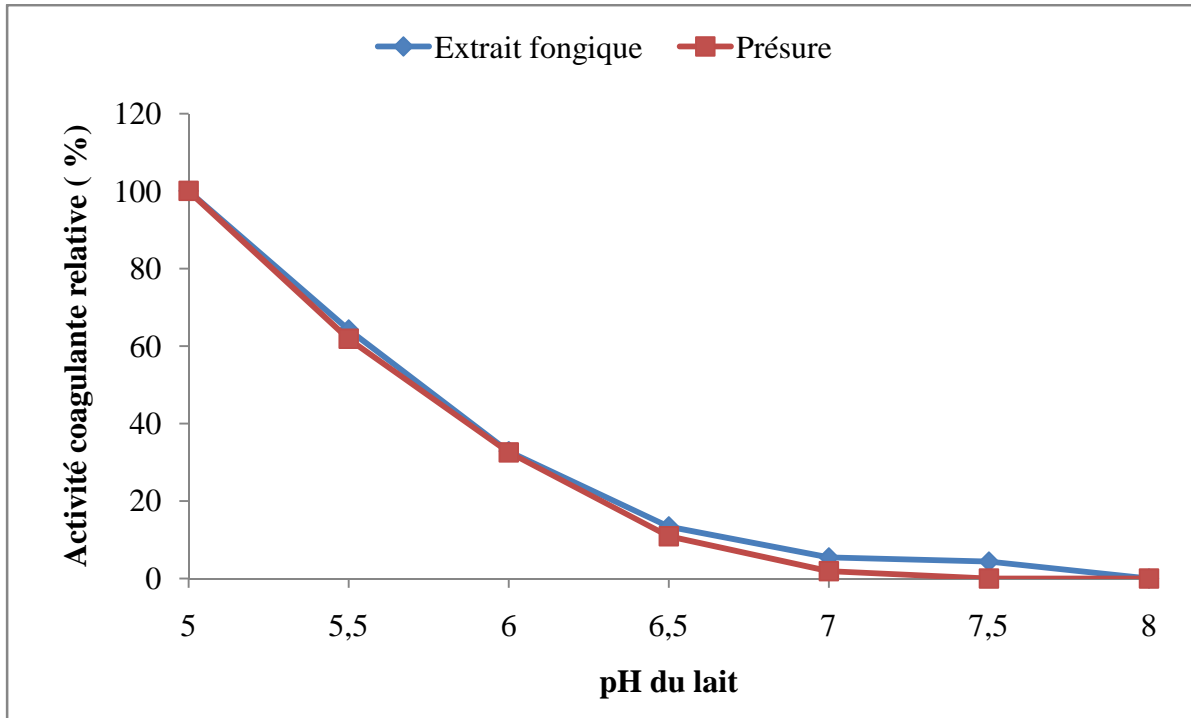


Figure 9 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante

Résultats et discussion

Le temps de coagulation est plus court au début d'acidification du lait que plus tard, le pH acide touche la stabilité de micelle de caséine par provocation de leur déminéralisation (migration de Ca et P vers le lactosérum), neutralisation des charges négatives, par suite favorise l'agrégation des micelles et formation de gel (coagulum) (Chazarra *et al.*, 2007).

(Garnot et Martin, 1980) ont rapportés un pH optimum de 5,8 pour la présure animale.

Une étude sur protéase coagulant d'*Aspergillus niger* a donné une activité optimale à pH 5 (Bensmail, 2012). Le même résultat a été obtenu par (Belhamiche, 2005) sur une étude de coagulase fongique purifiée de *Mucor pusillus*. Ces résultats confirment les résultats qu'on a obtenus.

L'activité coagulante optimale de protéase fongique d'*Aspergillus niger* sur milieu solide a été obtenue à un pH de 5,5 (Abdalaoui, 2007).

Le pH optimum de la coagulase du *Mucor Pusillus* est 3,5 en utilisant de la caséine comme substrat (Iwaski *et al.*, 1979). La même constatation a été rapportée par (Belyauskati *et al.*, 1980) pour la protéase de *Mucor renvinus* testée sur l'hémoglobine, les travaux de (Khan *et al.* 1979) ont rapporté un pH optimum de 3,8. Par ailleurs, l'activité optimale de la coagulase extraite à partir de l'artichaut se situe entre 4,5 et 5,5 (Llorente *et al.*, 2004), par contre, celle de la broméline est de 8,5 (Bruno *et al.*, 2002).

Une activité de production optimale de protéase est observée à pH 9 sur *Penicillium sp* LC j 228 (Benluevankar *et al.*, 2015). Et une étude sur *Penicillium commemberti et requelforti*, une activité optimale est proche de 5 et 5,5 respectivement (Cerning *et al.*, 1987)

L'effet du pH du lait sur l'activité coagulante des enzymes est fortement dépendant de leur origine et de nature du substrat. Au-delà chaque enzyme à son pH d'activité.

3. Influence de concentration de CaCl₂ sur l'activité coagulante

L'influence du calcium sur l'activité coagulante de la protéase de *Penicillium sp* comparée à la présure animale, a été étudiée en faisant varier sa concentration dans le lait de 0.00 M à 0.09 M.

Les résultats indiqués par la figure 10 montrent que l'activité coagulante augmente avec la concentration en CaCl₂ du lait. L'optimum d'activité coagulante est obtenu pour une concentration de 0.05 M pour la coagulase fongique, et de 0.03 M pour la présure animale. Au-delà, l'activité baisse par un effet inhibiteur de l'ion calcium.

