



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnalisant
Filière : Sciences biologiques, Spécialité: Bioindustrie, Analyse et Contrôle

Par: BOULKROUNE Afaf
DEBBAH Abdelkader

Valorisation du lactosérum pour la production d'une enzyme coagulante du lait

Date de soutenance : 22 /07/2019

Jury d'évaluation:

Président de jury: Mme BELLIL Ines

Rapporteur : Mme BENCHIHEUB Meriem

Maitre de stage: Mme SEFARI Amel

Examinatrice : Mme HARZALLAH Besma

M.C.A Univ. Constantine 1.

M.C.B. Univ. Constantine 1.

Responsable de recherche et développement
.SAFILAIT

M.C.B. Univ. Constantine 1

La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information.

Albert Einstein

Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.

Marie Curie

Remerciements

Nous profitons de l'occasion de la présentation de ce mémoire pour exprimer nous haute gratitude à « ALLAH » de ce qu'il a été crédité, et atteint aujourd'hui et pour nous avoir donnés le courage et la patience durant ce travail

*Nous tenons dans un premier temps à exprimer nos plus vifs remerciements à notre promotrice **Mme Benchiheb Meriem M.C.B.** à l'université frères Mentouri Constantine 1 qui nous a guidées tout au long de l'élaboration de ce travail et pour ses précieux, efficaces conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion. C'est un immense honneur pour nous d'avoir effectué notre thème sous sa direction*

*Nous remercions **Mme BELLIL Ines M.C.A.** à l'université frères Mentouri Constantine 1 de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury*

*Nous tenons aussi à remercier **Mme Harzallah Besma M.C.B.** à l'université frères Mentouri Constantine 1 pour avoir accepté d'examiner ce travail et donc faire partie du jury de soutenance*

*Nous tenons à exprimer toute nos reconnaissances à **Mme Sefari Amel,** Responsable de recherche et développement. SAFILAIT, pour son accueil au sein de l'équipe contrôle qualité et sa disponibilité.*

On remercie également toute l'équipe pédagogique de la faculté SNV en générale et de département de la biologie appliquée en spéciale.

Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes que j'aime et en particulier :

A toute ma famille, mes parents : Ma mère Khedîdja, une femme qui a sacrifié sa vie pour ces enfants.

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

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

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

Mes frères : Med Tayeb, Tarek, Adem et sœur : Meriem, belle-sœur : Amina et leurs enfants.

A tous mes amis (es) en particulier : Ikram, Anis, Okba, Bilal, Ikram, Bouchra, Boutheina, Midou, Zinou, Tarek et Manar

A toutes la promotion de BAC 2018-2019 en particulier : Afaf, Farhan, Bibiche, Kenza, Khaoula, Fatima et Oumaima.

Abdelkader

Dédicace

A ma chère mère

A mon cher père

A toute ma famille et mes ami(e)s

Afaf

Liste d'abréviations

AFNOR : agence française de normalisation.

BSA : bovine sérum albumine.

D° : degré Dornique.

mM : milli-Molaire.

OGA : gélose glucosée à l'oxytétracycline (oxytétracycline glucose agar).

PDA : gélose dextrose à la pomme de terre (Potato dextrose agar).

rpm : rotation par minute.

TCA : tri-chloro-acide.

UI : unité internationale.

UP : unité présure.

Liste des figures

Figure	page
Figure 1 : schéma de la structure secondaire de la caséine κ	15
Figure 2 : phases de la coagulation enzymatique du lait.....	16
Figure 3 : structure de l'hyphe	19
Figure 4 : schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure.....	20
Figure 5 : classification des mycètes.....	21
Figure 6 : les grands groupes des eumycètes.....	25
Figure 7 : schéma des têtes aspergillaires.....	
Figure 8 : aspect morphologique des souches d' <i>Aspergillus</i> sp .mise en culture sur milieu OGA pendant 7 jours.....	36
Figure 9 : aspect des halos de protéolyse des champignons déposés en touche sur milieu agar – lait.....	37
Figure 10 : effet du pH sur l'activité coagulante.....	41
Figure 11 : effet de la température sur l'activité coagulante.....	42
Figure 12 : effet de CaCl_2 sur l'activité coagulante.....	43
Figure 13 : effet de NaCl sur l'activité coagulante.....	44

Liste des tableaux

Tableau	Page
Tableau 1 : composition de différents types de lactosérum.....	4
Tableau 2 : fermentations du lactosérum.....	8
Tableau 3 : exemples d'enzymes industrielles et de microorganismes producteurs.....	12
Tableau 4 : catégories de champignons selon leur gamme de température de développement.....	23
Tableau 5 : caractères macroscopiques des <i>Aspergillus</i>	24
Tableau 6 : principales caractéristiques microscopiques des espèces d'aspergillus.....	26
Tableau 7 : analyse physicochimique du lactosérum.....	37
Tableau 8 : dosage d'activité protéolytique et la teneur en protéines	38
Tableau 9 : résultats de l'évaluation de l'activité coagulante en comparaison avec la présure	40

Sommaire

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

1

Synthèse bibliographique

1. Lactosérum	3
1.1. Définition	3
1.2. Différents types de lactosérum.....	3
1.3. Composition biochimique du lactosérum.....	3
1.4. Valorisation.....	4
1.4.1. Utilisation du lactosérum à l'état brut.....	4
1.4.2. Utilisation lactosérum traité.....	5
1.4.3. Fermentations diverses du lactosérum.....	7
2. Enzymes	9
2.1. Origine des enzymes industrielles.....	9
2.2. Enzymes protéolytiques.....	9
2.2.1. Définition.....	9
2.2.2 Classification.....	9
2.2.2.1. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	10
2.2.2.2. Selon le pH d'activité.....	10
2.2.2.3. Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif.....	10
2.3. Applications industrielles des enzymes.....	11
2.3.1. Applications alimentaires.....	13
2.3.2. 1.Préparation du fromage	13
2.3.3. Industrie de panification.....	13
2.3.4. Applications médicales et pharmaceutiques.....	13
2.3.5. Autres applications.....	13
2.3.5.1. Détergents.....	13
2.3.5.2. Tanneries.....	14
2.3.5.3 Traitement de divers rejets.....	14
3. Coagulation du lait	14
3.1. Coagulation acide	14
3.2. Coagulation enzymatique.....	14
3.2.1. Enzymes coagulantes d'origine animale	15
3.2.2. Enzymes coagulantes d'origine végétale.....	17
3.2.3. Enzymes coagulantes d'origine microbienne	17
3.3. Coagulation mixte.....	18
4. Généralité sur les moisissures	18
4.1. Moisissures	18
4.2. Structure	19
4.3. Cycle de vie des moisissures	19
4.4. Classification.....	20
4.5. Habitat et conditions de développement.....	21
4.5.1. Conditions de croissance des moisissures.....	21
4.6. Genre aspergillus	23
4.6.1. Taxonomie des Aspergillus.....	23
4.6.2. Identification morphologique.....	24

4.6.3. Principales espèces.....	26
4.6.4. Application	27

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique	29
1.1.Revifcation de l'Aspergillus	29
1.1.Mise en évidence de l'activité protéolytique des souches.....	29
2. Prélèvement et analyses physicochimiques du lactosérum	29
2.1.Prélèvement.....	29
2.2.Analyses physicochimiques du lactosérum.....	30
2.2.1.Détermination de pH.....	30
2.2.2. Mesure de l'acidité.....	30
2.2.3. Teneur en matière sèche totale.....	30
2.2.4. Détermination de la matière grasse (méthode de Gerber) (AFNOR 1980)	30
2.2.5. Teneur en protéines.....	31
3.Milieu de culture et fermentation	32
3.1.Préparation du milieu de culture.....	32
3.1.1. Déprotéinisation du lactosérum.....	32
3.1.2. Enrichissement du milieu de fermentation	32
3.2. Lancement de fermentation	32
3.2.1. Ensemencement de milieu de fermentation	32
4. Extraction et purification de produit de fermentation	33
4.1. Extrait brut	33
4.2. Purification de l'enzyme.....	33
4.2.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	33
5. Méthodes de dosage	33
5.1.Dosage des protéines.....	33
5.2.Dosage de l'activité protéolytique.....	33
5.3.Evaluation de l'activité coagulante.....	34
5.3.1. Effet du pH sur l'activité coagulante	35
5.3.2. Effet de la température sur l'activité coagulante.....	35
5.3.3. Effet des ions calcium sur l'activité coagulante.....	35
5.3.4. Effet des ions sodium sur l'activité coagulante.....	35

Résultats et discussions

1. Revifcation des souches	36
1.1.Aspect macroscopique.....	36
1.2.Aspect microscopique.....	36
2.Mise en évidence de l'activité protéolytique	37
3.Analyses physico-chimiques du lactosérum	38
4.Dosages de l'activité protéolytique et le taux des protéines	39
5.Evaluation de l'activité coagulante en comparaison avec la présure	40
5.1.Effet du pH.....	42
5.2.Effet de la température	43
5.3.Effet des ions calcium.....	43
5.4.Effet des ions sodium	44
Conclusion	45
Références bibliographiques	47

Annexes

Résumés

Introduction

Introduction

L'industrie agro-alimentaire doit faire face à un problème devenu au fil de ces dernières années de plus en plus crucial. Il s'agit de : la pollution créée par les déchets et les rejets de cette industrie.

Le lactosérum est un sous-produit issu de la fabrication du fromage. En général, il est défini comme la partie du liquide ou du sérum de lait résiduel qui reste après la coagulation du lait et la séparation du caillé. En effet, le lactosérum représente environ entre 85 et 95% du volume du lait et conserve environ 55% des éléments nutritifs du lait (Lapointe-Vignola, 2002; Guimarães *et al.*, 2010).

Depuis 2013, la production algérienne de fromage est de 1540 tonnes, ce qui se traduit par une production d'environ 14 million de litre de lactosérum (FAO-ONU, 2017). Il présente un problème majeur comme étant l'un des rejets industriels les plus polluants à cause de la fermentation organique qui peut avoir lieu. Sa charge organique est très élevée et sa DBO (demande biologique en oxygène) oscille aux environs de 40 000 mg.l⁻¹ alors que la norme de rejet pour une entreprise traitant ses effluents de façon autonome est de 30 mg.l⁻¹ (Poirier, 1996). Ces quantités massives font de la gestion du lactosérum un enjeu à la fois économique et écologique. Économique puisque la gestion de chaque kilogramme de produit (le terme produit inclut produits finis, coproduits et sous-produits) représente un coût pour le transformateur industriel (Smithers, 2008).

Lorsque le lactosérum est déversé dans les cours d'eau (rivières, fleuves, etc.), cela génère une diminution du contenu en oxygène dissous, des problèmes d'eutrophisation et de toxicité modifiant les propriétés physico-chimiques des écosystèmes aquatiques (Valencia *et al.*, 2009; Córdoba, 2013).

En Algérie, l'inexistence d'une mise en valeur du lactosérum se pose avec acuité en raison de l'absence d'une réglementation stricte, émanant des pouvoirs publics, pouvant interdire le rejet de ce produit dans la nature.

Le développement de nouvelles technologies pour la valorisation du lactosérum est donc nécessaire.

Étant donné que le lactose est le principal composant des matières solides du lactosérum, divers procédés biotechnologiques ont été mis au point pour utiliser le lactosérum comme substrat pour produire des produits industriels importants tels que des enzymes, de la

biomasse riche en protéines, de l'éthanol, ou du biogaz (Vamvakaki *et al.*, 2010; Moulin et Galzy, 2013; Panesar *et al.*, 2013).

Les enzymes de type protéases sont largement distribuées dans la nature et peuvent être trouvées dans les microorganismes (bactéries, champignons, levures), les plantes et organes des animaux (Nagy *et al.*, 2001; Haider et Husain, 2007a), mais les enzymes d'origine microbienne montrent une productivité plus élevée (Rosolen *et al.*, 2015). Les enzymes obtenues à partir d'*Aspergillus* et de *Kluyveromyces* sont les principaux enzymes utilisée dans le milieu industriel (Klewicki, 2007).

Dans ce contexte, nous avons opté pour le choix de ce thème qui contribue à la valorisation d'un sous-produit disponible localement et qui fait l'objet d'un rejet dans la nature et qui menace l'environnement. Notre étude a pour but d'utiliser le lactosérum comme milieu de culture pour la production d'une enzyme coagulante du lait.

Pour cela, nous avons réalisé cette étude en trois parties :

- Etude de la composition physico-chimique du lactosérum doux brut provenant de l'unité de production SAFILAIT de fromage à pâte môle type «camembert» à Constantine.
- La production d'une protéase acide coagulante du lait sur un milieu à base de lactosérum par une souche fongique du genre *Aspergillus*.
- Et enfin, l'étude de l'effet de quelques paramètres sur la coagulation en utilisant l'enzyme produite.

Ce manuscrit contenant :

- La synthèse bibliographique : les concepts généraux par rapports aux lactosérum, la coagulation, les enzymes et les moisissures.
- Matériel et méthodes : l'analyse du lactosérum, la construction de milieu de fermentation, extraction et dosage des résultats de fermentation.
- Résultats et discussions : les résultats des analyses et fermentation.
- Conclusion et perspective.

***Synthèse
Bibliographique***

1. Lactosérum

1.1. Définition

Appelé autrefois petit lait, le lactosérum est un co-produit de l'industrie fromagère et de la préparation des caséinates (Jouan, 2002). Le lactosérum est un produit découvert il y a plus de 3000 ans avant Jésus-Christ, par des Bédouins lors du transport de lait. L'acidification et la coagulation par la chaleur provoquaient la formation d'une phase liquide au-dessus d'un caillé de lait (DeWitt, 2001). Le lactosérum représente 90% du volume original de lait utilisé en fromagerie et en est le principal sous-produit (Moletta, 2002).

Le terme lactosérum se rapporte au liquide translucide et jaune verdâtre qui se sépare du caillé (Heslot, 1996), après séparation des caséines par coagulation acide ou par processus enzymatique au moyen de la présure ou de la chymosine (Jouan, 2002).

1.2. Différents types de lactosérum

Selon le procédé d'obtention, différents types de lactosérums peuvent ainsi être obtenus. Ces lactosérums peuvent être classés en deux principales catégories selon l'acidité du liquide obtenu (Alais, 1984) :

- **Lactosérum doux** : dont l'acidité varie entre 15 et 22°D (pH=6,5). Ils sont issus de la production de pâtes pressées et/ou cuites ou molles (Sottiez, 1990).
- **Lactosérum acide** : obtenus lors de la fabrication des pâtes fraîches ou lors de la production des caséines atteignent 120 °D, soit un pH proche de 4,5(Sottiez, 1990).

1.3. Composition biochimique du lactosérum

La composition dépend du lait d'origine et du procédé de coagulation des caséines. Le tableau ci-dessous présente les chiffres approximatifs de la composition des sous-produits issus de la fabrication du fromage et de la caséine.

Tableau 1 : Composition de différents types de lactosérum (Sottiez, 1990).

	Lactosérum doux				Lactosérum acide
	Pate pressée cuite	Pate pressée non cuite	Camembert	Pate fraîche	Caséine
Liquide (%)	93,5	95	93,5	94	94
Extrait sec (%)	6,5	5	6,5	6	6
pH	6,7	6,5	6,1	6	4,6
Constituants (g/L)					
Lactose	76	75	75	65,5	74
Protéines	13,5	13,5	12	12	12
Cendres	8	8	8,25	9	12
Matière grasse	1	1	1	0,5	0,50
Acide lactique	1,80	2,80	2,20	10	18
Minéraux (%)					
Ca	0,60	0,65	0,70	1,90	1,80
P	0,60	0,65	0,70	1,50	1,50

1.4. Valorisation du lactosérum

Avec sa quantité considérable (80 % du lait), le lactosérum pose un problème majeure d'eau résiduaire dans les industries laitières ; mais avec les progrès des sciences on a ré-estimé la valeur nutritive de ce sous-produit qui a souffert autrefois d'un discrédit injustifié. (Alais, 1975). Son utilisation s'étale sur différents domaines, en particulier le domaine médical, le domaine alimentaire et le domaine biotechnologique.

1.4.1. Utilisation du lactosérum à l'état brut

Le lactosérum est un aliment intéressant, mais la teneur relativement élevée en matières salines constitue un inconvénient qui limite la consommation, à l'état brut, de ce produit par

l'homme. C'est la raison pour laquelle l'alimentation animale est restée pendant longtemps le débouché privilégié (Rerat *et al.*, 1984).

●Alimentation animale

Le débouché principal des lactosérums est l'alimentation des veaux et de façon plus fluctuante l'alimentation animale dans son ensemble (Mariotti *et al.*, 2004). C'est sur cette utilisation croissante que se sont penchées de nombreuses équipes de recherches spécialisées dans ce domaine, pour améliorer cette alimentation et diminuer les troubles gastro-intestinaux, ainsi :

L'utilisation du lactosérum fermenté avec *Lactobacillus acidophilus* pour l'alimentation des veaux, les volailles et les porcs a montré une meilleure croissance sans aucun désordre gastro-intestinal (Bernardeau *et al.*, 2009).

L'enrichissement des préparations par des protéines de lactosérum pour l'alimentation de bœufs et de vaches laitières (Linden G., Lorient D, 1994).

