

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Université Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم ميكروبيولوجيا

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie  
**Filière :** Microbiologie  
**Spécialité :** Mycologie et biotechnologie fongique.

N° d'ordre :  
N° de série :

Intitulé :

---

**Les extraits coagulants dérivés des succédanés d'origine  
fongique de la présure animale**

---

**Présenté par :** MEDJOU DJ Hamza Alla-Eddine  
TAYEB Mohamed Chaker  
BENDA OUD Yasser

Le 22/06/2022

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** Mme. MEZIANI Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).  
**Examineur 1 :** Mme. ABDELAZIZ Wided (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).  
**Examineur 2 :** Mme. BENKAHOUL Malika (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire  
2021 - 2022**

## *Remerciement*

Au terme de ce travail de mémoire de master, les mots justes sont difficiles à

Trouver pour exprimer nos remerciements.

À « Allah », le tout puissant, qui nous a accordés le courage et la patience

Pour élaborer ce modeste travail.

Un très grand merci à notre encadreur Meziani Meriem.

Nous rendons un vibrant hommage aux membres du jury de ce mémoire qui

Ont accepté de juger ce travail :

Un merci particulier à notre présidente de jury, Mme benkhoul Malika, de nous avoir faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de mémoire.

Un Merci Particulier à l'examinatrice de ce mémoire ;

Dr. ABDELAZIZ Wided, pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes chers parents :*

*Votre satisfaction est la base, votre satisfaction est le paradis,  
Merci pour tout ce que vous m'avez donné, que dieu vous garde  
pour moi et je vous souhaite que du bonheur et de santé.*

*A ma chères lwalida :*

*C'est une femme de mille hommes, vous méritez tout le bien. Je  
suis là grâce à vous merci beaucoup.*

*A mes chères frères (Anis Nadjib Youssra) :*

*Vous m'avez toujours soutenu tout au long de mes études, et je  
vous souhaite une vie de bonheur pour vos filles*

*(Maysoune, Oulfa, Djanette)*

*A mes chers amis de résidences Mentouri :*

*Merci pour votre patience, vous êtes ma deuxième famille. On a  
passé des beaux moments.*

*A mes chères amis et frère de mémoire Hamza et Yasser :*

*On est incubé dans des mauvaises conditions, Hamdoulah,  
L'avenir est entre les mains de Dieu, ne vous inquiétez pas.*

*A toutes l'équipe de SAIDAL pour leurs bons accueils*

*A mon ordinateur :*

*Merci pour votre sacrifice dans toutes les conditions défavorables.*

*Merci beaucoup*

*Mohamed Chaker*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*À ma très chère mère Wassila. Qui s'est tant sacrifiée pour les besoins de mes études,*

*À mon très cher père Noureddine pour tous les efforts consentis afin de m'armer du savoir,*

*À ma très chère grand-mère Laakri Salima, que dieu vous garde pour moi et je vous souhaite que du bonheur et de santé, Et je témoigne mon respect, ma profonde gratitude et beaucoup de reconnaissance pour tout ce qu'ils ont faits pour moi.*

*À la mémoire de mon cher grand père, Mahi Taher, que Dieu l'accueille dans son vaste paradis et que son âme repose en paix.*

*À mes chers frères (Ayoub, Chakib et Mouatassim Billah)*

*À toute ma famille un par un*

*A ma chère bien-aimée, qui a partagé avec moi tous les bons et mauvais moments de la vie, avec elle j'ai connu le sens de l'amour et donner pour quelqu'un, je te dis une seule chose, tu es gravé dans mon cœur*

*À mes proches amis Hamza et Chaker pour leur aide et leur soutien dans les moments difficiles et pour les souvenirs qui on a créé ensemble toutes ces années.*

*À mes amis Mouhamed Denni, Atoui Amar et Amir Tachour.*

*À mon managere au travail Ladjabi Oussama qui m'avait aidé beaucoup dans ma carrière universitaire.*

*À madame Amel Lakehal ayat pour leur soutien et leur plaisir, on avait une très bonne expérience et des beaux moments par son intervention de nous aider de faire un stage dans SAIDAL.*

*À madame Chebli, monsieur kadri chamsou, Grine AbdelMoula et toutes l'équipe de SAIDAL pour leurs bons accueils, leurs services et pour les précieuses informations qu'ils nous avaient donné.*

*À mon ordinateur et À la voiture de mon père.*

*Bendaoud Yasser*

# *Dédicace*

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail*

*À ma chère mère Faïza, A mon cher père Kamel :*

*Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.*

*À mes chères sœurs Roufaïda et Lyna :*

*Qui n'ont pas cessés de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.*

*À mon adorable petite sœur Dalia :*

*Qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.*

*A mes chères proches frères et collègues :*

*Chaker, Yasser, Oussama et Wadoud, pour leur aide et leur soutien dans les moments difficiles et pour les souvenirs qui on a créé ensemble toutes ces années.*