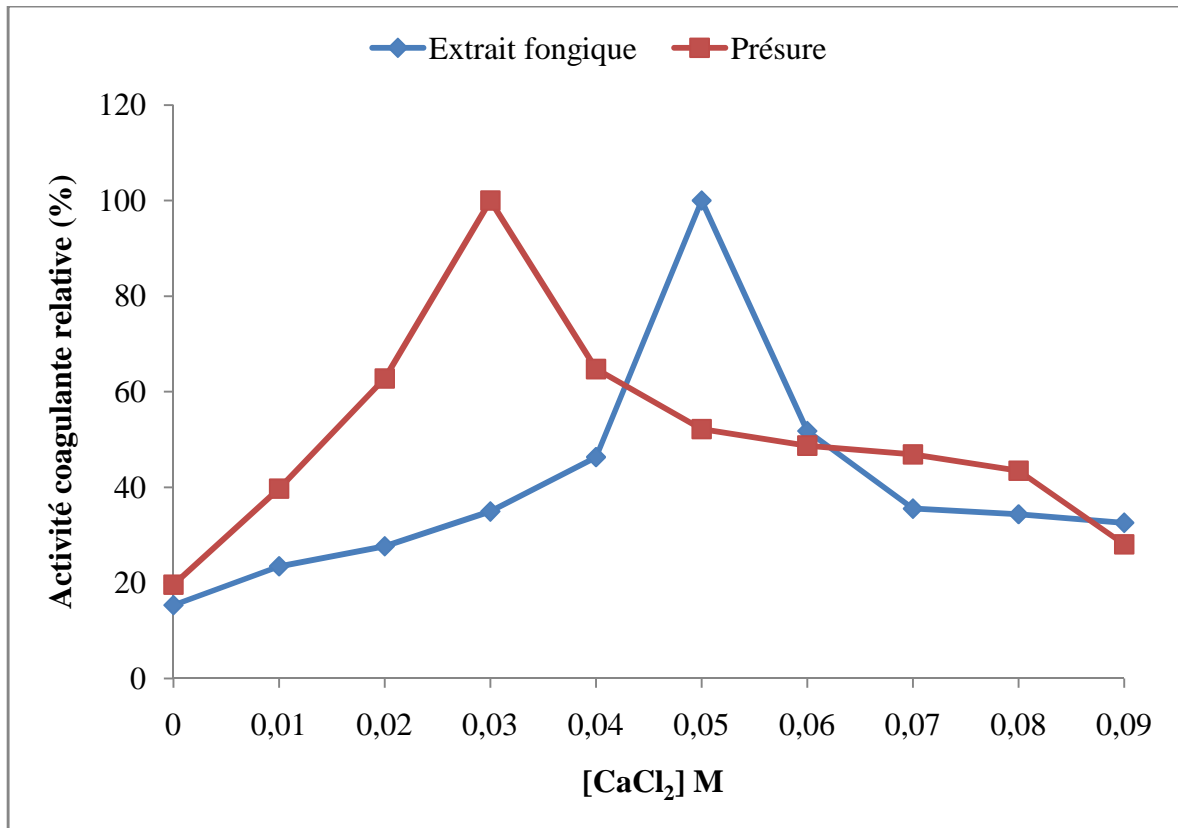


Figure 10 : Effet de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante

Nos résultats ne confirment pas ceux obtenus par (Iwasaki *et al.*, 1967 ; Houins *et al.*, 1973 ; Preetha et Boopolthy, 1997) sur *Mucor Pusillus*, qui ont indiqué une concentration optimale de 0.01M. Par ailleurs, dans une étude similaire de la coagulase de *Bacillus subtilis*, (Chemlal, 1999) a obtenu une concentration optimale de 0.05M.

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut et purifiée de la souche fongique étudiée, selon Belhamiche (2001,2005), a constatée pour une concentration en CaCl_2 de 0.04M et 0.02M respectivement.

L'activité coagulante augmente avec la concentration en CaCl_2 du lait avec un optimum d'activité est observée à 0,02M pour le poulet contre 0,04M pour la présure. Et selon les mêmes auteurs, le calcium semble être le facteur déterminant de l'aptitude de lait à la coagulation (Nouani *et al.*, 2011).

Le fait d'ajouter du chlorure de calcium au lait provoque une baisse de son pH, il s'agit probablement d'un échange d'ion H^+ par Ca^{++} sur la protéine (Alais *et al.*, 1972).

4. Influence de la concentration en extrait sur l'activité coagulante

L'activité coagulante des extraits coagulants, en fonction de la concentration en extrait, a été estimée en mesurant le temps de coagulation pour des concentrations variables de 0.02 à 0.2 mg/ml.

Les résultats obtenus dans la Figure 11, indiquent la présence d'une relation proportionnelle entre l'activité coagulante et la concentration en enzyme soit pour la présure soit pour l'extrait fongique. On note également l'absence de palier correspondant à la concentration saturante en enzyme.