De nombreux travaux ont signalé le développement réussi d'un ensilage de paille avec le lactosérum pour l'alimentation des ruminants. (Bardy *et al.*, 2016)

●Alimentation humaine

L'incorporation du lactosérum dans la fabrication des laits fermentés : le lactosérum est impliqué dans la fabrication du yaourt et du leben comme remplaçant de l'eau dans le processus de reconstitution du lait à partir de la poudre du lait (Carreira *et al.*, 2002).

Boisson de lactosérum : le lactosérum pasteurisé a été additionné à cinq types de jus de fruits différents (orange, raisin, fraise, banane et pomme) en plus de l'ajout de saccharose et d'acide ascorbique. Les résultats ont montré la bonne qualité des boissons obtenues. (Vojnovic *et al.*, 1993).

1.4.2. Utilisation du lactosérum traité

L'un des développements les plus significatifs de l'industrie laitière concerne la transformation du lactosérum en de nombreux dérivés, dont les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles intéressent différents secteurs de l'industrie agroalimentaire, en dermatologie et en cosmétologie.

●**Utilisation du lactose**

- **Industries chimiques** : l'utilisation du lactose dans l'industrie chimique a été mise au point dans les années 70, où un procédé original de fabrication d'écumes de polyuréthane a connu une réussite importante. Ces écumes sont largement utilisées dans la construction, l'isolation thermique et phonique et la fabrication des emballages (Bardy *et al.*, 2016).

- **Industrie pharmaceutique** : l'utilisation du lactose raffiné de grandes quantités comme charge dans la préparation de nombreux médicaments. En effet le lactose est considéré comme l'un des glucides les mieux adaptés à la préparation des milieux de fermentation destinés au développement des moisissures dans la fabrication des antibiotiques (Cheftel *et al.*, 1992).

Industries alimentaires : le lactose utilisé dans l'industrie alimentaire, est de plus en plus diversifié, notamment en charcuterie, confiserie, boulangerie, biscuiterie et pâtisserie ; dans la fabrication des chips et des pommes de terre frites pour favoriser les réactions de brunissement et de caramélisation (Hoppe et Higgins, 1992; Sottiez, 1990)

- **Autres utilisations** : l'utilisation du lactose dans des aliments pour enfant, destiné à remplacer le lait maternel (Macrae *et al.*, 1993).

●**Utilisation des protéines**

Les protéines du lactosérum constituent 20% de la totalité des protéines constituant le lait (Morr, 1982; Bardy *et al.*, 2016). Elles sont composées de plusieurs types de protéines dont la β -lactoglobuline et l' α -lactoglobuline sont majoritaires. Les immunoglobulines, le sérum albumine bovine (BSA), le glycomacropéptide (GMP) et les protéoses-peptones font partie des constituants protéiques mineurs du lactosérum.

En industrie pharmaceutique la lactoferrine et la lactoperoxydase, ont des propriétés antibactériennes, sont utilisées pour fabriquer différents produits de désinfection destinés en oto-rhino-laryngologie, comme les solutions pour bain de bouche, les pastilles pour la gorge et les dentifrices (Bardy *et al.*, 2016).

La β -lactoglobuline peut remplacer le sérum de veau fœtal dans la culture de cellules d'hybridomes de souris avec des résultats satisfaisants tant en croissance qu'en production d'anticorps, avec un prix de revient beaucoup moins cher (Capiaumont *et al.*, 1994).

L' α -lactalbumine possède la propriété de lutter contre la déficience hormonale en sérotonine, puisqu'elle contient dans sa chaîne, en 4 exemplaires, un acide aminé rare, le tryptophane, qui rentre dans la composition de la sérotonine (Cosenza *et al.*, 2003)

- **Alimentation spécifique** ou généralement pour tous ceux qui pour une raison quelconque (ablation partielle de l'intestin, maladie immunodéficitaire, syndromes allergiques...) ne peuvent s'alimenter normalement, l'INRA (France) a mis au point, à partir du lactosérum, une solution nutritive composé uniquement de petits fragments protéiques, directement assimilables par l'organisme pour synthétiser les protéines dont il a besoin (Maubois, 1984).

Les protéines du lactosérum sont utilisées dans les laits infantiles pour augmenter le taux des protéines sériques (plus élevé dans le lait maternel que dans le lait de vache) (Fukumoto *et al.*, 1994).

Elles sont utilisées dans le monde du conditionnement physique et "bodybuilding", car ces protéines jouent un grand rôle dans la construction des fibres musculaires qui ont subi des micro-déchirures lors de l'entraînement (FAO, 1995).

Les protéines du lactosérum donnent d'excellents gels qui pouvant être utilisés dans certains desserts comme les glaces, les crèmes et les flans (Ju et Kilara, 1998). Elles sont également utilisées en boulangerie, biscuiterie, charcuterie et salaisonnerie pour l'apport protéique, leur valeur nutritionnelle, la rétention d'eau, leur pouvoir gélifiant et leurs propriétés moussantes (Plock et Kessler, 1992; Bardy *et al.*, 2016).

1.4.3. Fermentations diverses du lactosérum

Le lactosérum est un excellent milieu de culture, notamment pour tous les micro-organismes susceptibles de métaboliser le lactose. Il est exploité en nombreuses fermentations conduisant à des acides, des alcools, des enzymes, des vitamines, des boissons alcoolisées ou non ((Panesar & Kennedy, 2012). En effet, l'utilisation des micro-organismes a trouvé dans ces industries un champ d'application privilégié pour obtenir toute une gamme de produits de plus en plus de valeur (Hansen, 1980 ; Roukas *et al.*, 1991). Quelques types de fermentations réalisées jusqu'à présent sur le lactosérum sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Les fermentations du lactosérum (Yang et Silva, 1995; Benaissa, 2010).

Produits	Organismes	Milieu	Référence
P.O.U	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactosérum doux	Reinbold et Takemoto, 1988
	<i>Rhodospseudomonas spheroides</i>		
	<i>Bacillus megaterium</i>		
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactosérum acide	
	<i>Candida pseudotropicalis</i>	Lactosérum + E.L	
	<i>Lactobacillus casei</i> spp.		
	<i>rhamnosus</i>		
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>		
	Alcool	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		Lactosérum acide	
Bio-éthanol	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactosérum	Sooch et Singh, 2002
Levure de boulangerie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Perméat de lactosérum	Champagne et al, 1990
Acide lactique	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i>	Perméat de lactosérum acide + E.L	Mehaia et Cheryern, 1986
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Perméat de lactosérum	
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Lactosérum doux	
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lactosérum	
Acide acétique	<i>Streptococcus lactis</i>	Lactosérum + E.L	Chiarini et al., 1992
	<i>Clostridium formicoaceticum</i>		
Propionate	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Perméat de lactosérum	Yang et al., 1994
	<i>Propionibacterium</i> sp.	Lactosérum doux	
Polysaccharide	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i> RR	Lactosérum	Crow, 1988
	<i>Apiotrichum curvatum</i>		
Huile	<i>Candida curvata</i>	Perméat de lactosérum	Briczinski et Roberts, 2002
Enzymes	<i>Aspergillus niger</i>	Lactose	Ykema et al, 1988
β-Galactosidase	<i>Candida pseudotropicalis</i>	Lactosérum + E.L	Floetenmeyer et al, 1985
Acétone-butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Perméat de lactosérum + E.L	Ennis et Maddox, 1985
	Mutant d' <i>Escherichia coli</i>	Lactosérum	
Lysine	<i>Propionibacterium</i> sp	Perméat de lactosérum	Sobotkova et al., 1989
	<i>Propionibacterium shermanii</i>	Lactosérum doux + E.L	
Vitamine B12	<i>Aspergillus niger</i>	Perméat de lactosérum	Marwaha et al., 1983
Acide citrique	Mutant de <i>Candida norvegensis</i>	Perméat de lactosérum doux	Somkuti et bencivengo, 1981
	<i>K. fragilis</i>	Perméat de lactosérum	
Acide L-ascorbique	<i>K. marxianus</i>	Lactosérum doux	Jeng et al., 1989
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Perméat de lactosérum	
Glycerol	<i>Xanthomonas campestris</i>	Lactosérum doux	Rapin et al., 1994
		Perméat de lactosérum hydrolysé + E.L	
Insecticides			Salama et al., 1983
Gomme de Xanthane			Maldonado, 1992

P.O.U. : Protéines d'Organisme Unicellulaire

EL : Extrait de levure

2. Enzymes

2.1. Origine des enzymes industrielles

À cause de leurs nombreuses propriétés intéressantes, les enzymes sont de plus en plus utilisées dans le monde industriel. Dans plusieurs procédés industriels, les enzymes sont privilégiées car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés.

Également, les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau environnemental : biodégradabilité, action spécifique, faible toxicité et formation de sous-produits compatibles avec l'environnement (Barnabé, 2003).

Les enzymes industrielles sont d'origine végétale, animale ou microbienne (Meunier, 1999; Rao *et al.*, 1998; Coultouly, 1991). L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. C'est pourquoi la production d'enzymes à partir de microorganismes est privilégiée par les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants (Meunier, 1999).

2.2. Enzymes protéolytiques

2.2.1. Définition

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases. Elles catalysent le clivage des liaisons peptidiques des protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite, les acides aminés, offrant une multitude de structures (Barrett, 1994).

Au niveau industriel, c'est la classe d'enzyme la plus importante. En 1998, 75% des enzymes destinées à l'industrie étaient hydrolytiques (Rao *et al.*, 1998).

2.2.2 Classification

Selon la nomenclature de l'**Union internationale de Biochimie et Biologie moléculaire**, les protéases sont classées dans le sous-groupe 4 du groupe 3 (hydrolases) (E.C.3.4.X.X) .

Cependant, elles ne se soumettent pas facilement dans ce système de classification à cause de la complexité de leur structure et de leur mécanisme d'action ; leur classification se base sur plusieurs critères : le mode d'attaque de la chaîne, le pH d'activité et la nature de résidu impliqué dans le site actif (Rao *et al.*, 1998).

2.2.2.1. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique

En fonction de leur mode d'attaque, les protéases sont divisées en deux groupes :

- Les exopeptidases qui réalisent une hydrolyse à partir des extrémités N-terminale, ou C-terminale des peptides et libèrent soit un unique résidu d'acide aminé, soit un dipeptide ou un tri peptide (Scriban, 1999; Rao, 1998).
- Les Endopéptidases qui hydrolysent une liaison peptidique interne.

2.2.2.2. Selon le pH d'activité

Selon ce paramètre, les enzymes protéolytiques de différentes origines sont classées en trois groupes : les protéases acide, neutre et alcaline (Sumantha *et al.*, 2006).

2.2.2.3. Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif

Les protéases peuvent se classer selon la nature des résidus formant leurs sites catalytiques (Sumantha *et al.*, 2006). Les groupes les plus importants sont : les protéases à sérine, à aspartate, à cystéine, à glutamate et les métalloprotéases.

♦ Séril-protéases

Ce groupe d'enzymes est active dans une gamme de pH comprise entre 7 et 11. Se sont donc des protéinases alcalines parmi ces protéases il y a, la chymotrypsine, l'élastase, et la plasmine a partir de la source animale, et la protéase a serine à partir de la source microbienne. Ces enzymes ont en commun la présence des acides aminés la serine ou l'histidine dans leur site actif. Elles peuvent être inhibées par des molécules comme diisopropylfluorophosphate (DPFP) ou phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) (Belitz *et al.*, 2009).

♦ Aspartyl- protéases

Les protéases aspartiques, également connues sous le nom de protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu acide aspartique présent au site actif de l'enzyme. La plupart des protéases aspartiques ont une activité maximale à faibles pH, généralement entre 3 et 4. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 30 et 45 kDa (Rao *et al.*, 1998). La pepsine et la chymosine (rénine) appartiennent à cette famille (Pelmont, 1995).

♦ **Cystéyl-protéases**

Les représentants typiques de ce groupe d'enzymes sont la papaïne de *Carica papaya*, la bromélaïne d'*Ananas comosus* et la ficine de *Ficus latex*. Ces enzymes sont actives dans une large gamme de pH (entre 4,5-10). Le mécanisme d'activité de ces enzymes est similaire de celui des sérine-protéases. Les sérine-protéases sont fortement sensibles aux agents oxydants, elles sont utilisées en présence d'un agent réducteur (cystéine) et un agent chélateur (EDTA) (Belitz *et al.*, 2009).

♦ **Métalloprotéases**

Les métalloprotéases forment un groupe de protéases très variées. Ces enzymes contiennent un ion métallique divalent, le plus souvent le Zn^{2+} , nécessaire à leur activité. Les métalloprotéases sont habituellement des protéases dites neutres, ayant un pH optimum se situant près de 7,0. Toutefois, certaines métalloprotéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10 (Rao *et al.*, 1998).

2.3. Applications industrielles des enzymes

De nouvelles applications des enzymes dans les plus récents développements ; protéases dans les détergents, enzymes coagulantes substituants de la présure animale, glucose isomérase et amyloglucosidase en glucoserie (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

Le Tableau 3 illustre quelques exemples d'enzymes, des microorganismes qui les produisent et des applications industrielles qui en sont issues tandis que les sections subséquentes présentent un bref résumé des diverses applications des technologies enzymatiques.

Tableau 3 : Exemples d'enzymes industrielles et de microorganismes producteurs

Types d'enzymes	Microorganismes utilisés	Utilisation
Amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Saccharification de l'amidon
	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus roqueforti</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Boulangerie, conserve de fruits, textiles, papeterie
	<i>Rhizopus spp.</i>	Industries alimentaires
	<i>Bacillus subtilis</i>	Industries alimentaires
Invertases	<i>Saccharomyces carlbergensis</i>	Confiserie
Protéases	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus mucor</i>	Hydrolyse de protéines et de la gélatine
	<i>Bacillus subtilis</i>	Clarification de la bière
	<i>Pseunomodas Putida</i>	Tannerie
	<i>Clostridium spp.</i>	Blanchisserie
	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Détergents
Cellulases	<i>Trichoderma karungi</i> , <i>Myrothecium verrucarium</i>	Dégradation des aliments celluloseux, textiles
Pectinases	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Botrytis psp.</i>	Clarification des jus de fruit et des vins, industrie textile, accélération des filtrations
Lactases	<i>Candida pseudotropicalis</i>	Crèmes glacées
Lipases	<i>Candida lipolytica</i>	Fromagerie, laiterie
Penicillinase	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus anthracis</i>	Destruction de la pénicilline
Streptokynase	<i>Aspergillus candidus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Usages médicaux
Streptodornase	<i>Sachharomyces haemolyticus</i>	Usages médicaux
Catalase	<i>Acetobacter peroxydans</i>	Fabrication de matériaux poreux

2.4. Applications alimentaires

2.4.1. Préparation du fromage

L'industrie fromagère emploie une quantité importante de protéases (Rao *et al.*, 1998). Les protéases employées sont surtout des protéases acides. La majorité des protéases employées sont produites par *Mucor sp*, *Bacillus subtilis* et *Endothica parasitica*. Elles sont utiles pour la coagulation des protéines du lait. La présure de veau a longtemps été l'enzyme utilisée à cette fin. Cependant, elle est de moins en moins utilisée car elle provient du système digestif de très jeunes veaux. Comme il n'est pas économiquement viable de tuer les veaux aussi jeunes, elle tend à être remplacée par des protéases microbiennes.

2.4.2. Industrie de panification

La farine de blé est le composant principal dans l'industrie de panification. Il contient des protéines insolubles appelées gluten qui détermine les propriétés du pain. Les endos et les exopeptidases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour modifier par protéolyse, le gluten de la farine du blé (Bourgeois *et al.*, 1989).

2.4.3. Applications médicales et pharmaceutiques

Une grande diversité et spécificité des protéases a été exploitée pour le développement d'agents thérapeutiques. L'administration orale de protéases d'*Aspergillus oryzae* améliore la digestion suite à la déficience de certaines enzymes lytiques. L'utilisation de la subtilisine en combinaison avec les antibiotiques pour le traitement des brûlures et des blessures.

L'asparaginase isolée d'*Escherichia coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine du sang leucémique. La protéase alcaline de *Conidiobolus coronatus* est utilisée pour remplacer la trypsine dans les cultures de cellules animales (Chiplunkar *et al.*, 1985)

2.4.4. Autres applications

2.4.4.1. Détergents

A l'heure actuelle, les protéases sont ajoutées comme des ingrédients clé dans la formulation des détergents pour usage domestique (détergents à lessive, détergents à vaisselle), les produits de nettoyage pour usage industriel et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires.

La plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de *Bacillus* (Gupta *et al.*, 2002).

2.4.4.2. Tanneries

Les protéases sont utilisées dans les traitements de la peau à tanner par des solutions enzymatiques de protéases produites par *B. licheniformis*, *A. oryzae*, *B. amylolyquefasciens*.

Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002).

2.4.4.3. Traitement de divers rejets

Les protéases sont utilisées aussi pour le traitement des rejets riches en protéines. La protéase neutre de *B. subtilis* également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Des protéases sont aussi utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles (Ichida *et al.*, 2001).

3. Coagulation du lait

Le lait est consommé généralement à l'état frais mais il est aussi transformé. Les produits laitiers comprennent les laits fermentés (yaourt) par les microorganismes. Le lait est aussi transformé en fromage par coagulation.

La coagulation peut être acide, enzymatique ou mixte.

3.1. Différents types de coagulation

3.1.1. Coagulation acide

Le lait est coagulé en baissant son pH jusqu'à 4,6. L'acidification du lait provoque la destruction des micelles (larges agrégats colloïdaux du lait dont la taille varie de 10^6 à 10^9) sans fractionner la caséine. Les micelles sont déminéralisées par migration vers l'extérieur des éléments minéraux qu'elles contiennent (solubilisation du phosphate de calcium micellaire).

Au pH isoélectrique de la caséine entière (pH 4,6), la solubilisation du phosphate de calcium est totale, les ions H^+ provenant de la dissociation de l'acide neutralisent les charges des micelles et la caséine déminéralisée précipite sous forme de caséine isoélectrique (Banon et Hardy, 1991).

En fromagerie, la coagulation est réalisée soit par voie fermentaire à l'aide de bactéries lactiques (en effet sous l'action de bactéries lactiques, le lait s'acidifie progressivement). La coagulation acide est obtenue par ensemencement du lait avec des bactéries lactiques mésophiles à la dose de 1 à 3 % à la température de 18 à 25 °C.

3.1.2. Coagulation enzymatique

Au cours de la coagulation enzymatique, la caséine est hydrolysée. Elle a pour conséquence la coagulation sans modification du pH (Brulé *et al.*, 1997). La destruction des micelles n'est que progressive. Seule la caséine κ est hydrolysée (action sur la liaison phénylalanine105 - méthionine106). Deux phases successives de la coagulation ont été caractérisées (Cayot et Lorient, 1998):

- ♦ **une réaction primaire ou phase enzymatique** au cours de laquelle la chymosine hydrolyse la caséine κ et en solubilise une petite partie (caséino-glycopeptide). Elle n'exige pas la présence de calcium ionisé. La figure 2 présente la structure secondaire de la caséine κ .

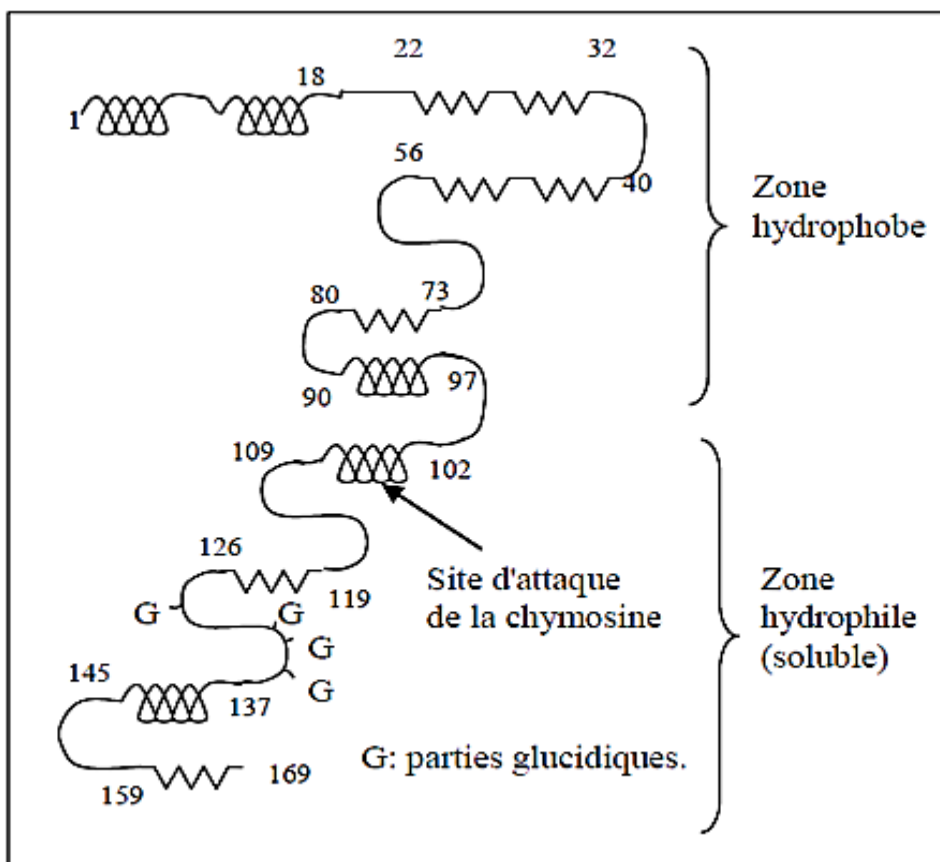


Figure 1 : Schéma de la structure secondaire de la caséine κ .

- **Une phase secondaire** ou phase de coagulation qui touche une grande partie des substances provenant de la réaction primaire. Elle exige la présence de calcium ionisé et se fait à une température supérieure à 4 °C. La figure 2 présente les différentes phases de la coagulation enzymatique du lait (Cayot et Lorient 1998).

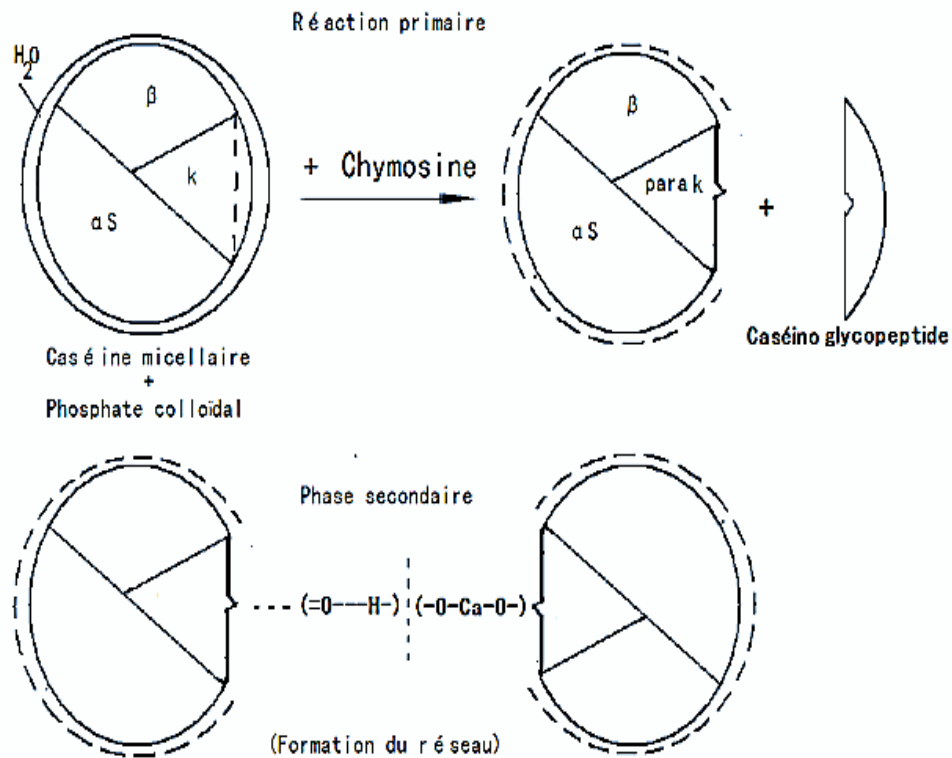


Figure 2 : Les phases de la coagulation enzymatique du lait

- ♦ **Une réaction tertiaire** au cours de laquelle la protéolyse est générale, suivie de la synérèse du coagulum qui est une phase physico-chimique s'accompagnant de la rétraction et de l'expulsion du lactosérum (Brulé *et al.*, 1997).

Diverses enzymes protéolytiques ont la propriété de coaguler le lait. Elles sont d'origine animale, végétale ou microbienne (Alais, 1975). Outre leur activité coagulante, spécifique sur la caséine, ces enzymes ont une activité de protéolyse générale pouvant se manifester sur toutes les protéines.

3.1.2.1. Enzymes coagulantes d'origine animale

- **Présure**

La présure est un mélange constitué essentiellement de chymosine (80 %) et de pepsine (20 %). La présure est une préparation thermolabile, sa dénaturation est rapide au-dessus de 55 °C (Dalglish, 1997).

- **Chymosine**

La chymosine est sécrétée par la caillette des jeunes ruminants non sevrés. La forme inactive de la chymosine est la prochymosine. Elle se transforme en enzyme active par un processus autocatalytique accéléré par les ions H⁺ (Otani *et al.*, 1991a et b).

La chymosine (EC 3.4.23.4) appartient à la classe des protéases à acides aspartiques et est utilisée pour coaguler le lait dans la production des fromages. Son mécanisme d'action est basé sur la rupture de la liaison Phe105–Met106 de la caséine κ bovine (Drohse et Foltmann, 1989; Roseiro *et al.*, 2003). Elle entraîne la déstabilisation des micelles de caséines (Daviau *et al.*, 2000). Il en résulte la coagulation du lait et la formation d'un coagulum notamment le fromage.

- **Pepsine**

C'est une enzyme sécrétée par la caillette des ruminants. Après le sevrage, la caillette secrète beaucoup de pepsine et très peu de chymosine.

La pepsine (EC 3.4.23.1) est une protéase très acide. L'optimum pour l'activité protéolytique est voisin de 2,0. Elle est inhibée à des valeurs de pH supérieur à 6,6. Elle coupe de préférence entre 2 acides aminés hydrophobes et aromatiques (Oner et Akar, 1993).

3.1.2.2. Enzymes coagulantes d'origine végétale

Plusieurs préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures (Ramet, 1997). L'utilisation de la fleur de cardon comme agent coagulant a été considérée comme l'un des facteurs déterminants de la qualité des fromages typiques portugais au lait de brebis (Agboola, 2002, Zhao *et al.*, 2003) l'extrait coagulant du *Cynara cardunculus* a fait l'objet de nombreuses études (Macedo *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1996; Vioque *et al.*, 2001), l'extrait coagulant du *Onopordum Acanthium* (Benchiheb *et al.*, 2016).

Ces agents coagulants se caractérisent par une activité protéolytique excessive ce qui confère un goût amer au fromage. D'autres végétaux fournissent des coagulases telles que les ficines extraites du latex du figuier, la papaine du papayer, la bromélaïne de l'ananas (Sardinas, 1968).

Les protéases végétales sont rarement utilisées en industrie fromagère en raison de leur activité protéolytique très élevée, qui se traduit par l'apparition d'un ensemble d'inconvénients technologiques tels que (Alais, 1984): mauvaise fermeté des caillés obtenus, baisse du rendement fromager, apparition d'amertume.

3.1.2.3. Enzymes coagulantes d'origine microbienne

De nombreuses bactéries et moisissures sont utilisées pour produire des enzymes coagulantes. Leur aptitude à la fromagerie est meilleure que celles des enzymes d'origine végétale ou animales. Les bactéries les plus utilisées sont *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus sphaericus* (El-Bendary *et al.*, 2007). Elles secrètent des protéases, des amylases et des saccharases.

Les enzymes fongiques les plus connues sont celles issues de *Cryphonectria parasitica* (Trujillo *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004), *Endothia parasitica* ou moisissure parasite du châtaignier, *Mucor miehei* ou moisissure banale thermophile du sol ou *Rhizomucor miehei* (Trujillo *et al.*, 2002; Reys *et al.*, 2006), *Mucor pusillus* ou moisissure banale mésophile du sol.

3.3. Coagulation mixte

La coagulation mixte est réalisée par action conjointe des enzymes coagulantes et de l'acide lactique. Cependant la formation du coagulum se fait généralement sous l'action dominante des enzymes. Cette coagulation nécessite des températures variant de 28 à 32 °C (Noël *et al.* 1990)..

4. Moisissures

4.1. Généralités

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme. Ils sont ubiquitaires. Les aliments sont généralement des milieux très favorables à leur développement (Dao, 2005). Plusieurs

moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des enzymes et des métabolites secondaires (Doyle *et al.* 1998 ; Meyer *et al.* 2004).

4.2. Structure

La structure des champignons repose sur leur appareil végétatif appelé thalle, constitué d'hyphes ou cellule allongées en forme de filaments tubulaire de 2 à 10 micromètre de diamètre .ces hyphes comprennent les organites classiques d'une cellule : noyau, mitochondries, cytoplasme, vésicules .ils peuvent être cloisonnés ou non et leur association forme le mycélium (figure 3) (Chabasse *et al.*, 2002 modifié)

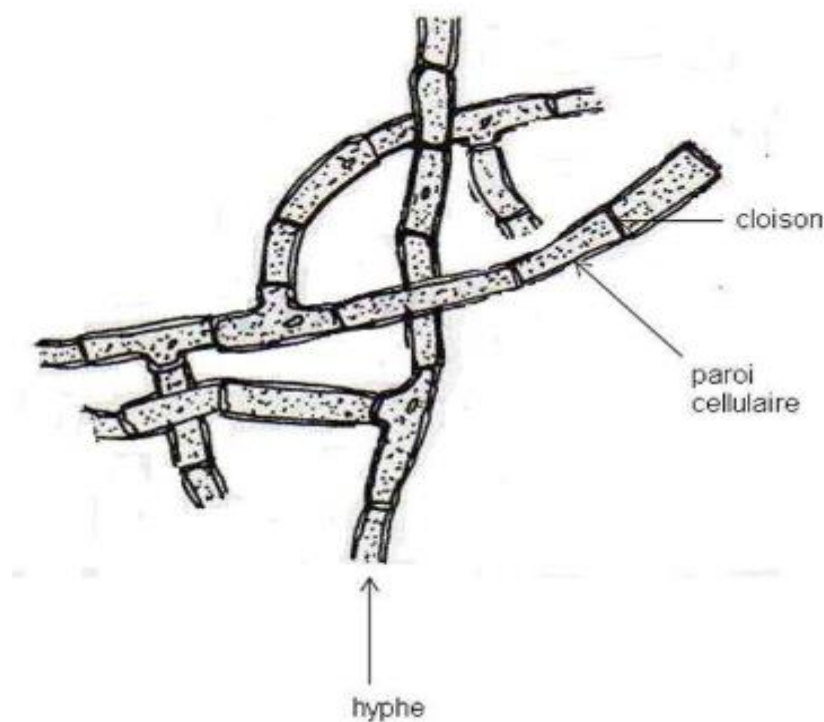


Figure 3 : Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium, (Chabasse *et al.*, 2002 modifié)

4.3. Cycle de vie des moisissures

Le cycle de vie comprend deux types de reproduction :

- ♦ Une reproduction asexuée, au cours de laquelle une spore ou un mycélium croît et se développe sur un substrat (figure 4), le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées.
- ♦ la reproduction sexuée, implique la rencontre de deux mycélium de signes sexuels opposés. Un mycélium à n chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à $2n$ chromosomes. (Guiraud, 1998 ; Dao, 2005).
- ♦ Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores.

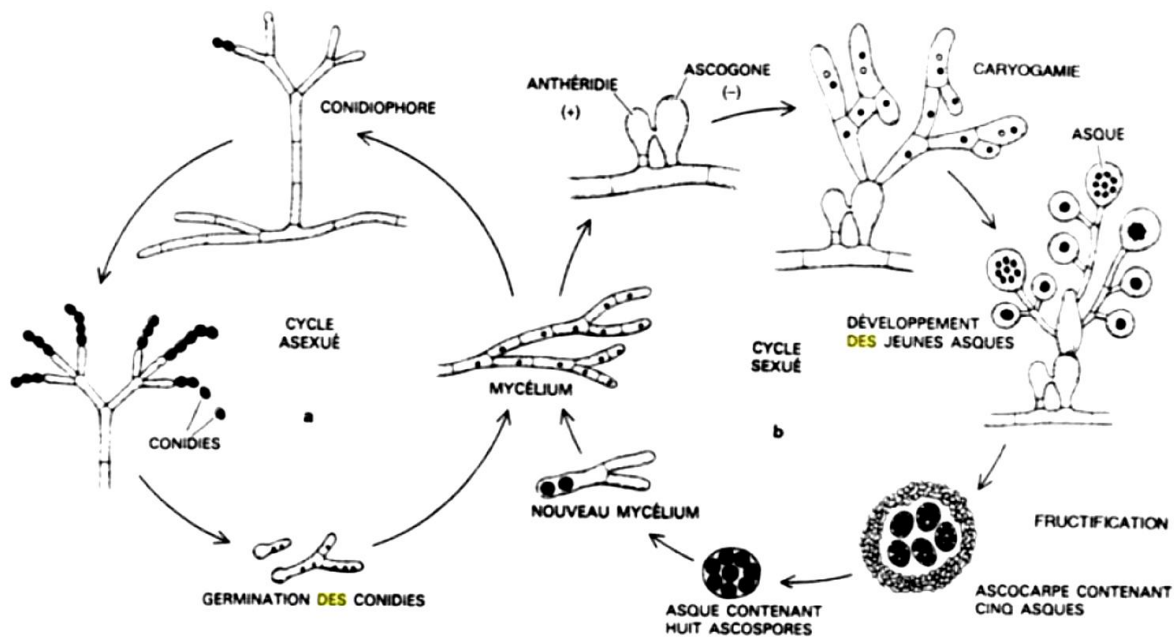


Figure 4 : Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure (Roquebert 2002 modifié).