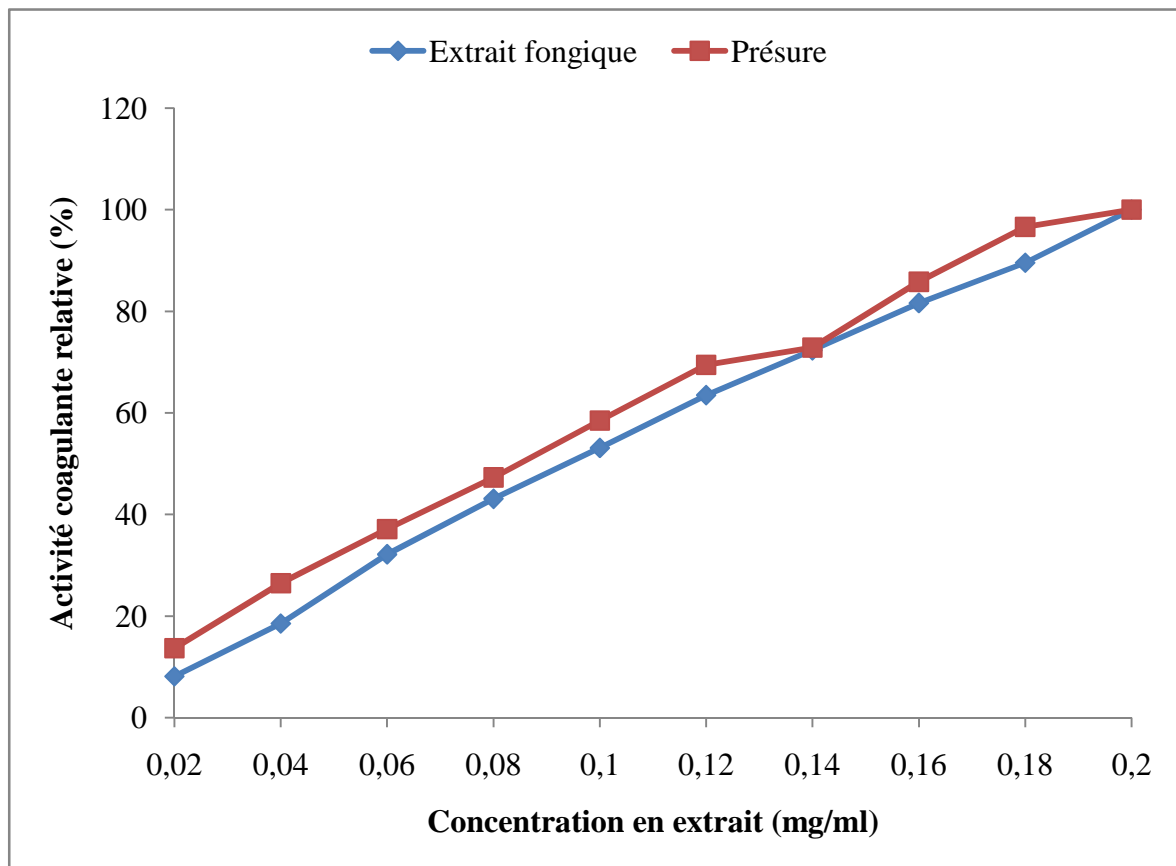


Figure 11 : Influence de la concentration en extrait coagulant sur l'activité coagulante

Matoub (2000), a signalé la même observation lors de son étude sur les protéases de *Bacillus subtilis*

Chazarra *et al.*, (2007) et Nouani *et al.*, (2009) ont observé le même comportement avec les protéases extraites à partir des fleurs de *Cynara scolymus* et du latex de *Ficus carica* respectivement.

5. Etude de la stabilité Thermique de l'extrait enzymatique

La stabilité thermique de l'extrait fongique brut, comparé à la présure, a été étudiée en le maintenant pendant 15 min à des températures de 30°C à 80°C. Les résultats de la figure 12, montrent que l'activité coagulante de la protéase de *Penicilium sp* est thermiquement stable jusqu'à une température de 40°C et 35°C pour la présure. Au-delà de cette température, une diminution de l'activité est notée jusqu'à l'inhibition totale à 50°C pour la présure et à 60°C pour l'extrait fongique, due probablement à la dénaturation de la structure moléculaire de la protéine.