4.4. Classification

La classification des moisissures, tout comme celle des autres champignons, est d'abord basée sur le mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Ce critère définit quatre des cinq ordres des mycètes, soit les *Chytridiomycètes*, les *Zygomycètes*, les *Basidiomycètes* et les *Ascomycètes* (Figure 5) (Bourgeois *et al.*, 1989),

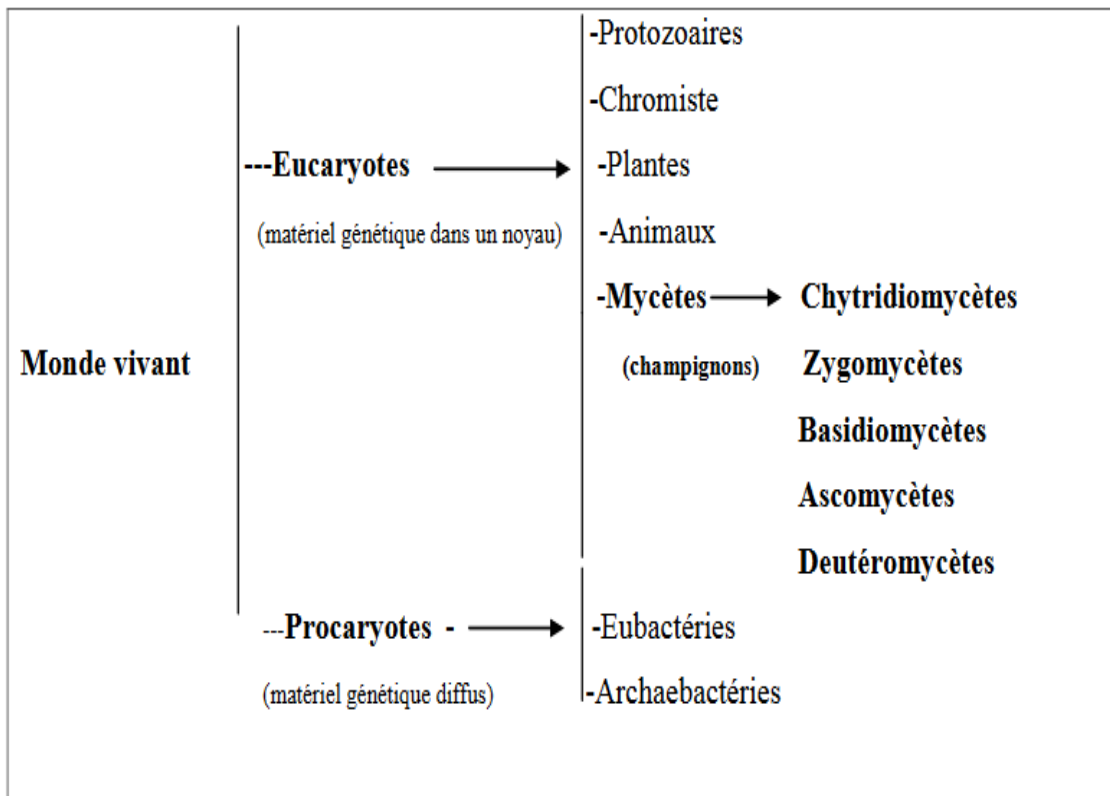


Figure 5 : Classification des mycètes (champignons) (Blackwell *et al.*, 1998)

4.5. Habitat et conditions de développement

Le développement des moisissures est dépendant de facteurs nutritifs et environnementaux. Les champignons filamenteux étant cosmopolites et hétérotrophes, ils présentent différents types d'habitat au sein desquels ils vont établir des interactions différentes avec leur environnement et il existe donc différents modes de nutrition des champignons filamenteux.

Les éléments nutritifs les plus importants sont le carbone et l'azote comme composés organiques, les ions minéraux comme le potassium, le phosphore, le magnésium, le fer ou le soufre. Les acides aminés peuvent pénétrer dans la cellule sans transformation, alors que des molécules complexes comme l'amidon, la cellulose ou les protéines nécessitent une digestion

enzymatique préalable. Cette digestion s'effectue par production d'enzymes ou d'acides par les moisissures, permettant ainsi une altération du substrat (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000).

4.5.1. Conditions de croissance des moisissures

Les conditions optimales de croissance peuvent varier d'une espèce à l'autre, chacune d'entre elles ayant un degré différent d'adaptation à son environnement.

La majorité des moisissures sont peu exigeantes quant aux éléments nutritifs nécessaires à leur croissance.

- ♦ **Activité de l'eau**

Les spores ne germent pas lorsque la teneur en eau d'un substrat est inférieure à 13% ou 14% cependant, les exigences et la tolérance vis-à-vis de l'eau sont variables selon les groupes :

Certaines moisissures ne se développent que sur substrat humide, c'est le cas par exemple des mucorales ;

D'autres peuvent proliférer sur des substrats dont l'humidité est très faible. Ce sont les moisissures xérophiles qui rassemblent les espèces les plus osmophiles. Parmi ces espèces, les mieux adaptées aux substrats secs sont les *Aspergillus* (Leyral et Vierling, 2001).

- ♦ **pH**

La majorité des espèces se développent dans des zones de pH assez larges, entre 3 et 8 (Florent, 1993). La croissance de champignon était maximale à un pH=5,6 (Keffer *et al.*, 1997).

- ♦ **Présence Oxygène**

Les moisissures se développent normalement dans les conditions aérobies (Florent, 1993). Les champignons sont des microorganismes aérobies ; ils ont besoin d'oxygène pour une croissance normale. Toutefois, leur développement est peu affecté par des teneurs de 10 fois plus faibles (2,1%) que celle de l'atmosphère. En conséquence, certaines espèces de moisissures pourront se développer sur les denrées alimentaires conservées dans une atmosphère pauvre en oxygène (Botton *et al.*, 1990). Par exemple, *Aspergillus flavus* peut se développer dans une atmosphère qui contient 61,7% CO₂, 8,7% O₂ et 29,7% N₂.

♦ **Température**

Les moisissures sont généralement mésophiles : la croissance des hyphes est optimale à 20-25°C. En dehors de cet intervalle de température les hyphes se développent plus lentement. Les spores de moisissures mésophiles ne peuvent pas germer à une température inférieure à 5°C, mais elles peuvent résister longtemps aux basses températures allant jusqu'à -20°C (Nicklin *et al.*, 2000, Julien, 2002)

Les espèces thermophiles sont plus rares. C'est le cas de *Aspergillus flavus*. La température optimale pour sa croissance est comprise entre 25 et 35°C, mais cette moisissure peut se développer bien dans un intervalle plus large (15-45°C) et parfois jusqu'à 50°C (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

Tableau 4 : Catégories de champignons selon leur gamme de température de développement (Roquebert. 1997).

Types de champignons	Game de température	Température optimale
Mésophiles	0 à 50°C	15 à 30°C
Thermophiles	20 à 50°C	35 à 40°C
Thermotolérants	0 à 50°C	15 à 40°C
Psychrophiles	0 à 20°C	0 à 17°C

♦ **Lumière**

La lumière favorise la maturation des conidies et la germination des spores. Les moisissures sont, généralement, indifférentes à l'action de lumière (Leveau et Bouix, 1993).

4.6. Genre *Aspergillus*

4.6.1. Taxonomie des *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* appartient au règne des Fungi, au phylum des *Ascomycota*, à la classe des *Eurotiomycètes*, à l'ordre des *Eurotiales* et à la famille des *Trichocomaceae* (Samson *et al* ,2014).

Il s'agit de champignons microscopiques (micromycètes) filamenteux ou moisissures, au mycélium cloisonné (septomycètes) hyalins présentant une reproduction sexuée avec formation d'asques contenant chacun 8 ascospores (ascomycètes), et une reproduction asexuée avec formation de structures conidiogènes (cellules productrices des conidies) spécialisées

appelées phialides. Ces dernières sont organisées en « têtes aspergillaires », qui caractérisent le genre *Aspergillus* (Bennett J, 2010).

Raper et Fennell, en 1965, avaient recensé environ 150 espèces décrites sur des critères essentiellement morphologiques (macroscopie et microscopie des cultures). Parmi elles, *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus fréquemment isolée en pathologie humaine, suivie d'*A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* et *A. nidulans* (Raper, Fennel; 1965).

4.6.2. Identification morphologique

4.6.2.1. Morphologie macroscopique : caractères cultureux

Les critères macroscopiques pour l'identification d'espèce comprennent la vitesse de pousse, l'aspect et la couleur des colonies recto et verso (Tableau 12).

Les *Aspergillus* ont une croissance plus ou moins rapide sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques. Si nécessaire, leur fructification peut être stimulée par repiquage de la colonie sur gélose à l'extrait de malt (Malt Extract Agar MEA).

Après 24 à 48 heures de culture, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens blancs. Les colonies prennent leur couleur caractéristique après 48 à 96 heures avec la maturation des spores. (Chabasse *et al.*, 2002).

Tableau 5 : Caractères macroscopiques des *Aspergillus*

Caractères morphologiques	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. versicolor</i>
Culture recto	Poudreuse Vert-bleuté à gris noirâtre	Duveteuse Vert jaune	Duveteuse à poudreuse Vert cresson	Granuleuse Noire	Duveteuse à poudreuse Blanc puis jaune ocre	Blanc puis de couleur varié : rosée, jaunâtre ou verte
Culture verso	Incolore, jaune, vert ou brun selon les souches	Incolore, rosé ou brun-rouge foncé	Pourpre, rougeâtre	Incolore à jaune pâle	Ocre à rouge	Incolore ou variant du jaune au brun
Conditions de croissance	Croissance très rapide en 24-48h Optimum thermique de 40-42°C (pousse jusqu'à 57°C)	Croissance rapide en 2-3 jours Optimum thermique à 37°C	Croissance rapide en 3-5 jours Optimum thermique à 25-30°C (pousse aussi à 37°C)	Croissance rapide en 2-3 jours Optimum thermique à 25-30°C (pousse jusqu'à 42°C)	Croissance rapide en 3-5 jours Optimum thermique à 25-30°C (pousse aussi à 37°C)	Croissance lente en 5-7 jours Optimum thermique à 25-30°C (pousse jusqu'à 40°C)

4.6.2.2. Morphologie microscopique

L'identification microscopique d'*Aspergillus* repose sur l'observation des formes asexuées des champignons au microscope à l'objectif 20x ou 40x. Les éléments sont observés en prélevant les colonies filamenteuses et poudreuses avec un scotch. Elles sont déposées ensuite dans une goutte de bleu de lactophénol entre lame et lamelle. Les filaments mycéliens, les organes de fructification et les spores sont ensuite analysés.

Le genre *Aspergillus* est caractérisé par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens, ou hyphes. Les conidiophores sont produits à partir des hyphes végétatifs et se terminent par une vésicule portant les cellules de la conidiogénèse, les phialides. Ces phialides sont insérées soit directement sur la vésicule, soit sur les métules. Elles produisent les spores ou conidies nécessaires à la reproduction asexuée du champignon.

L'ensemble vésicule, phialide, conidies forme la tête aspergillaire qui caractérise le genre *Aspergillus* (Figure 6). Les spores sont toujours unicellulaires, de forme variable, mesurant 2 à 5 µm de diamètre et sont plus ou moins pigmentées (Chabasse *et al.*, 2002):

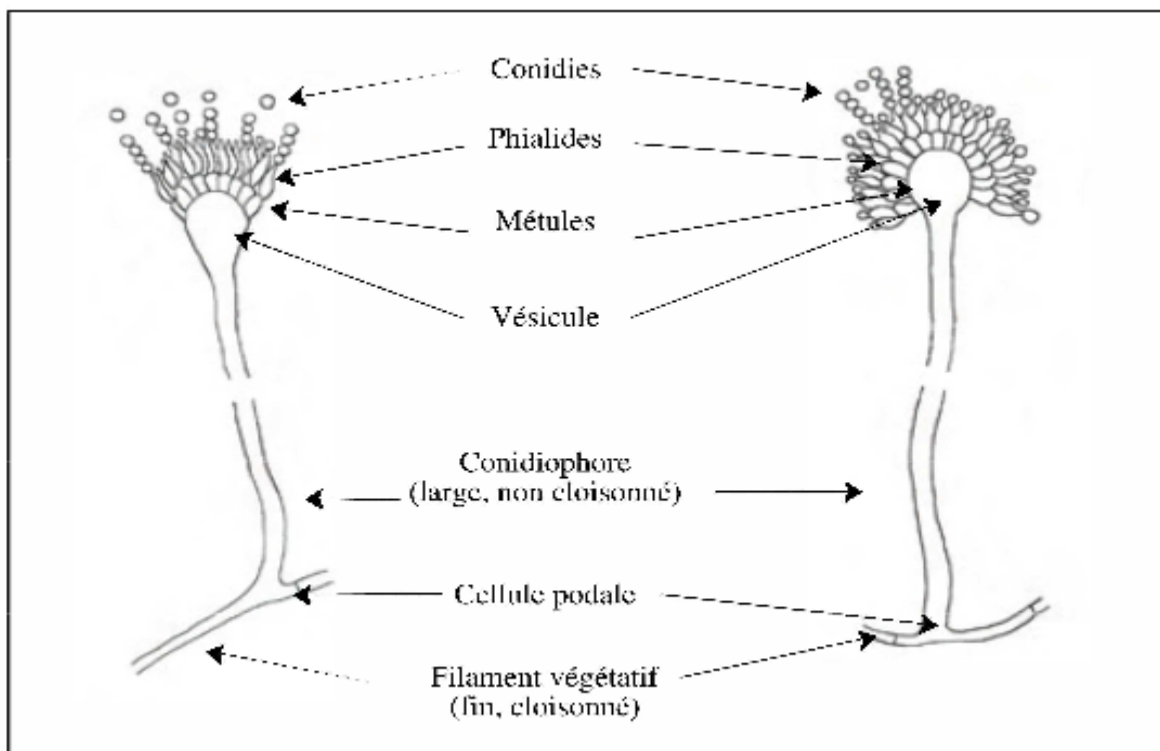


Figure 6 : Caractères morphologiques des *Aspergillus* (Chabasse, 2002).

Tableau 6 : Principales caractéristiques microscopiques des espèces d'Aspergillus

Caractères morphologiques	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. versicolor</i>
Conidiophore	Court, 300 µm, lisse et incolore, avec évasement progressif au sommet	Long, 1 mm à 2,5mm, verruqueux avec aspérités	Brun, lisse, sinueux, très petit (75 à 100 µm)	Lisse, hyalin ou brunâtre, très long (1.5 à 3 mm)	Lisse, incolore, court, 100 à 250 µm	Lisse, jaunâtre, long (500 à 700 µm)
Vésicule	Hémisphérique, 20 à 30 µm	Sphérique, 25 à 45 µm	Sphérique	Globuleuse, 30 à 100 µm	Globuleuse	Ovale, 12-16 µm
Phialides	Directement portées sur la vésicule, dressées, densément groupées	Directement sur la vésicule ou portées par des métules	Portées par des métules, sur la partie supérieure de la vésicule	Portées par des métules, disposées sur tout le pourtour de la vésicule	Portées par des métules, sur la partie supérieure de la vésicule	Portées par des métules, disposées sur tout le pourtour de la vésicule
Conidies	Globuleuses, vertes, échinulées, petites (2,5 à 3 µm)	Globuleuses à subglobuleuses, vert pale, échinulées, 3,5 à 4,5 µm	Rondes, vertes, échinulées. Souvent disposées en chaîne, 3-3,5 µm	Globuleuses, 3,5-5 µm, brunes, échinulées à très verruqueuses, souvent disposées en chaîne	Lisses, globuleuses à légèrement elliptiques, petites (1,5 à 2,5 µm)	Globuleuses, 2 à 3,5µm, échinulées
Tête aspergillaire	Unisériée, en colonne compacte assez grande (jusqu'à 100 µm)	Bisériée ou unisériée, (300-400 µm), radiée	Bisériée en colonne, courte et compacte	Bisériée ou radiée, noire à maturité	Bisériée, en colonne évasée (aspect d'éventail)	Bisériée, radiée N.B : Présence de pinceaux évoquant <i>Penicillium</i>

4.6.3. Principales espèces

❖ *Aspergillus flavus*

Caractères culturels : Le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et Sabouraud) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C. Sur le milieu de culture *A. flavus* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers peut être incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés.

Morphologie microscopique : Les têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis réparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long. Les vésicules sont sub-globuleuses, et mesurent 25 à 45 µm de diamètre. Les phialides (6-10 x 4-5,5 µm) sont directement insérées sur la vésicule (unisériées) ou portées par des métules.

Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, de 3-6 µm de diamètre, de couleur verte pâle, verruqueuses. Les sclérotés, fréquents dans les isolats récents, sont globuleux à sub-globuleux, d'abord blanc puis virant au brun-rouge foncé et au noir. (Chabasse *et al.*, 2002)

❖ *Aspergillus fumigatus*

Caractères culturels : mycélium à croissance rapide sur les milieux de culture classiques à 37°C. *A. fumigatus* est une espèce thermotolérante dont la température de croissance est comprise entre 15 et 48°C ; la température optimale étant située aux alentours de 40 et 42°C. Cette espèce peut se développer jusqu'à 57°C (Morin, 1994). *A. fumigatus* forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers peut être incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches.

Morphologie microscopique : Les têtes conidiennes, strictement unisériées, en colonne compacte sont d'abord bleu-vert puis virant au vert bronze. Les conidiophores sont courts (300-500 µm), lisses, s'élargissent insensiblement au sommet en formant des vésicules sub-hémisphériques. Ces dernières (20-30 µm en diamètre), vertes, sont fertiles dans leur moitié supérieure. Les phialides dressées, sont densément groupées, de couleur verte. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, mesurent 2(2,5)-3 (3,5) µm de diamètre, et sont échinulées.