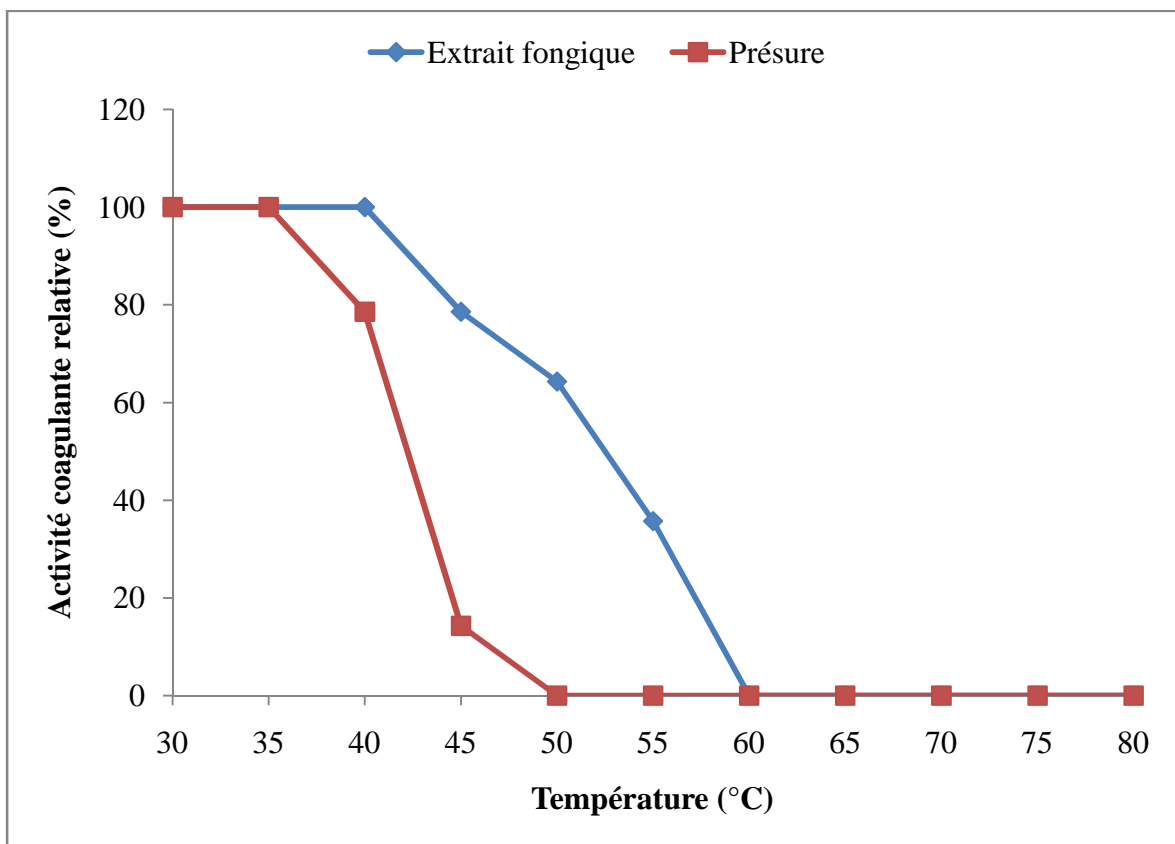


Figure 12 : Stabilité thermique de l'extrait enzymatique du *Penicilium sp* et de présure

Quand la température s'élève au-dessus de 50°C, la dénaturation de la présure devient sensible ; les fongiques sont plus résistants au chauffage ce qui explique que la température optimale de la coagulation soit plus élevée (Alais, 1984). Effectivement, les travaux de Somkuti et Babel (1968) et ce de Preetha et Boopathy (1997), ont indiqué une température d'inactivation

Résultats et discussion

de 65°C pour la coagulation du genre *Mucor*. En revanche, l'inactivation thermique de la protéase de *Rhizopus Oryzae*, rapportée par (Kumar *et al.*, 2004) a lieu à 72°C.

CONCLUSION

Conclusion

Différentes recherches et études ont été réalisés afin de trouver des succédanés de présure commerciale coagulant le lait, et dans ce cadre notre travail pour le but de contribuer à une meilleure connaissance des protéases coagulantes, issues de la culture d'une souche fongique : *Penicillium sp.*

La culture a été réalisée par une fermentation solide à base de son de blé, et incubé à une température de 30°C pendant 7 jours afin de croissance de souche et production de l'extrait coagulant.

L'étude de l'extrait coagulant produit par *Penicillium sp* a permis de montrer, une sécrétion maximale de coagulase fongique après 144 heures de culture.

La détermination des conditions optimales d'activité coagulante de l'extrait coagulant brut sur le lait contre la présure animale, indique un pH optimal de 5, température de 75 et 45°C, concentration en CaCl₂ de 0.05M et 0.03M respectivement et l'augmentation de l'activité en parallèle avec l'augmentation de la concentration de préparations enzymatiques. Par ailleurs les deux enzymes sont caractérisés par une activité coagulante relativement stable dans l'intervalle de 30°C à 45°C pour la coagulase fongique et dans l'intervalle de 30°C à 40°C pour la présure.

En perspective, il s'agit de compléter ce travail par une étude plus approfondie à savoir :

- L'optimisation des paramètres de synthèse des protéases coagulante.
- Une étude comparée de l'extrait coagulant brut avec l'extrait purifié.
- La purification de l'extrait coagulant brut.
- L'estimation des aptitudes technologiques des extraits.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

bibliographiques

Références bibliographiques

Alais C. et Lagrange A. (1972). Etude d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*, activité coagulante et coagulante protéolytique. 52 (517), pp.407- 427.

Alais C. (1984). Sciences du lait. Principe des techniques laitières. Ed. Sepaic, Paris 4^{ème} Ed., 68.

Anstrup K., (1980). Protéinase. In : microbial enzymes and bioconversions. Ed. Rose A.H. Academic Press, 93-108.

Atlas R.M. (2004). Hand book of microbiological Media. 3^{ème} édition. CRC.Press. Boca Raton. New yourk.

Belyauskaite I.P., Palubinskas V.J., Ancheuko O.E., Vesa V.S., and Glemzha A.A. (1980). Purification and some properties of the extracellular acid proteases from *Mucor renninus*. Enzyme Microb. Technol. 2: 37- 44.

Botton, B., Broton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, Ph., Larpent, J.p., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2^{ème} Ed. Masson. Paris. Milan. Barcelone. Mexico.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protéin -dyebinding. Annal of biochemistry, 72 ; 248.254.

Brule G. et Lenoir J. (1990). Les mécanismes généraux de la transformation du lait en fromage. In : Fromage. Coord. Eck, A. Tech et Doc. Lavoisier. Paris 1-21.

Bruno M.A., Pardo M.F., Caffini N.O. ET Lopez L.M.I., (2002). Purification of a endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). Acta Farm. Bonaereuse. 21 (1): 51 – 56.

Cavalcanti M.T.H., Teixeira M.F.S., Lima Filho J.L., and Porto A.L.F. (2004). Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis* sp. Bioressource Techno. 93: 29-35.

Cerning J.C. gripow G. Lamberet J. et Lenoir. (1972). L'activité biochimique du *penicillium* utilisé en fromagerie. Le lait, 67 (1), pp.3.39.

Chazarra S., Sidrach L., Lopez-Molina D. and Rodriguez-Lopez N. J. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17: 1393–1400.

Chemlal R. (1998). Caractérisation et purification partielle de coagulase de *Bacillus subtilis* S₃ et *Bacillus coagulans* LC 23.2. Mémoire Ing. Genie biologique ISN. USTHB. Bab Ezzouar.

Collin, J.C., Grappin, R. et Legraet Y., 1977. Etude de la méthode de mesure, selon berridge, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Rev. Lait. Franç.*, 355 : 389-394.

Cuvellier G.F., 1999 : production des enzymes. In: *Biotechnologie*. Goor.Scriban R., 5^e ed .345-363.

Durand A. (1983). Les potentialités de la culture à l'état solide en vue de la production de microorganismes filamenteux. Les antagonismes microbiens. 24^{ème} colloque SFP. Ed. INRA pub.

Eck & Gillis. (1997). *Le fromage de la science à l'assurance qualité*. 3^{ème} Ed.

Garnot P. et Martin P. (1980). Présure, composition, activité, son rôle en fromagerie. *Tech. Laitière*. 930(3). 27-30.

Gaursaud J. (1999). Réacteurs traditionnels à enzyme libre : Cas de l'industrie laitière. In : *Biotechnologie*. Coord. Scriban, R. 5^{ème} édition. 365-401.

Gerard J. et Galzy P. (1980). *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. Tec-Doc. Lavoisier. France.

Green M.L. (1977). Review of the progress of dairy science: milk coagulants. *J. of Dairy Res.*, 44, 159-188. Lopez M.B., Jordan M.J., Hellin P. et Laencina J. (1996). Technological suitability of different rennets and coagulant enzymes applied in Murciano-Granadina goat milk. *International Dairy Federation*.

Green M.L. et Stackpoole A. (1975). The preparation and assessment of a suitable *Mucor Pusillus* Lindt proteinase- Swine pepsine mixture for cheddar cheese making. *J. of Dairy Res.* 42, 297-312.

Hasseltine C.W. (1972). Solid-state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 14 : 517-532.

Houins G., Dervanne C. et Coppens R. (1973). Etude comparative de l'activité coagulante et du pouvoir protéolytique de la présure animale et de trois de ses succédanés. *Le lait* 529-530, 610-624.

INSPQ. (2001). *Penicillium* sp. Centre d'expertise et de référence en santé public. Québec.

Iwasaki S., Tamura G. ET Arima K., (1979). Milk clotting enzyme from microorganisms. Part II – the enzyme production and the properties of crude enzyme. *Agr. Biol.*, 31 (5): 546 – 551.

Iwasaki S., Tamura G. et Amira K. (1967). Milk clotting enzyme from microorganisms. II. The enzyme production and the properties of crude enzyme. *Agr. Bio. Chem.*, 31, 5, 346-551.

Khalid M., Shammet R.J., Brown T et Mc. Mahon D. (1992). Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on k-casein. *J. Dairy sci.*, 75 (6): 1287 – 1296.

Khan M.R. Balain J.A. et Patterson J. D. E. (1979). Extracellular protéases of *Mucor Pusillus*. *App. Envir. Microb.* 37, 4, 719-724.

Kumar S., Sharma N.S., Saharan N.R., and Singh R. (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40: 1701-1705.

Lenoir J., Remeuf, et Schneid N. (1985) : Le lait de fromagerie. In : Eck A. et Gillis J.C. *Le fromage de la science à l'assurance-qualité*. 3^e ed. Tec. Et Doc. Lavoisier

Léonil .A.J. Savagodo .A. Seydi.M., G et Traore A.S. (2012). Place de la matière azotée dans le mécanisme de coagulation présure du lait. *International journal of Biological and Chemical sciences*. Review paper.

Linden G. et Lorient P. (1994) : *Biochimie agro-industrielle : valorisation alimentaire de la production agricole*. Ed. Masson, Paris, Milan, Barcelone, 141-163.

Llorente B.E., Brutti C.B., and Caffini N.O., (2004): Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52 (26): 8182-8189.

- Lonsane B.K, Ghildyal N.P., Budiantman S. & Ramashnas.V. (1985). Engineering aspects of solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7: 258-265.
- Luquet F.M., 1985 : Lait et produits laitiers. Vache. Brebis. Chèvre. T2. Ed. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris. Mahaut M ; Jeantet R et Brulé G. (2003). Initiation à la technologie fromagère, Tec et doc. Lavoisier. France.
- Madsen J.S. and Quist K.B. (1997). Hydrolysis of milk protein by a *Bacillus licheniformis* protease specific for acidic amino acid residues. *J. Food Sci.*, 62 (3): 579-582.
- Mahaut M., Jeantet R. Brulé G. 2000. Initiation à la technologie fromagère. Editions Tech et Doc, Lavoisier. Londres, Paris, New York.
- Maheshwari R. Bharadwaj G et Bhat M.K., (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 64 (3) : 461 – 488.
- Mahon M.C. et Brown R.T., 1985 : Chymosine, présure, protéase microbienne et pepsine. Effet du type d'enzyme sur la coagulation du lait. *J. Dairy Sci.*, 68 (3) : 628-632.
- Martin B. et Coulon J.B. (1995): Milk production and characteristics. 1- Influence of milk production conditions on herd milk clotting ability. *Le lait*, 75(3) : 61 – 68.
- Mathieu J., 1998 : Initiation à la physico-chimie du lait. Ed. Tech. Et Doc. Lavoisier, Paris, 220 p.
- Matoub L. (2000) : Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc₃₃). Mémoire de Magister. Science alimentaire. I.N.A.El-Harach.
- Mc Mahon D.J. et Brown R.J. (1984): Effects of calcium, phosphate and bulk culture media on milk coagulation properties. *J. Dairy Sci.*, 67: 499 – 512.
- Mietton B., Dermazeaud M., Deroissart H. et Weber F. (1994) : Transformation du lait en fromage. In : Bactéries lactiques. T2. Coord. Deroissart H. et Luquet F.M. Ed. Loriga
- Moreau, C., 1980. Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines. *Le lait*. 254-271. CERNING, J., GRIPON, J.C., LAMBERET, G. et LENOIR, J., 1987. Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. *Le lait*. 3-39
- Morsli A. (1996) : Recherche sur les activités protéasiques de l'extrait de *Cynara scolymus*, du latex de *Ficus carica* et du pro ventricule de *Gallus gallus* en vue de leur

utilisation en technologie fromagère. Thèse de Magister. Sciences alimentaires. I.N.A. El-Harrach.