4.6.4. Utilisation

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la fermentation de divers substrats et la production d'enzymes ou d'acides organiques :

-*Aspergillus awamori*, agent lipolytique d'oléagineux, est utilisé fréquemment au Japon pour la fermentation alcoolique. (Botton *et al.*, 1990).-*Aspergillus niger* est utilisé dans les processus biotechnologiques pour la synthèse de différents acides comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes : alpha-amylase, beta-glucanase, catalase, glucose oxydase, lipase, pectinase, polygalacturonase. (Botton *et al.*, 1990).

Aspergillus oryzae : les plus importantes enzymes de la takadiastase sont les alpha -amylase, les protéases et la préparation commerciales contiennent habituellement les deux types d'enzymes en quantité appréciable. La takadiastase est utilisé principalement pour fabriquer des préparations digestives et dans l'industrie boulangère. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont aussi employées en médecine pour la dissolution des caillots sanguins.

(Botton *et al.*, 1990).

Aspergillus fumigatus : considérée parmi les souches thermophiles ou thermo tolérantes, capable de produire des amylases et des protéases qui sont plus thermostables que les enzymes des champignons mésophiles pourrait en être la solution (Lamrani, 2009).

Aspergillus flavus : une formule d'enzymes digestives, qui aident à maximiser la digestion des protéines, des gras et des glucides s'appelle *Digestzymes*. Ce produit aide à la dégradation de la casomorphine (de la caséine) et de la glutomorphine (du gluten). Cette formule contient principalement Peptidase (DPPIV) (protease, *Aspergillus flavus*). (L*Officine, officine.ca/boutique/fr, 2019)

***Matériels et
Méthodes***

1. Matériel biologique

Les deux souches utilisées dans ce travail sont des souches fongiques du genre *Aspergillus* faisant partie de la collection du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité microbienne (LaMyBAM) (université Constantine 1, faculté SNV, département : biologie appliquée)

1.1. Revivification et identification de l'*Aspergillus*

Afin d'effectuer une première observation des souches, des cultures en milieu solides ont été réalisées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé OGA (composition Annexe 01) utilisant la technique des disques. Des observations des caractères macroscopiques et microscopiques de chacune des souches ont été réalisées.

Les observations microscopiques sont effectuées grâce à une technique couramment utilisée. Cette technique consiste à prélever, à partir d'une culture sur boîte, avec une anse de platine stérile, un fragment de colonie (périphérie) qui contenant des conidies et des fragments de mycélium, déposé sur une lame contient une goutte de bleu de coton, qui colore spécifiquement la chitine présente dans les parois des hyphes.

1.2. Mise en évidence l'activité protéolytique des souches

Le test est réalisé à partir des cultures des deux souches en milieu PDA (Annexe 02), les prélèvements sont ensemencés en touche sur milieu agar – lait.

Le milieu agar – lait est composé de l'agar blanc (4g d'agar dans 180 ml d'eau distillée) additionné stérilement de 11% de lait reconstitué stérile. Ensuite incubation à 30°C pendant 48h.

Expression des résultats :

Le caractère protéolytique des champignons cultivés en milieu solide est révélé par l'apparition des halos de protéolyse. Les halos sont ensuite mesurés et la souche qui possède le diamètre le plus large est la souche retenue pour la suite des expériences.

2. Prélèvement et analyses physicochimiques du lactosérum

2.1. Prélèvement

Le lactosérum frais provenant de la fabrication de fromage à pâte molle type "Camembert" est prélevé à partir de l'unité de production fromagère SAFILAIT de la région d'Ain Smara - Constantine.

2.2. Analyses physicochimiques du lactosérum

Les analyses physicochimiques du lactosérum ont été réalisées dans l'unité de production laitière et fromagère SAFILAIT dans la zone industrielle nouvelle ville ALI MENDJLI-Constantine le lendemain après le prélèvement, ou le lactosérum était conservé à une température de 4°C.

2.2.1. Détermination de pH

La détermination du pH de lactosérum brut est effectuée par une lecture directe à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné.

2.2.2. Mesure de l'acidité

L'acidité est dosée, après avoir mesuré le pH, par titration avec la soude N/9 en présence de quelques gouttes de phénophtaléine. Le volume de soude utilisé pour obtenir le virage de la couleur au rose pâle est alors noté et les résultats sont exprimés en degrés Dornic suivant la relation : Acidité °D = $V_{\text{NaOH}} \cdot 10$ (Benaïssa, 2018)

Avec V_{NaOH} : volume de la soude utilisé pour titrer 10 ml de l'échantillon.

2.2.3. Teneur en matière sèche totale

3 g de lactosérum sont bien étalés sur la plaque du dessiccateur automatique et standard après la mise en marche on attend 15-20 minutes, ensuite on lit directement le résultat exprimé en pourcentage.

2.2.4. Détermination de la matière grasse (méthode de Gerber) (AFNOR 1980)

La matière grasse est dosée par la méthode Gerber. Le lactosérum (10ml) est agité dans un Butyromètre Gerber, avec de l'acide sulfurique (10 ml) et de l'alcool iso amylique (2ml) qui facilite la séparation de la matière grasse. (Lachebi, 2009).

Après la centrifugation – 10 min ,1500 rpm -par une centrifugeuse FUNKE Gerber la matière grasse se rassemble dans la partie graduée du butyromètre et forme une couche claire et sa teneur est déterminée par la lecture directe sur l'échelle du butyromètre.

2.2.5. Teneur en protéines

Le réactif de Folin-ciocalteu réagit avec les acides aminés aromatiques présents dans les protéines. L'absorbance du produit coloré est lue à 750 nm Lowry (1951) cette méthode repose sur le principe de coloration.

La coloration bleue/violette obtenue lorsqu'on met le réactif de Folin-Ciocalteu en présence de protéines est due à deux réactions.

La première réaction, réaction de Biuret, dans laquelle Cu^{2+} , en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleu-profond,

La deuxième réaction, dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleu-vert.

Ainsi, dans un premier temps, une courbe étalon est effectuée à partir d'une gamme de concentrations connues de BSA. (Annexe 03)

3. Milieu de culture et fermentation

Le milieu de culture employé à base de lactosérum doux.

3.1. Préparation du milieu de culture

3.1.1. Déprotéinisation du lactosérum

Cette étape consiste à faire chauffer le lactosérum au bain Marie à 100 °C pendant 30 min, décanté, ensuite filtré sur un papier filtre standard (Annexe 04) (Durieux, réf : 66301130).

3.1.2. Enrichissement du milieu de fermentation

Le pH de lactosérum déprotéiné est ajusté d'abord à la valeur 4, ensuite supplémenté en extrait de levure (11,4 g/l), FeSO_4 (0,015 g/l) et MgSO_4 (0,76 g/l) (Bellounissi., 2004).

3.2. Fermentation

La fermentation est réalisée dans des flacons de 500ml en conditions de pH acide. La température est maintenue constante à 30 °C et l'agitation est réglée à 150 tr/min pendant 7 jours.

3.2.1. Ensemencement de milieu de fermentation

Un litre de milieu de culture stérile est divisé dans huit flacons. Chaque flacon contient 100 ml de milieu de culture.

L'inoculation est réalisée à partir de la culture solide par la technique des disques. Des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre sont prélevés et déposés dans les flacons de fermentation, à raison de huit disques par flacon.

4. Extraction et purification de produit de fermentation

4.1. Extrait brut

Après une fermentation de 7 jours, le milieu de culture est soumis à une filtration sur papier wattman n°1. Le filtrat obtenu représente l'extrait brut.

Après l'extraction, l'activité enzymatique et la concentration en protéines totales sont dosés.

4.2. Purification partielle de l'enzyme

L'extrait brut de la souche est purifié par une précipitation par le sulfate d'ammonium.

La précipitation fractionnée des protéines est réalisée par le sulfate d'ammonium à 30% saturation sous agitation modérée dans un bain de glace pendant 30 minutes. La solution est ensuite centrifugée à 8000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le culot ainsi obtenu est dissous dans 20 ml de tampon citrate/citrate de sodium (0,05M, pH 5,5) et le surnageant est récupéré.

La concentration en protéines totales et l'activité enzymatique sont dosés et ce pour le culot et le surnageant.

5. Méthodes de dosage

5.1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines s'effectue par la méthode de Lowry (Lowry *et al.* 1951). Le principe, les solutions nécessaires et le mode opératoire sont cités précédemment.

5.2 Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est dosée par une méthode colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma); conformément à la technique adaptée par Mechakra *et al.*(1999).

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage (Annexe 05) établie en utilisant la tyrosine comme standard. Une unité(U)de protéase est l'équivalent de 1µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme. (Benchiheb, 2015)

5.3. Evaluation de l'activité coagulante ;

L'activité coagulante est mesurée selon la méthode de Berridge (1945). La technique consiste à ajouter 1ml d'extrait enzymatique à (le culot 30%) 10 ml de lait écrémé préparé par addition de 0,01 M de CaCl₂, l'incubation est faite à 30°C.

Le temps de coagulation est mesuré, cela correspond au temps nécessaire à l'apparition des premiers flocons dans un mince film de lait s'écoulant sur la paroi du tube. L'activité est exprimée en unité présure(UP) et calculée d'après l'équation suivante :

$$UP = 10 \times V / Tc \times Q$$

Où :

UP = unité présure ;

V = volume de substrat standard utilisé ;

Q = volume d'extrait coagulant ;

Tc = temps de coagulation

5.3.1. Effet du pH sur l'activité coagulante

L'effet du pH sur l'activité coagulante est étudié la mesure du temps de floculation en variant le pH du lait entre 6- 6,5 et 7. Ensuite l'UP est calculé.

5.3.2. Effet de la température sur l'activité coagulante

L'effet de la température sur la coagulation du lait par la protéase étudiée est déduit par la mesure du temps de floculation à différentes températures, de 35 à 55°C avec un incrément de 5°C. (Benchiheub, 2015). Ensuite l'UP est calculé.

5.3.3. Effet des ions calcium sur l'activité coagulante :

L'effet du calcium sur la coagulation du lait par la protéase partiellement purifiée est étudié à un pH de 6,5 avec des concentrations de 10 à 50 mM de CaCl_2 (Benchiheub, 2015). Avec un incrément de 10mM. Ensuite l'UP est calculé.

5.3.4. Effet des ions sodium sur l'activité coagulante

L'effet du sodium sur la coagulation du lait par les protéases purifiées est étudié à un pH de 6,5 avec des concentrations de 10 à 50 mM de NaCl (Benchiheub, 2015). Avec un incrément de 10mM. Ensuite l'UP est calculé.

Résultats Et Discussion

1. Revivification des souches

1.1.Aspect macroscopique

La revivification des deux souches utilisées dans cette étude est faite par culture en milieu OGA à 30°C. Les souches d'*Aspergillus sp* se sont développées sous forme de colonies d'apparence plus au moins différentes.

La souche *Aspergillus flavus* s'est développé après une culture de 7 jours en une colonie épaisse velouté. Tout d'abord blanche (avant la sporulation) puis elle se colore en vert foncé au fur et à mesure de la maturation du centre vers la périphérie pour devenir entièrement verte.

La souche *Aspergillus fumigatus* s'est développée sous forme de petites colonies à bord irrégulier, de coloration gris-vert, poudreuses.

1.2.Aspect microscopique

Les observations microscopiques de deux souches sont présentées dans la figure 8.

L'examen microscopique de deux souches au grossissement $\times 40$ puis $\times 100$ ont permis de confirmer la détermination de leur genre par l'observation des hyphes présentant des conidiophores avec des vésicules coliforme caractéristique du genre *Aspergillus*, les phialides et les conidies sont pigmenté en vert.

2. Mise en évidence de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique des deux souches est réalisée sur milieu agar – lait. Les prélèvements sont effectués à partir d'une préculture sur milieu PDA. Cette activité se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies ensemencées en touches à la surface des géloses. Les résultats de ces tests sont présentés dans la figure 9.

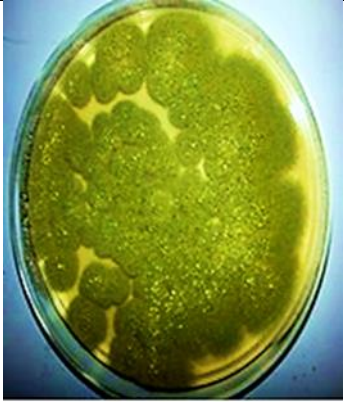
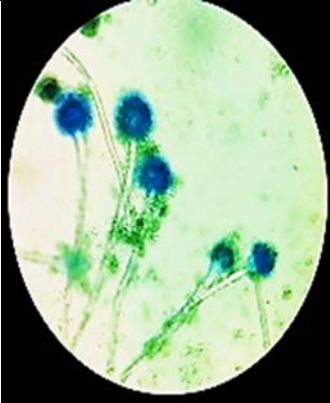

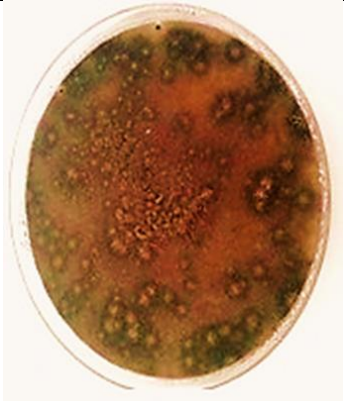
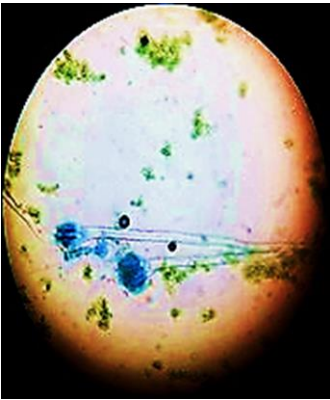
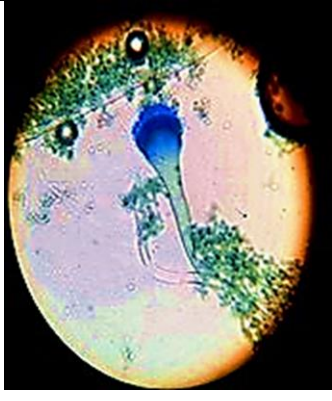
Souche	Observation macroscopique recto	Observation microscopique (grossissement $\times 40$)	Observation microscopique (grossissement $\times 100$)
<i>A. flavus</i>			
<i>A. fumigatus</i>			

Figure 8 : Aspect morphologique des souches d'*Aspergillus* mise en culture sur milieu OGA pendant 7 jours.

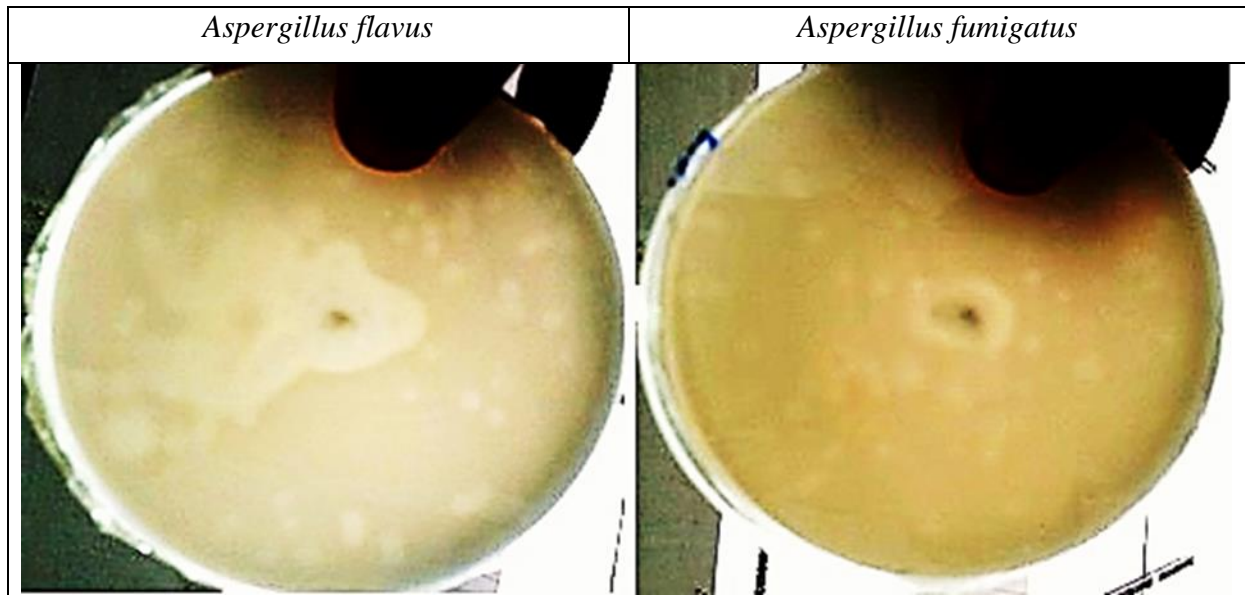


Figure 9 : Aspect des halos de protéolyse des champignons déposés en touche sur milieu agar – lait.

En milieu agar-lait, les deux souches *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus* montre une activité protéolytique intéressante sur les caséines du lait. Après incubation durant 48h à 30°C, des zones claires ont apparues autour des colonies déposées en touches. Les diamètres des halos varient de 1cm (*Aspergillus fumigatus*) à 4,2 cm (*Aspergillus flavus*) (Figure 9).

En se basant sur ce résultat, la souche *Aspergillus flavus*, qui a donné une meilleure activité protéolytique, est retenue pour la suite du travail.

3. Analyses physico-chimiques du lactosérum

L'utilisation du lactosérum comme milieu de culture , nécessite au préalable une connaissance de sa composition physicochimique. Les résultats des analyses physico-chimiques obtenus sont récapitulés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Analyse physicochimique du lactosérum.

Paramètres	Valeurs
pH	6,2
Acidité	17 D°
Matière sèche totale	6,22 %
Matière grasse	2,15 g/l
Teneur en protéines	0,58g/l

Le lactosérum obtenu lors de la fabrication du fromage type camembert est doux et a une acidité moyenne de 17° D et un pH moyen de 6,2. Ces valeurs sont proches de celle obtenue par Benaissa (2018) (pH=6,3, acidité =18°D), c'est les résultats d'un caillage à la présure (Lachebi, 2009).

Le tableau indique que la valeur de la matière sèche totale trouvée égale à 6,22 %. Ces valeurs sont proches à la valeur donnée par Sottiez (1990) qui est de 6,70 %.

Par ailleurs, la teneur en matière grasse est de 2,15 g/l ce qui est inférieur à celle trouvée par Benaissa(2018) 5,5 g/l et proche de celle trouvée par Allali *et al.*, (2019) 2,1 g/l. Cette faible teneur en matière grasse est expliquée par sa concentration (rétention) dans le fromage (Lachebi, 2009) La matière grasse a probablement sédimenté avec les protéines (Benaissa, 2018).

Les résultats monte aussi que la teneur en protéine (0,58g/l) est inférieur à ce qui est rapporté par Allali *et al.*, (2019)(82,5 g/kg). Ceci est dû aux nouvelles méthodes de préparations de fromages qui visent à minimiser les pertes pour des raisons économiques (Kelly *et al.*, 2008).

4. Dosages de l'activité protéolytique

Les mesures de l'activité enzymatique ainsi que la concentration en protéines totales dans les différents échantillons montrent les résultats ci-dessous.

Tableau 8 : Dosage d'activité protéolytique et la teneur en protéines.

Extrait	Volume (ml)	Activité totale (UI)	Activité spécifique (U/mg)
Extrait brut	500	212750	425,83
Surnageant	450	103500	230
Culot 30%	40	119465	2985,64

Le dosage de l'activité protéolytique par la méthode colorimétrique est exprimé dans le tableau 8 en unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme.

Les résultats entre l'extrait brute (425,83U) et le surnageant (230U) et culot (2985,64U) ont montré l'efficacité de la purification partielle par sulfate d'ammonium.

L'extrait brut a donné une activité protéolytique de 425.83 U, ce qui est supérieur à celle trouvée par Sudarkodi C *et al.* (2015) pour la protéase d'*A. Flavus* (30U) dans un milieu alcalin.

5. Evaluation de l'activité coagulante en comparaison avec la présure

L'activité coagulante des protéases est comparée à celle de la présure par la mesure des temps de floculation.

Les résultats de l'activité coagulante et les caillés résultants sont montrés dans le tableau 9.

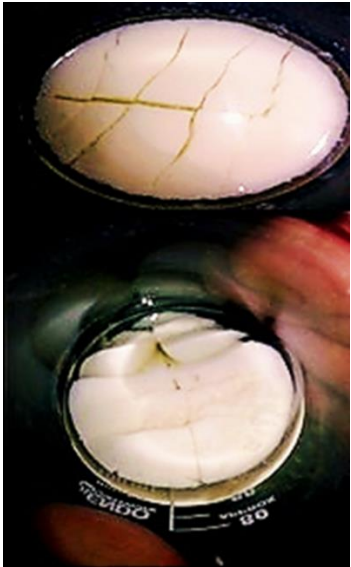

La protéase purifiée par la technique de précipitation par sulfate d'ammonium a donné une activité coagulante (0,197 UP), ce qui est inférieur à celle de trouvée après coagulation par la présure commerciale utilisée chez SAFILAIT (0,217UP). Cette valeur est supérieur à celle trouvée par Abdellaoui (2007) (0,373UP) ainsi que celle trouvée par Bouchrit (2011), Benlounissi (2004) et Mokhtari (2004) pour la protéase acide extraite de *Penicillium camemberti*.

Après 30 min de coagulation, le caillé obtenu en utilisant l'extrait enzymatique était plus dure et plus stable que celui obtenu par la présure commerciale.

Le lactosérum issu de la coagulation par l'extrait enzymatique ainsi que le découpage étaient plus clair.

Ces résultats confirment l'efficacité de la protéase étudiée dans la coagulation du lait comme cela a été montré pour de nombreux extraits végétaux tels que le latex du figuier (*Ficus carica*) et les extraits de chardons (*Cynara cardunculus L.* et *Cynara scolymus*) qui sont utilisés depuis longtemps en Algérie dans les préparations traditionnelles fromagères (Androuët, 2002).

Tableau 9 : Résultats de l'évaluation de l'activité coagulante en comparaison avec la présure.

Enzyme	Temps de coagulation (min)	Activité coagulante (UP/ml)	Aspect du caillé
Extrait enzymatique (culot 30%)	8:28	0,197	
Présure commerciale	7:41	0,217	

5.1. Effet du pH sur l'activité coagulante

L'effet du pH sur l'activité coagulante est étudié en variant le pH du lait entre les valeurs : 6, 6,5 et 7. La température d'incubation est fixée à 30 °C, la variation de l'activité coagulante en fonction de pH est montrée dans la figure 10.

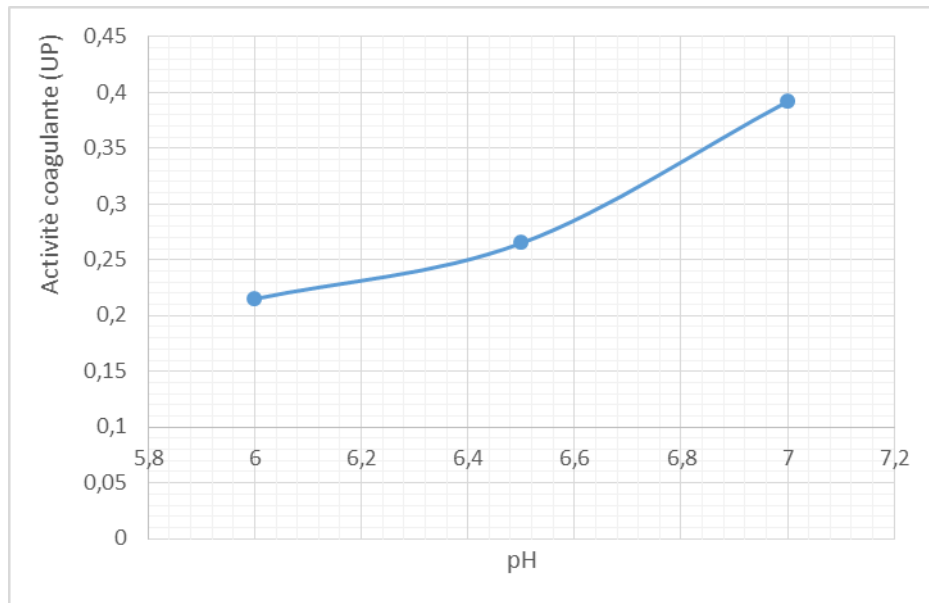


Figure 10 : Effet du pH sur l'activité coagulante (culot 30%).

Le pH optimal de notre enzyme est 7 avec une activité coagulante de 0,392 UP et qui est inférieur à celui de Judith *et al.* (1990) d'*A. Flavus* (8,0). Supérieur à celui d'Abdellaoui, (2007) pour la protéase d'*A. Niger* (5,5) et supérieur aussi à celle qu'a trouvé Lee *et al.* (2010) pour *A.oryzae* (6,5).

5.2. Effet de la température sur l'activité coagulante

La température est un paramètre primordial dans les réactions biochimique. L'effet de ce paramètre sur l'activité coagulante est étudié en variant la température d'incubation entre 35°C et 55°C avec un incrément de 5°C dans chaque essai.

L'activité coagulante en fonction de la température est montrée dans la figure 11.

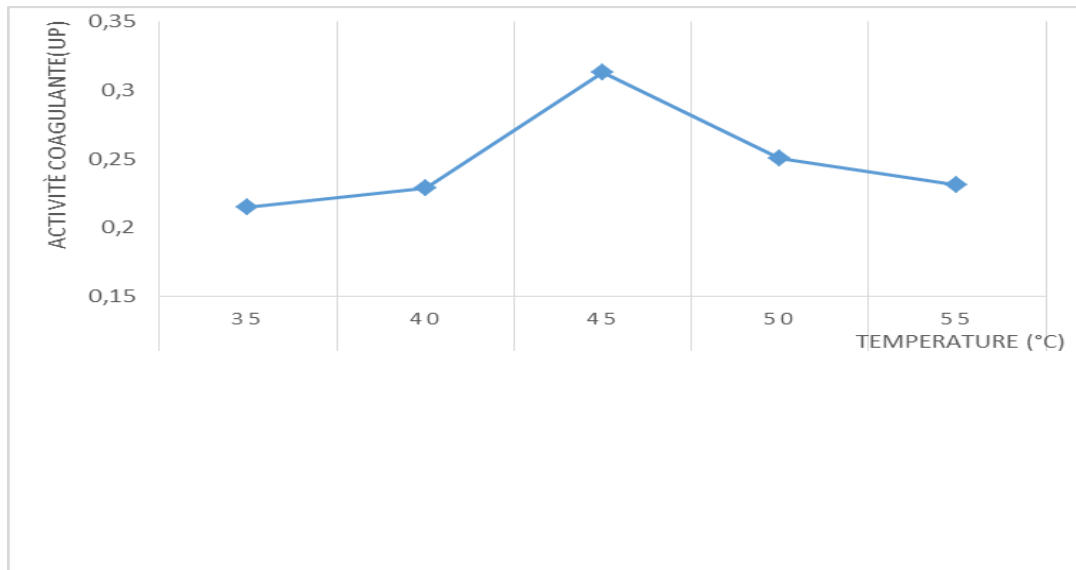


Figure 11 : Effet de la température sur l'activité coagulante (culot 30%).

La température optimale de coagulation de l'enzyme étudiée est 45°C avec une activité coagulante de 0,313 UP. Ce résultat concorde avec celui de Abdellaoui, (2007) et Bensmail, (2012) pour la protéase produite par *Aspergillus niger* et inférieur à celle qui était trouvé par Judith *et al.* (1990) pour la protéase d'*A. Flavus* (50°C). En fromagerie, l'effet favorable de la température sur l'activité coagulante des enzymes peut être mis en profit lorsque les conditions de coagulation le permettent. Ce qui entraîne une réduction de la quantité d'enzyme ajoutée et par conséquent, l'activité protéolytique ultérieure (Benchiheub, 2015).

5.3. Effet des ions calcium sur l'activé coagulante

L'effet de la concentration du calcium est étudié en variant la concentration de CaCl₂ entre 10 et 50 mM. Les résultats sont représentés dans la figure 12.

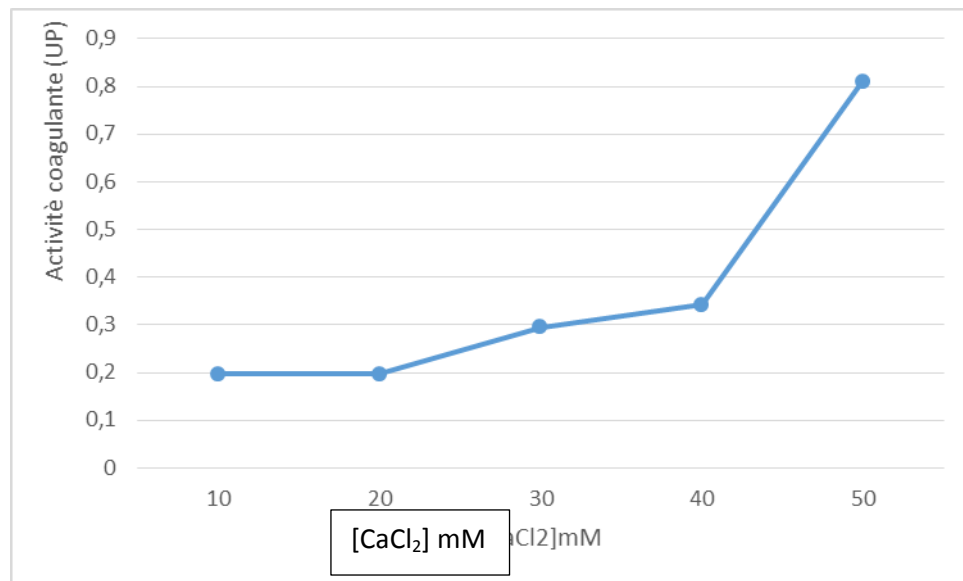


Figure 12 : Effet de CaCl₂ sur l'activité coagulante (culot 30%).

D'après le graphe, on constate que l'activité coagulante augmente proportionnellement avec la concentration des ions calcium avec un optimum de coagulation à 50 mM.

Les ions calcium semble être un facteur déterminant de l'aptitude de lait à la coagulation (Nouani *et al.*, 2009). Étant donné que le pH est ajusté après l'ajout de calcium, les variations observées avec la concentration de calcium devraient être liées à un effet direct sur les taux d'agrégation et raffermissant (Castillo *et al.*, 2002).

L'addition du CaCl₂, pratique courante dans l'industrie des fromages, permet également de corriger les aptitudes à la coagulation de certains laits. En effet, l'action synergique du Ca⁺² et d'un pH bas est indispensable au déroulement de la phase secondaire de la coagulation qui conduit après hydrolyse de la caséine à la coagulation par association des micelles par l'entremise des interactions hydrophobes (Lenoir *et al.*, 1997).

5.4. Effet des ions sodium sur l'activité coagulante

Le sel, les ferments lactiques et les ferments d'affinage sont les constituants majeurs dans les recettes des préparations fromagères pour cela l'effet de la concentration du sel dans le lait, exprimé en mM de NaCl, sur l'activité coagulante est étudié entre 10 et 50mM, la variation de l'activité coagulante en fonction de la concentration de NaCl est illustrée dans la figure 13.

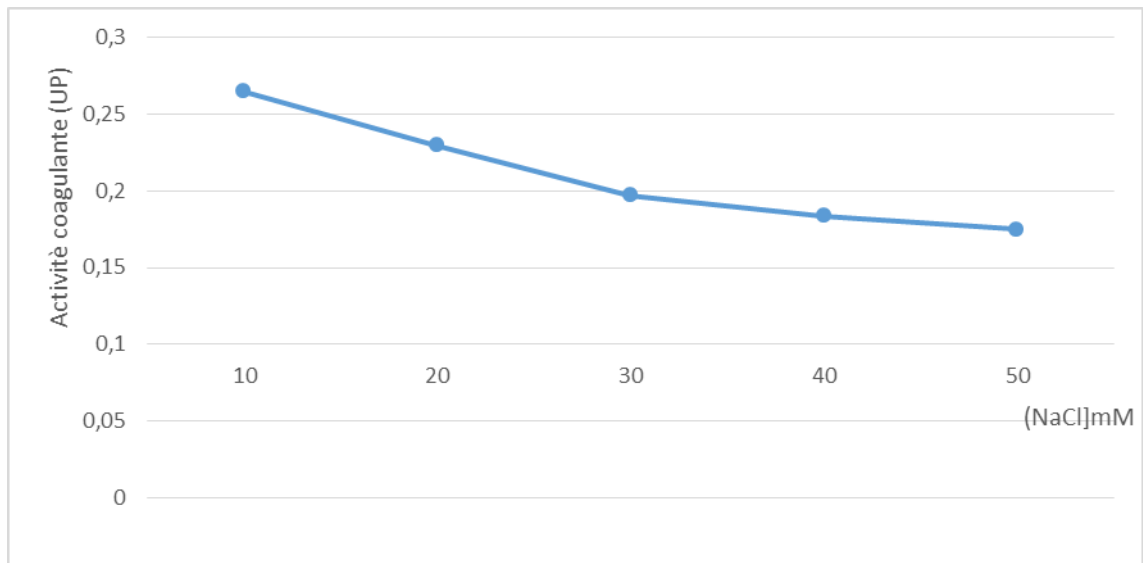


Figure 13 : Effet de NaCl sur l'activité coagulante.

Les résultats de l'effet de la concentration des ions sodium sur l'activité coagulante montrent que, l'addition de NaCl au lait favorise la dissociation de calcium et du phosphate au sein de micelles de caséine et en solution (Gaucheron *et al.*, 2000) et du coup l'augmentation du temps de coagulation et donc la diminution de l'activité coagulante.

Conclusion

Conclusion

Au regard de la pénurie constante des matières premières énergétiques et alimentaires, la valorisation des sous-produits constitue ; en plus qu'une des premières étapes de l'engagement environnemental, un chemin pour le développement économique.

A travers ce travail, nous avons développé un milieu de culture à base de lactosérum doux, ce milieu est destiné à une souche fongique productrice d'une protéase coagulante du lait.

Le lactosérum provenant de la fabrication du camembert riche en matières nutritives et présente des qualités (pH=6,2, acidité =17°D, Matière sèche totale =6,22 %, Matière grasse=2,15 g/l, Teneur en protéines=0,58g/l) adéquates pour élaborer un milieu de culture.