Noor-Delviliet,P,E.; Gist-Brocades, N.N et Delf, N.C.D. (1983). Les enzymes alimentaires. Utilisation et innocuité. Microb-Alim.Nut-Vol : 1.p 1-05.

Nouani A. Hamrani L et Bellal.M.M. (2011), Purification et caractérisation de protéase coagulant le lait extraite à partir du proventricule de poulet (*Gallus Gallus*), UMBB,ENSA . Algérie.

Nouani A. Dako E. Morsli A., Belhamiche N. Belbarouet S. Bellal M. M. and Dadie A. (2009). Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *Journal of Food Technology*, 7 (1): 20-29.

Pandey A.et Soccol C.R. (2000). Economic utilization of crop residues for value addition. A futuristic approach J.Sci. Ind.Res. 59: 12-22.

Pitt, J.I. (1988). Laboratory guide to common penicillium species, 2nd Edition: commonw scientific Ind research organization. North Ride Australia. 197p.

Pretha S. et Boopathy R. (1997). Purification and characterisation of milk clotting proteases from *Rhizomucor miehei*. W.J.Microb. Bio. 13, 5,573-578.

Raimbault M. (1980). Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. Thèse d'état. Université-Paul Sabatier, Toulouse. France, 291 p.

Ramet J.P. (1990) : Les agents de transformation du lait. In: Fromage. Coord. Eck A. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris: 101 – 105.

Schorsh C., Jones M.G. et Norton T. (2002).Micellarcasein gelation at high sucrose content. J. Dairy Sci., 85: 3155 – 3163.

Scriban, R. (1993). Biotechnologie.4 ème Ed. Tec et Doc. Lavoisier. Londres. Paris. New York.

Shata Hoda M. A. (2005). Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae*. *Polish Journal of Microbiology*, 54 (3): 241 -247.

Somkuti G.A et Babel F.J., (1968):Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. J. Bact., 95 (4): 1407 – 1414.

Sumantha A., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C. R. and Pandey A. (2005). Production and partial purification of a Neutral metallo-protease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (4): 313-319.

Tarodo de la Fuente B., Lablee J. et Quq J.L. (1999). Le lait, coagulation et synérèse. Industries Alimentaires et Agricoles, 116 : 19 – 26.

Terrien M. et Fournier J.(1998) . Chimie du petit déjeuner. Ed. Nantes. Culture et techniques, 304 p.

Trejo-Hernandez M.P. (1992). Physiologie de croissance de souche de *Claviceps* : Production d'alcaloïdes par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat, université de provence, Aix-Marseille L- 164 p.

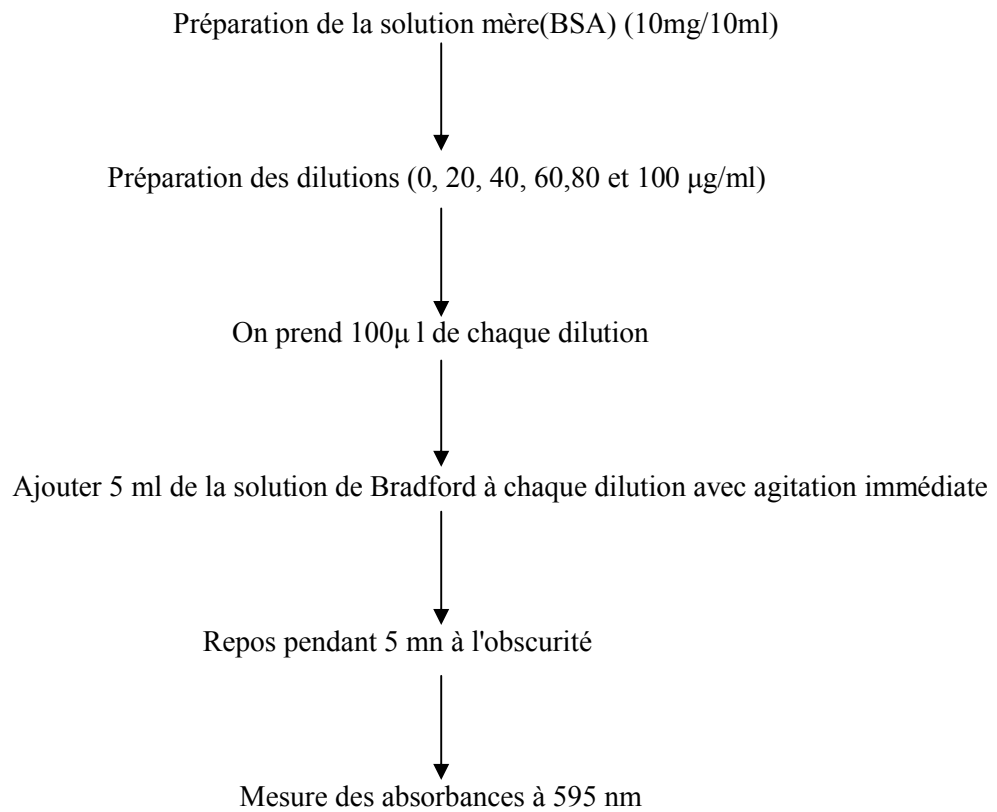
Wahba, A. et El-Abassy.F. (1989). Bitterness in Rascheese made with soluble and immobilized calf rennetand. *Mucor Meithei*. Egyptian.J.dairy. Sciences.vol: 17. P 207-211.