La culture est faite après une déprotéinisation et enrichissement du lactosérum et après une mise en évidence d'activité protéolytique la souche *Aspergillus flavus* est retenue pour la fermentation.

Après la fermentation d'*Aspergillus flavus* pendant 7 jours dans une température de 30°C et agitation de 150 rpm, le milieu de culture a subi une filtration et alors l'extrait enzymatique brut est obtenu. Ce dernier a subi une précipitation fractionnée par sulfate d'ammonium. L'activité protéolytique et la teneur en protéine sont dosées pour l'extrait enzymatique brut et le culot 30% ont donné successivement : 425UI, 2985UI.

L'activité coagulante est aussi mesurée en comparaison avec la présure utilisée dans l'unité de production fromagère SAFILAIT. Cette dernière a donné une activité coagulante de 0,217 UP et notre culot extrait a donné 0,197 UP dans les conditions standards (30°C et pH=6,5).

L'effet du pH, de la température et de la concentration des ions calcium et sodium sur l'activité coagulante est aussi étudié, il est trouvé que le pH 7, la température 45°C et les concentrations des ions calcium et sodium respectivement de 50 et 10 mM sont les conditions optimales pour la meilleure coagulation du lait par notre enzyme.

Au terme de ce travail, il est nécessaire de compléter et de développer le sujet par les études suivantes.

Des expériences d'optimisations de la fermentation par rapport aux conditions de cultures ou composition de milieu afin d'augmenter le rendement au maximum possible.

Une étude des propriétés structurales et moléculaires de ces enzymes afin de confirmer leur potentiel de coagulation du lait par rapport à la présure et leurs autres aptitudes industrielles.

Des tests toxicologiques par rapports au coagulum résultant par ces enzymes afin de confirmer la possibilité de l'utilisation dans les industries fromagères.

***Références
Bibliographiques***

Références bibliographiques

Abdellaoui R. (2007). Obtention et Caractérisation d'une Enzyme Coagulant le Lait D'*Aspergillus Niger* Isole su Sol de la Région de Boumerdes. Mémoire de magister en Génie Alimentaires. Faculté des Sciences de l'Ingénieur, Département de Technologie Alimentaires, Laboratoire des Technologies Alimentaires. Université M'hamed bougara- Boumerdes.

A.Allali¹, S.Rezouki¹, M. Chaouch¹, B.Louasté². (2019). Production of simple sugars from lactose and lactoserum. *Journal of Applied Science and Environmental Studies* **1(2)** pp. 65-73

Alais C. (1975) Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Ed. Sepaic, PARIS-F

Alais, C. (1984). Science du lait - principes des techniques laitières. Paris, Editions Sepaic. **4c** éd. pp. 814.

Androuët, P. (2002). Le dictionnaire des fromages du monde. (Amazon, Ed.) (Le Cherche Midi). Collection Beaux Livres.

Antonio J. Trujillo*, Marta Capellas, Jordi Saldo, Ramon Gervilla, Buenaventura Guamis .(2002). Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products. *Innovative. Food Science and Emerging Technologies* **3295**– pp. 307.

Barnabé S., (2003). Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières. *Vecteur environnement* **36 (2)**: pp. 50-62.

Banon S., Hardy J., (1991). Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection, *J. Dairy Res.* **58** pp.75-84.

Belitz, Grosch, (2009). *Food Chemistry*; pp.673-746).

Benaissa M. (2018). Valorisation du lactosérum par les bactéries lactiques. Thèse de doctorat en sciences spécialité : biotechnologie. faculté des sciences de la nature et de la vie département de biotechnologie. Université d'Oran 1 Ahmed ben bella.

Benchiheb M. (2015). Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanisme d'action et applications technologiques. Thèse de Doctorat En Biotechnologie, Biologie et Environnement. Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Département de Biochimie-Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Mentouri Constantine.

Benlounissi A. (2004). La protéase acide de *Penicillium camemberti*. Production sur lactosérum, précipitation par le sulfate d'ammonium et action sur le lait de chèvre. Mémoire de magistère. Univ. Mentouri Constantine.

Bennett, J. (2010). An Overview of the Genus *Aspergillus*. In *M. Machida and K. Gomi (ed.)*, *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*.

Bensmail S. (2012). Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Mémoire de Magister en Biologie, Option : Biochimie - Microbiologie Appliquées. Faculté des Sciences. Département de Biologie. Université M'hamed bougara- Boumerdes.

Bernardeau M, Gueguen M., Smith DG, Corona-Barrera E., Vernoux JP, (2009). Antagonistic activities of two *Lactobacillus* strains against *Brachyspira*. *Vet Microbiol.* **138(1-2)**; pp.184-190.

Boiron P. (1996). Organisation et Biologie des champignons. Edition Nathan, pp.149.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. *Masson*. Collection Biotechnologies, pp.34-428.

Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J., (1989). Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. *Lavoisier*. Paris, pp. 216-244.

Bourgeois P, Mata M, Ritzenthaler P (1989). Genome comparison of *Lactococcus* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* **59**, pp. 65 -70

Brulé, G., Lenoir, G., Remeuf, F. (1997). In A Eck, J.C. Gillis Eds, Le fromage. *Lavoisier* Paris, France. pp. 7-4.

Carreira, A., Dillinger, K., Eliskases-Lechner, F., Loureiro, V., Ginzing, W. and Rohm, H. (2002). Influence of selected factors on browning of Camembert cheese. *J Dairy Res*, **69**, pp. 281-292.

Castillo M., Payne F A., Hicks C L., Laencina J. and Lopez M B. (2002). Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goats' milk using a light scattering sensor. *International Dairy Journal*, **12**: pp.1019–1023.

Cayot P.H. et Lorient D. (1998). Structures et technofonctions des protéines du lait. ARILAIT Recherches. *Tec et Doc Lavoisier*

Maubois Renet, Céline Daviau, Marie, Hélène Famelart, Alice Pierre, Henri Goudédranche, Jean Louis. (1984) Coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Rennes, France*.

Chabasse D, Bouchara JP, de Gentile L, Brun S, Cimon B, Penn P (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation en biologie médicale. *BIOFORMA* N° 25 Mars 2002.

Cheftel J.-C., Cuq J. L. et Lorient D. (1985). Protéines alimentaires : Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle et modifications chimiques. *Tec et Doc. Lavoisier*

- Coultouly g.**, (1991). Génie enzymatique. *Masson* éditeur, Paris, France, pp. 244.
- Cosenza, G., Gallo, D., Illario, R., di Gregorio, P., Senese, C., Ferrara, L. & Ramunno, L.**(2003). A Mval PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat alpha-lactalbumin locus. *Journal of Dairy Research* **70**, pp. 355-357.
- Dagleish D.G.** (1997). The Enzymatic coagulation of milk. in *Advanced Dairy Chemistry V1 Proteins. P.F. Fox Blackie and son Ltd.* pp.579-619.
- Dao H-P.**, (2005). Caractérisation de certains gènes polycetones synthases chez *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 producteur d'ochratoxine A et d'acide penicillique. Thèse de doctorat d'état; Option Microbiologie. Institut national polytechnique de Toulouse, pp. 126.
- Dewitt, D.P.** (2001). Fundamentals of Heat and Mass Transfer. **5th** Edition, *LTC, Guanabara Dois*, Rio de Janeiro.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R. & Montville, T. J.** (1998). Food microbiology: Fundamentals and frontiers. *ASM press. Washington D.C.*
- El-Bendary, A, E. Moharam ?Thanaa H.**(2007). Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme Produced by *Bacillus sphaericus*. *Applied Sciences Research. Egypt.*
- FAO.**(1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. *Alimentation et nutrition* n° **28**. ISBN 92-5-20534-6.
- Fukumoto L.R., Li-Chan E., Kwan L., Nakai S.** (1994). Isolation of immunoglobulin from cheese whey using ultrafiltration and immobilized metal affinity chromatography. *Food Res. Int.* **27**: pp. 335–348.
- Gaucheron F., Le Graet Y. and Briard V.** (2000). Effect of NaCl addition on the mineral equilibrium of concentrated and acidified casein micelles. *Milchwissenschaft*, **55** pp.82–86.
- Guiraud J. P.**, (1998). Microbiologie alimentaire. *Dunod*, Paris, pp.7-330.
- Gupta, et al.** (2002). Beta-Tubulin C354 mutations that severely decrease microtubule dynamics do not prevent nuclear migration in yeast. *Mol Biol Cell* **13(8)**: pp. 2919-32.
- Gupta, R.; Beg, Q.K. and Lorenz, P.** (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, pp. 15-32.
- Hansen R.** (1980). Carbery milk products in Ireland produces alcohol from whey. *Nordeuropaisk Mejeri Tidsskr.* **46**: pp. 10-13.
- Heslot H.**(1996). L'ingénierie des protéines et ses applications. Paris: Lavoisier, *Tec et Doc*; pp.263.

Ishida, N., Miyazaki, K., Sakai, T. (2001). Circadian rhythm biochemistry: from protein degradation to sleep and mating. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286(1)**: pp. 1--5.

Jouan P., (2002). Lactoprotéines et lactipeptides: propriétés biologiques. Ed. INRA. pp.128.

Judith C. Rhodes, * Thomas W. Amlung, and Matthews. Miller. (1990). Isolation and Characterization of an Elastinolytic Proteinase from *Aspergillus flavus*. *American Society for Microbiology. Vol.58, No.8*

Julien R., (2002). Les moisissures parlons-en. Objectif prevention. **25(4)**, pp.7-8.

Kelly A.L., Huppert T., Sheehan J.J. (2008). Pre-treatment of cheese milk: principles and developments. *Dairy Sci. Technol.* **88**: pp. 549-572.

Kiffer E. et Morelet M. (1997).Les deutéromycètes. Institut National de la Recherche Agronomique.

Lachebi S. (2009). Valorisation des rejets de l'industrie laitière par techniques membranaires (ultrafiltration). Mémoire de magister en génie de l'environnement. Faculté des sciences de l'ingénieur département génie de l'environnement laboratoire de recherche de technologie alimentaire. Université M'hamed bougara- Boumerdes.

Lee S.K., Hwang J.Y., Choi S.H., Kim S.M. (2010). Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste. *Food. Sci. Biotechno.* **19(2)**: pp. 327-334.

Lenoir J., Remeuf F. et Schneid N. (1997). L'aptitude du lait à la coagulation par la présure ; in: "Le fromage" ed.Eck et Gillis, Tec. Doc., 3ème Ed., Lavoisier, Paris

Leveau J.Y. et Bouix M., (1993).Les moisissures. In: Florent J. Ed. Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc .Lavoisier .Apria, pp.110-170.

Linden G., Lorient D.- (1994). Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole. Edition *Masson*, Paris,

Lowry OH. Rosebrough NJ. Farr AL. and Randall R.J.(1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**: pp.265–75.

Maubois J.L. (1984). Separation, extraction and fractionation of milk protein components. *Lait* **64**, pp. 485-495.

Meunier n., (1999). Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. pp. 168.

Meyer, A., Deiana, J. & Bernard, A. (2004) Cour de microbiologie générale. *Doïn*. France.

- Mokhtari A.** (2004). Production de la protéase acide de *Penicillium camemberti* sur lactosérum de vache, précipitation par l'acétone et action sur le lait de vache. Mémoire de magistère. Univ. Mentouri Constantine
- Moletta R.** (2002). Gestion des problèmes environnementaux dans les IAA. Paris : Tech et Doc; pp. 600.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T. et Killington R.,** (2000). L'essentiel en microbiologie. *Berti*. Paris, pp.210-216.
- Noël, C .Ourier, Lehembre, Kobilinsky.**(1990). Étude multifactorielle de la coagulation mixte du lait analysée par viscoélasticimétrie. INRA, génie des procédés alimentaires. FRANCE.
- Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet, S., Bellal, M. M., & 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*, **867(1)**, pp.20–29
- Oner M. D et Akar B.** (1993). Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in Gaziantep cheese production. *Lebensm. - Wiss. U. Technol.*, **26**: pp.318-321.
- Pelmont, J.** (1995). Enzymes: catalyseurs du monde vivant(No. **577.15** PEL).
- Rao m.b., tanksale a.m., ghatge m.s. et deshpande v.v.,** (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62 (3)**: pp. 597-625.
- Raper K.B. & Fennell.** (1965). The genus *Aspergillus*. *Food Microbiol*5: pp.163-176.
- Rerata.,lacroism.,simoesmunes.,vaugeladep.,vaissadep.,**(1984). Absorption intestinale comparée d'un mélange d'hydrolysats ménagés de protéines laitières et d'un mélange d'acides aminés libres de même composition chez le porc éveillé. *Bull. Acad. Natl. Med.*,**168**, pp.385-391
- Roseiro L, Andrew Wilbey R, Manuela B. Serpa Cheese** (2003). Technological, biochemical and microbiological characterisation of a PDO ewe's milkcheese coagulated with *Cynara cardunculus* L. *Le Lait*, INRA Editions, **83 (6)**, pp.469-481.
- Samson ,RA** (2014). Current concepts of *Aspergillus* systematics In " *Biotechnology Handbooks Vol.20 Aspergillus* " (J.E. Smith.ED.).Plenum.New York.in press.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW et al.** (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, **78**: pp. 141-173.

Sottiez P. (1990). Produits dérivés des fabrications fromagères in: *lait et produits laités*; vache, brebis, chèvre. Edition Lavoisier, Paris. pp.633.

Scriban R. (1999). Biotechnologie. 5eme édition. *Technique et Documentation*. Lavoisier. Paris. pp.. 149-159.

Sudarkodi Chandrasekaran¹, Sundar Sundaram Pillai Kumaresan¹, Murugan Manavalan^{2*}. (2015). Production and Optimization of Protease by Filamentous Fungus Isolated from Paddy Soil in Thiruvarur District Tamilnadu. *Journal of Applied Biology and Biotechnology Vol. 30*. pp.66-069, India.

Sumantha A., Larroche C., Pandey A. (2006). *Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective*. *Food Technol. Biotechnol.*, **244**: pp.211–220.

Vojnović,V., Ritz, M., Vahčić,N. (1993). Sensory evaluation of whey-based fruit beverages. *Die Nahrung* **37**, pp. 246-251.

Zhao Y, et al. (2003) Autoregulation in the biosynthesis of ribosomes. *Mol Cell Biol* **23(2)**: pp.699-707.

L*Officine,officine.ca/boutique/fr/troubles-de-sante/digestion/designs-for-health/digestzymes-p252c94c78/?limit=100.consulté visité le : (19/06/2019).

Annexes

Annexe 01 : Composition et préparation de milieu de culture OGA

Composition

Extrait autolytique de levure.....	5,0 g/l
Glucose.....	20,0 g/l
Oxytétracycline.....	0,1 g/l
Agar agar bactériologique.....	15,0 g/l

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 6,6 ± 0,2.

Préparation

Mettre en suspension 40,0 g de milieu de base déshydraté dans 1,1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.

Répartir en flacons, à raison de 110 ml par flacon.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 02 : Préparation de milieu de culture PDA

L'infusion de pomme de terre se prépare en faisant bouillir dans l'eau 200 g de pommes de terre tranchées pendant 30 minutes à 1h.

Laissant décanter le bouillon obtenu ou en le filtrant à travers un coton à fromage.

On dilue ensuite en ajoutant de l'eau distillée pour un volume final d'un litre.

Puis on ajoute 20 g de dextrose et autant d'agar-agar en poudre avant une stérilisation par autoclave à 100 kPa pendant 15 minutes.

Annexe 03 :

Protocole de la méthode de Lowry

Dans un second temps, la concentration en protéines totales de l'extrait protéique est déterminée par la mesure de l'absorbance des solutions à 750 nm.

Solutions nécessaires

Solution A : réactif du Folin-ciocalteu dilué à ½ dans du NaOH (0,1N).

Solution B : 2% de Na₂CO₃ dans de NaOH 0,1N.

Solution C1 : 0,5% de CuSO₄ 5H₂O dans l'eau distillée.

Solution C2 : 1% tartrate double de sodium et de potassium dans l'eau distillé.

Solution M : c'est un mélange de 100µl de la solution C1, 100µl de la solution C2 et 10ml de la solution B

Solution mère de BSA (bovine sérum albumine) à 1000µg/ml pour l'étalonnage.

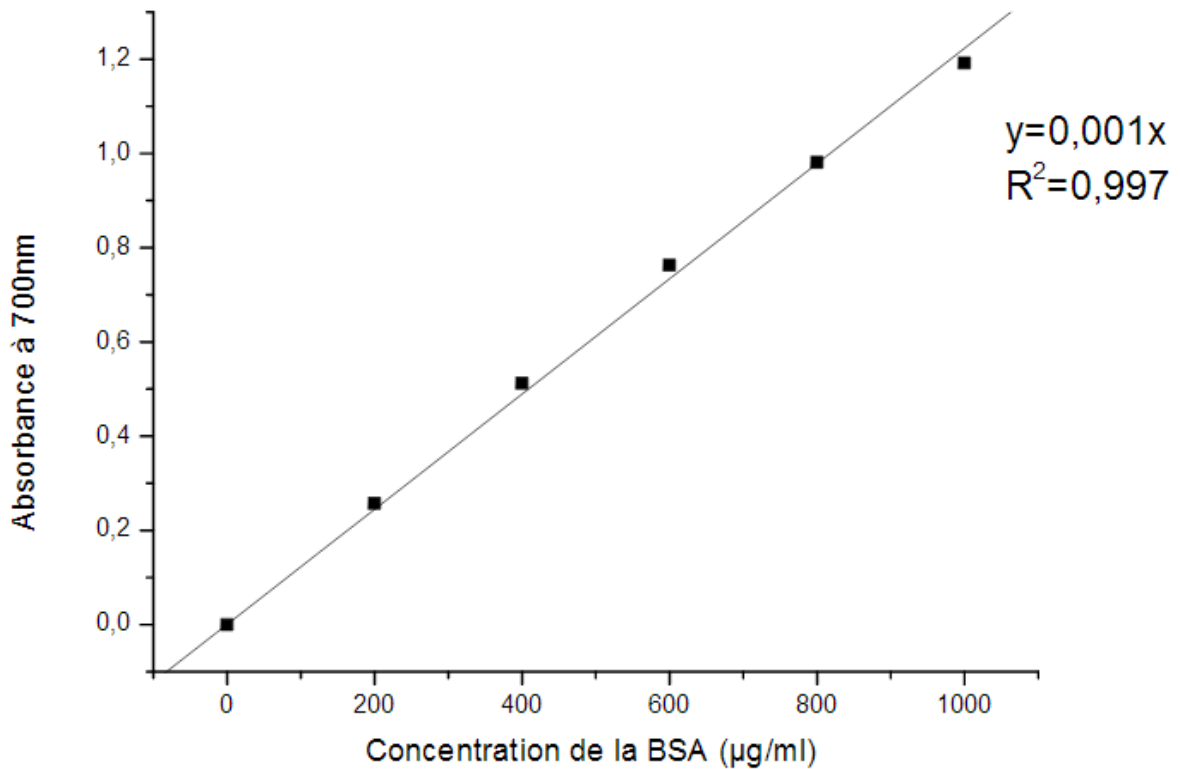
Dosage

200 µl de l'échantillon

2 ml de la solution M. Agiter et laisser reposer 15min

200 µl du réactif Folin-Ciocalteu. Agiter juste après et incuber 45 min à Température ambiante à l'obscurité. La lecture de l'absorbance est réalisée à 750 nm au spectrophotomètre.

Courbe d'étalonnage de BSA



Protocole de dosage d'activité enzymatique

Solution nécessaires

Solution de caséine 2,5% dissoute dans citrate de sodium 0.02M.

Tampon citrate / citrate de sodium 0,5 M pH 5,5.

Solution mère de la tyrosine avec une concentration de 80µg/ml pour l'étalonnage (annexe).

Solution d'acide trichloracétique (T.C.A) à 4%.

Solution de Na₂ CO₃ 2% (w/v) dans du NaOH 0,1N.

Réactif de Folin-Ciocalteu dilué à ½.

Le dosage de l'activité protéolytique est réalisé en deux étapes :

La 1ère étape étant la réaction enzymatique ; dont le mélange réactionnel est constitué de :

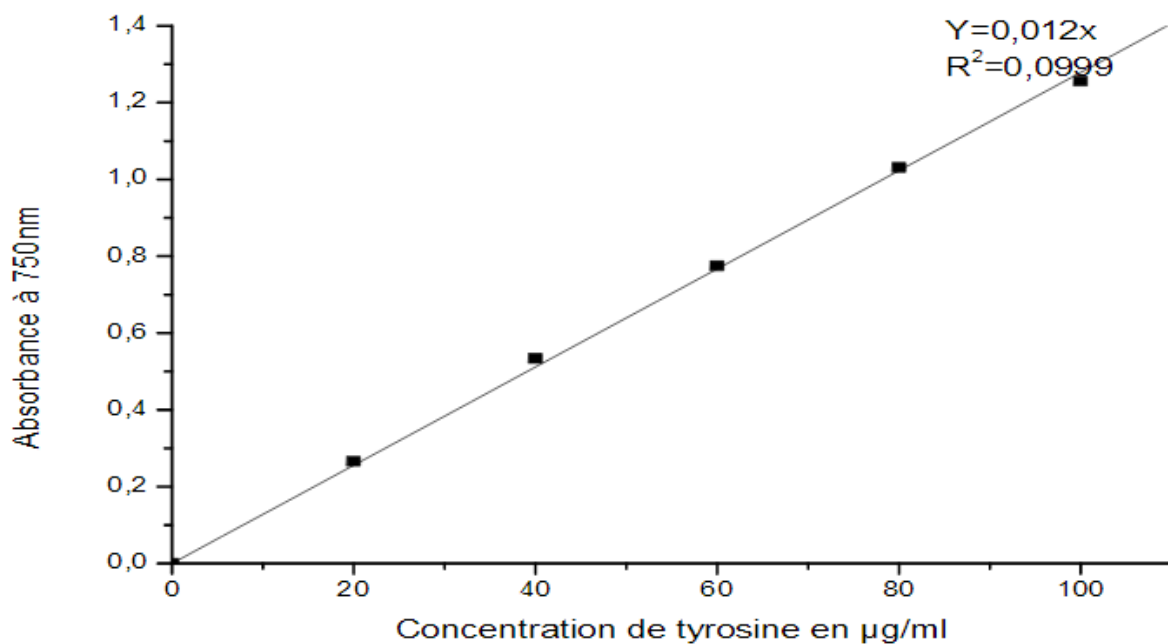
1ml de l'extrait enzymatique (brut, surnageant, culot 30%).

1.5ml du tampon citrate / sodium 0,05M, pH 5,5.

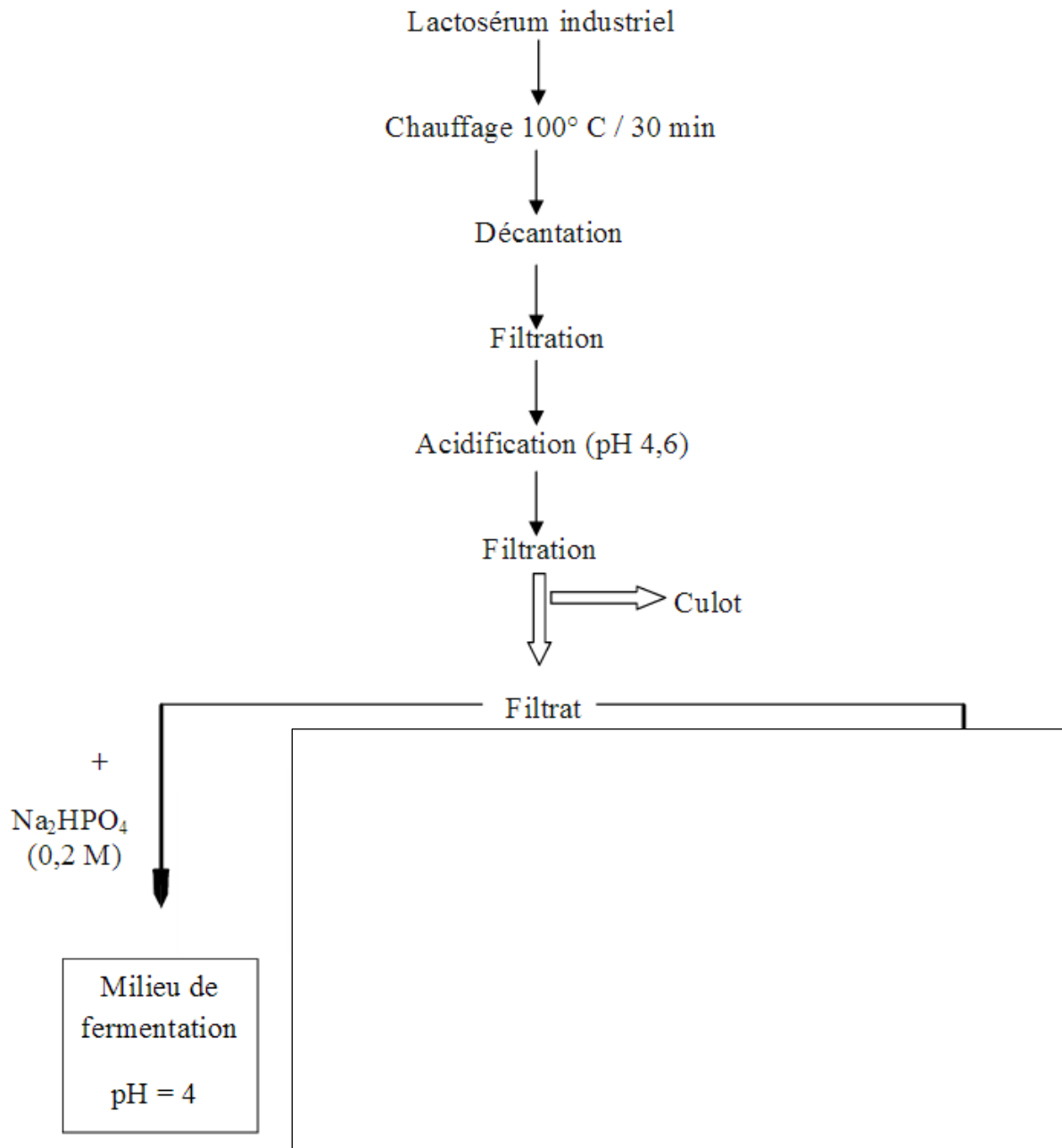
2,5ml de la solution de la solution de la caséine à 2,5% dissoute dans du citrate de sodium 0,02M.

Après incubation 1 h au bain-marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA (4%). Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'Anson (1938). La lecture se fait à 750 nm.

Courbe d'étalonnage de la Tyrosine



Annexe 04 : Préparation du milieu de fermentation.



Résumé

Valorisation du lactosérum pour la production d'une enzyme coagulante du lait

Le lactosérum représente un exemple type d'un rejet posant une problématique coûteuse et très exigeante sur le plan environnemental. En valorisant ce co-produit, riches en sucres fermentescibles, sels minéraux et vitamines, il peut être un milieu favorable aussi bien pour le développement d'une souche fongique, que pour la production des métabolites à forte valeur ajoutée telles que les enzymes protéolytiques, en particulier une protéase acide coagulante du lait. Nous avons étudié l'activité protéolytique chez deux souches d'*Aspergillus*, une seule souche est sélectionnée pour la fermentation selon les diamètres des colonies et la zone d'hydrolyse sur le milieu lait –agar. La première partie, Le milieu de fermentation est préparé à base de lactosérum provenant de la fabrication de fromage à pâte molle type "Camembert" de l'unité de production SAFILAIT. Les analyses physico-chimiques de ce lactosérum ont montré un pH de 6. Afin de favoriser la production d'une protéase acide, ce milieu est acidifié. Après une fermentation de sept jours, l'extrait brut est récupéré par une simple filtration. Ce dernier a subi une purification partielle par une précipitation par le sulfate d'ammonium avec une activité protéolytique de 425UI et 2985UI respectivement. Cette enzyme entraîne une coagulation très rapide du lait de vache frais en un temps très court : 8 min ce qui est proche de celui de la présure commerciale (7min) utilisée dans la même unité de production. L'activité coagulante de cette protéase est optimale à 45°C et à pH 7, soit une concentration de 50mM en calcium. Ces résultats indiquent que cette enzyme peut être utilisée comme succédané de la présure et que le lactosérum peut être valorisé dans le même domaine.

Mots clés : Lactosérum, valorisation, *Aspergillus flavus*, protéase acide, coagulation.

Abstract

Valuation of whey for the production of a milk coagulating enzyme

Whey is a typical example of a rejection posing a costly problem and very demanding on the environmental level. By enhancing this co-product, rich in fermentable sugars, mineral salts and vitamins, it can be a favorable environment both for the development of a fungal strain, as for the production of high value-added metabolites such as proteolytic enzymes, in particular an acid protease coagulating milk. We studied proteolytic activity in two strains of *Aspergillus*; a single strain was selected for fermentation according to the diameters of the colonies and the hydrolysis zone on the milk-agar medium. The first part, the fermentation medium is prepared from whey derived from the manufacture of soft cheese type "Camembert" of the production unit SAFILAIT. The physicochemical analyzes of this whey showed a pH of 6. In order to favor the production of an acidic protease, this medium is acidified. After fermentation for seven days, the crude extract is recovered by simple filtration. The latter was partially purified by ammonium sulfate precipitation with proteolytic activity of 425 IU and 2985 IU, respectively. This enzyme causes a very rapid coagulation of fresh cow's milk in a very short time: 8 min which is close to that of commercial rennet (7min) used in the same production unit. The coagulant activity of this protease is optimal at 45 ° C and pH 7, a concentration of 50 mM calcium. These results indicate that this enzyme can be used as a rennet substitute and that whey can be recovered in the same field.

Key words: Whey, recovery, *Aspergillus flavus*, acid protease, coagulation.

ملخص

تثمين مصل اللبن في انتاج انزيم تخثر الحليب

مصل اللبن هو مثال نموذجي للنفايات التي تمثل مشكلة باهظة الثمن ومتطلبّة كبيرة على المستوى البيئي. من خلال تعزيز هذا المنتج الثانوي ، الغني بالسكريات القابلة للتخمر والأملاح المعدنية والفيتامينات ، يمكن أن يكون بيئة مواتية لزراعة و تطوير سلالة فطرية ، وكذلك لإنتاج أفضيات و منتجات ذات قيمة مضافة عالية مثل الإنزيمات المحللة للبروتين ، ولا سيما الأنزيمات الحمضية المخثرة للحليب. درسنا نشاط التحلل البروتيني في سلالتين من *Aspergillus*

تم اختيار سلالة واحدة للتخمير وفقاً لأقطار المستعمرات ومنطقة التحلل في وسط أجار الحليب. الجزء الأول ، يتم تحضير وسط التخمر من مصل اللبن المشتق من تصنيع نوع الجبن الطري "Camembert." من وحدة الإنتاج SAFILAIT

أظهرت التحليلات الفيزيائية والكيميائية لمصل اللبن هذا درجة حموضة قدرها 6. من أجل تفضيل إنتاج البروتيناز الحمضي ، يتم تحميض الوسط. بعد التخمر لمدة سبعة أيام ، يتم استخراج المستخلص الخام عن طريق الترشيح البسيط. تم تنقية الأخير جزئياً عن طريق ترسيب كبريتات الأمونيوم مع نشاط التحلل قدره 425 وحدة دولية و 2985 وحدة دولية ، على التوالي. يتسبب هذا الإنزيم في تجلط سريع للغاية في حليب البقر الطازج في وقت قصير جداً: 8 دقائق تقريباً من ذلك المادة المخثرة التجارية (7 دقائق) المستخدمة في نفس وحدة الإنتاج. نشاط تخثر هذا البروتيناز هو الأمثل عند 45 درجة مئوية ودرجة الحموضة 7 ، بتركيز 50 ملمول/لتر من الكالسيوم. تشير هذه النتائج إلى أن هذا الإنزيم يمكن استخدامه كبديل للمادة المخثرة ويمكن استعادة مصل اللبن في نفس المجال.

الكلمات المفتاحية: مصل اللبن ، تعزيز البروتيناز الحمضي ، التخثر؛ *Aspergillus flavus*

**VALORISATION DU LACTOSÉRUM POUR LA PRODUCTION D'UNE ENZYME
COAGULANTE DU LAIT**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Bioindustrie, Analyse et Contrôle

Résumé : Le lactosérum représente un exemple type d'un rejet posant une problématique coûteuse et très exigeante sur le plan environnemental. En valorisant ce co-produit, riches en sucres fermentescibles, sels minéraux et vitamines, il peut être un milieu favorable aussi bien pour le développement d'une souche fongique, que pour la production des métabolites à forte valeur ajoutée telles que les enzymes protéolytiques, en particulier une protéase acide coagulante du lait. Nous avons étudié l'activité protéolytique chez deux souches d'*Aspergillus*, une seule souche est sélectionnée pour la fermentation selon les diamètres des colonies et la zone d'hydrolyse sur le milieu lait –agar. La première partie, Le milieu de fermentation est préparé à base de lactosérum provenant de la fabrication de fromage à pâte molle type "Camembert" de l'unité de production SAFILAIT. Les analyses physico-chimiques de ce lactosérum ont montré un pH de 6. Afin de favoriser la production d'une protéase acide, ce milieu est acidifié. Après une fermentation de sept jours, l'extrait brut est récupéré par une simple filtration et dosage. Ce dernier a subi une purification partielle par une précipitation par le sulfate d'ammonium avec une activité protéolytique de 425UI et 2985UI respectivement. Cette enzyme entraînent une coagulation très rapide du lait de vache frais en un temps très courts : 8 min ce qui est proche de celui de la présure commerciale (7min) utilisée dans la même unité de production. L'activité coagulante de cette protéase est optimale à 45°C et à pH 7, soit une concentration de 50mM en calcium. Ces résultats indiquent que cette enzyme peut être utilisée comme succédané de la présure et que le lactosérum peut être valorisé dans le même domaine.

Mots clés : Lactosérum, valorisation, *Aspergillus flavus*, protéase acide, coagulation.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de microbiologie Université frères Mentouri.
Unité de production fromagère SAFILAIT.

Jury d'évaluation :

Président de jury: Mme BELLIL Ines
Rapporteur : Mme BENCHIHEUB Meriem
Maitre de stage: Mme SEFARI Amel
développement .SAFILAIT.
Examinatrice : Mme HARZALLAH Besma

M.C.A Univ. Constantine 1.
M.C.B. Univ. Constantine 1.
Responsable de recherche et
M.C.B. Univ. Constantine 1.