Walsh, G. (2002). proteins: biochemistry and biotechnology, 2^{ème} edition john Wiley and sons: England, p.547.

ANNEXES

Annexe A

Dosage des protéines (Bradford, 1976)



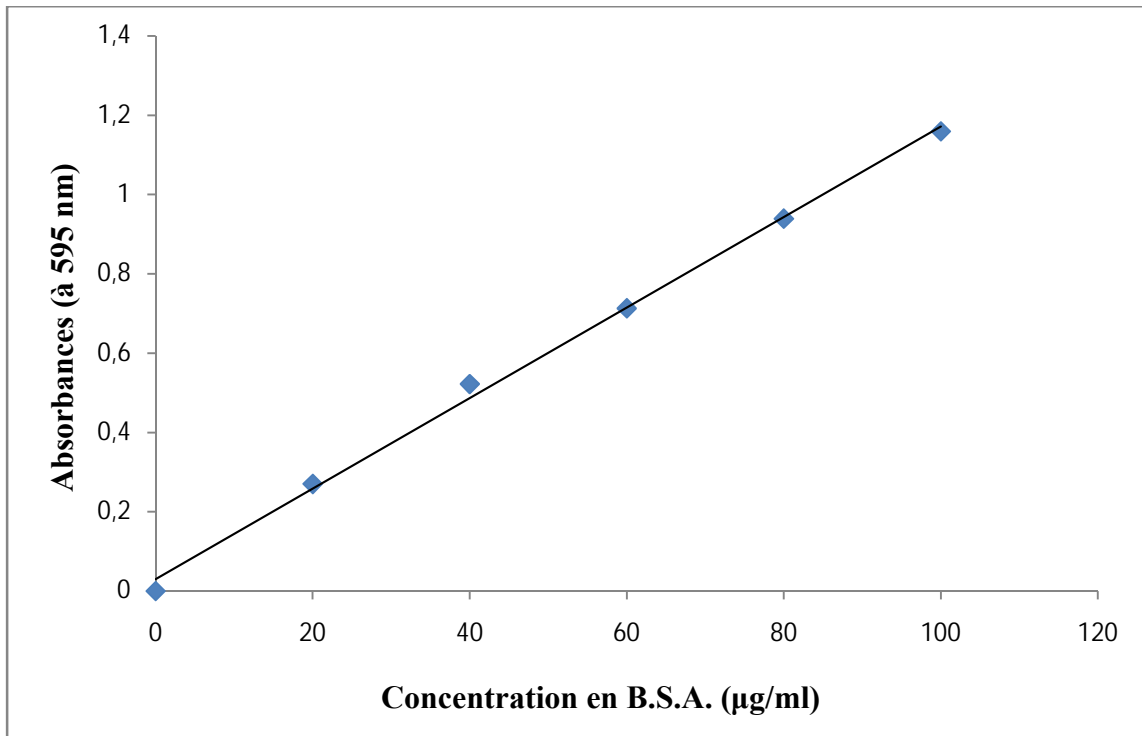


Figure 13 : Courbe étalon de la B.S.A.

Annexe B

Protocole de l'activité coagulante Berridge (1945) modifiée par collin *et al* (1977).

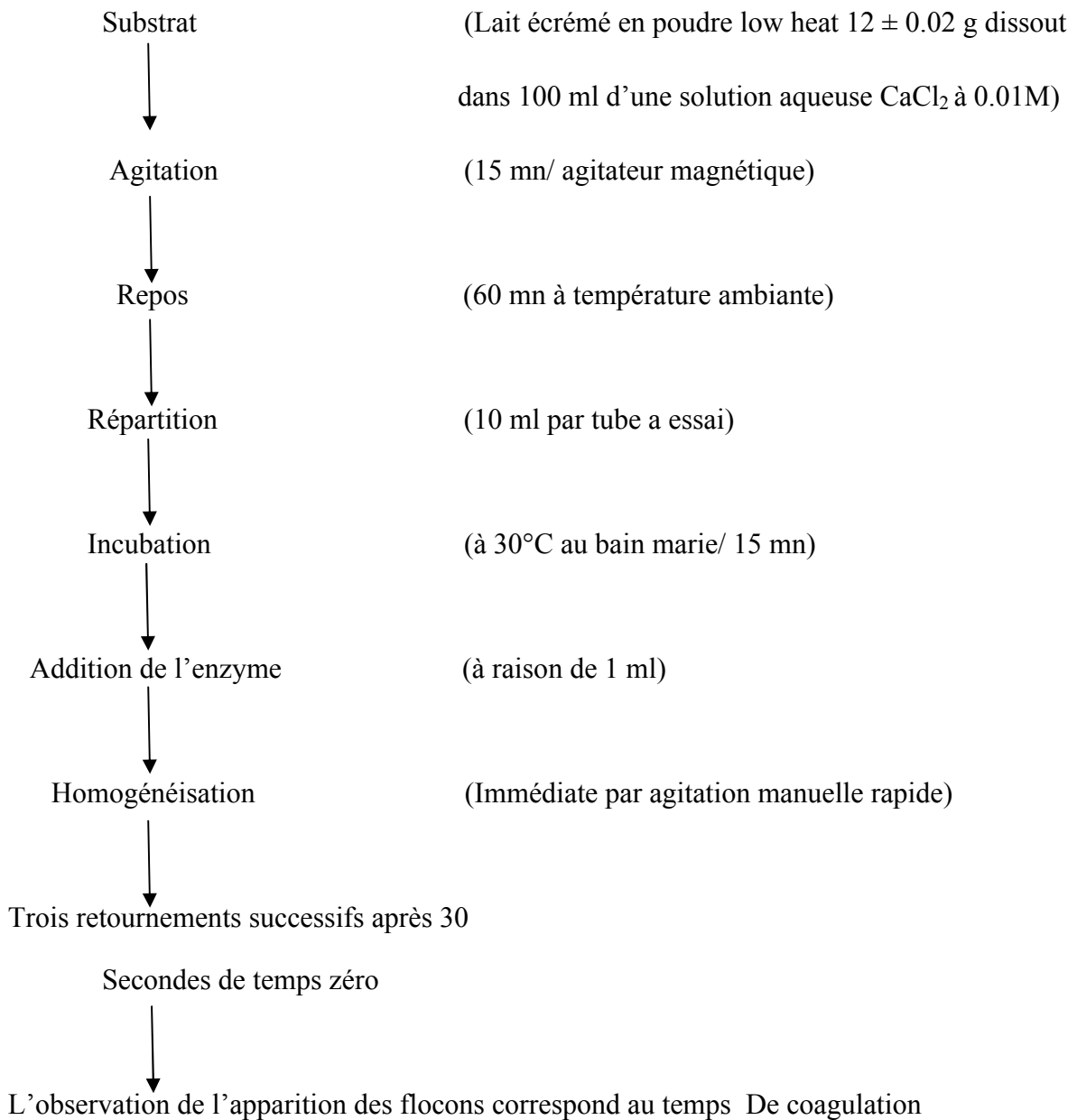


Figure 14 : Mesure du temps de coagulation par méthode de Berridge (1945) modifiée par Collin *et al* (1977).

Annexe C

Milieux de cultures utilisés

Milieu PDA (GUIRAUD et GALZY, 1980)

Pomme de terre	→	200 g
Glucose	→	20 g
Agar (gélose)	→	15 g
L'eau distillée	→	1000 ml

Milieu Caséine (g/100 ml) (Ronald, 2004)

NaCl	→	0.2 g
Extrait de levure	→	0.4 g
Peptone	→	0.8 g
Agar	→	3 g
Eau distillée	→	100 ml
Caséine	→	1 g

Solution de caséine (g/l)

Mg SO ₄	→	0.52 g
KCl	→	0.82 g
KH ₂ PO ₄	→	1.52 g
FeSO ₄	→	0.01 g
ZnSO ₄	→	0.01 g
Caséine	→	5 g

Réactif de Bradford

BBC G 250 —————> 100 ml

Ethanol absolu —————> 50 ml

Acide phosphorique à 85 % —————> 100 ml

Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.

ANNEXE D

Tableau III : La liste de matériel et produits utilisés lors de la pratique

Liste de matériel utilisé	Nom du fabricant	Pays fabricant
Agitateur magnétique	VELP SCIENTIFICA	EUROPE
Agitateur mécanique	Heidolph	Germany
Autoclave	Pbinternational	Milano Italie
Bain marie	memmert	Germany
Balance	RADWAG Wagi	
Centrifugeuse normale	Nuve	Ankara turkey
Centrifugeuse réfrigéré	CENTURION SCIENTIFIC	United kingdom
Etuve	memmert	Germany
Four pasteur	Trade Raypa	
Microscope	Labovision	Germany
pH mètre	BOECO	Germany
Plaque chauffante	Trade Raypa	
Spectrophotomètre	Rayleigh	Chine
Vortex	VELP SCIENTIFICA	Europe
Liste de produits utilisés		
Sulfate d'ammonium	Cheminova International.S.A	Madrid Espagne
Chlorure de potassium	EDEN_Labo	
Sulfate de cuivre	EDEN_Labo	
Tartrate de sodium et de potassium	EDEN_Labo	
NaOH	BIOCHEM Chemopharma	Quebec Montreal
TCA	BIOCHEM Chemopharma	Quebec Montreal
Tween 80	BIOCHEM Chemopharma	Quebec Montreal
Ethanol	BIOCHEM Chemopharma	Quebec Montreal

RESUME

La biosynthèse de protéase par la souche fongique : *Penicillium sp* par fermentation solide à base de son de blé a été étudiée. La production de cette enzyme est optimale après 144 heures d'incubation à 30°C.

La détermination des conditions optimales de l'activité coagulante par l'extrait coagulant brut : la température, le pH, la concentration en CaCl₂ et de la concentration en extrait a été étudié ainsi que leur stabilité thermique.

Mots clés : coagulation du lait, FMS, extraction, coagulase, caractérisation.

ABSTRACT

The biosynthesis of protease by the fungal stump: *Penicillium sp* by strong fermentation on the basis of wheat bran has been studied. The production of this enzyme is optimal after 144 hours of incubation at 30°C.

The determination of the optimal conditions of the coagulant activity by the raw coagulant excerpt: the temperature, the pH, the concentration in CaCl₂ and the concentration in excerpt has been studied as well as their thermal stability.

Keys words: Coagulation of milk, SSF, Extraction, Coagulase, Characterization.