*À Madame Chebli, les monsieurs Chimesou et Abdou :*

*Pour leurs bons accueils, leurs services et pour les précieuses informations qu'ils nous avaient donné.*

*À l'ordinateur de ma sœur Lyna ; qui m'a aidé dans les moments les plus difficiles dans cette mémoire.*

*À toute ma famille.*

*À tous mes autres amis. A tous ceux que j'aime.*

*Hamza Alla Eddine*

## **Résumé**

L'évolution de la technologie laitière et la forte demande de la présure traditionnelle pour la fabrication fromagère dans les marchés, ont engendrées une pénurie mondiale de cette enzyme. Des succédanés d'origine animale, végétale et microbienne (provenant de bactéries ou champignons) ont été étudiés pour remplacer cette dernière. Trois extraits coagulants dérivés des souches fongiques d'*Endothia parasitica*, *Mucor Miehei* et *Mucor pusillus* ont fait l'intérêt de cette recherche. Les souches fongiques productrices de ces enzymes ont été définies, classifiées et caractérisées. Ainsi, des méthodes d'obtention, de purification et de récupération de ces protéases, ont été analysées dont le but de connaître de plus en plus ces propriétés en les comparant avec celle de la présure animale. D'après les résultats des recherches analysés dans ce travail, les coagulases dérivés du genre *Mucor* ont été révélés d'être les meilleurs pour les utiliser dans la fabrication fromagère.

**Mots clés :** présure, coagulation du lait, présure animale, succédané de présure, *Endothia parasitica*, *Mucor Miehei*, *Mucor pusillus*,

**Abstract :**

The evolution of dairy technology and the strong demand for traditional rennet for cheese production in the markets has led to a worldwide shortage of this enzyme. Animal, plant and microbial (from bacteria or fungi) substitutes have been studied to replace the latter. Three coagulant extracts derived from the fungal strains of *Endothia parasitica*, *Mucor Miehei* and *Mucor pusillus* were of interest in this research. Fungal strains producing these enzymes have been defined, classified and characterized. Thus, methods of obtaining, purifying and recovering these proteases have been analyzed whose purpose is to know more and more these properties by comparing them with that of animal rennet. Based on the results of the research analysed in this work, coagulases derived from the genus *Mucor* have been shown to be the best for use in cheese making.

**Keywords :** rennet, milk coagulation, animal rennet, rennet substitute, *Endothia parasitica*, *Mucor Miehei*, *Mucor pusillus*,

## الملخص

أدى تطور تكنولوجيا الألبان والطلب القوي على المنفعة التقليدية لإنتاج الجبن في الأسواق إلى نقص عالمي في هذا الإنزيم. تمت دراسة البدائل الحيوانية والنباتية والميكروبية (من البكتيريا أو الفطريات) لتحل محل هذه الأخيرة. كانت ثلاثة مستخلصات متخثرة مشتقة من السلالات الفطرية من *Endothia parasitica* ، *Mucor Miehi* و *Mucor pusillus* موضع اهتمام في هذا البحث. تم تعريف السلالات الفطرية المنتجة لهذه الإنزيمات وتصنيفها وتميزها، أما بعد، فقد تم تحليل طرق الحصول على هذه البروتياز وتنقيتها واستعادتها والتي تهدف إلى معرفة المزيد والمزيد من هذه الخصائص من خلال مقارنتها مع تلك الخاصة بالحيوانات ربناءً على نتائج البحوث الذي تم تحليلها في هذا العمل، ثبت أن التخثر المشتق من نوع *Mucor* هو الأفضل للاستخدام في صنع الجبن.

**الكلمات المفتاحية:** المنفعة، تخثر الحليب، المنفعة الحيوانية، بدائل المنفعة، *Endothia parasitica*،

*Mucor pusillus* ، *Mucor Miehei*



## Table de matière

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

### Chapitre 1. Généralités sur le lait et la présure

<b>1 LE LAIT .....</b>	<b>3</b>
1.1 DEFINITION .....	3
1.2 COMPOSITION DU LAIT.....	3
1.3 PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU LAIT.....	4
1.4 LES CASEINES DU LAIT .....	5
1.5 MECANISME DE LA COAGULATION DU LAIT.....	5
1.5.1 <i>La coagulation mixte</i> .....	6
1.5.2 <i>La coagulation acide</i> .....	6
1.5.3 <i>La coagulation par la présure</i> .....	6
<b>2 LA PRESURE .....</b>	<b>6</b>
2.1 DEFINITION .....	6
2.1.1 <i>Chymosine</i> .....	6
2.1.2 <i>Pepsine</i> .....	7
2.1.3 <i>Propriétés de la chymosine et de la pepsine</i> .....	7
2.1.4 <i>Composition en acides aminés de la chymosine et de la pepsine</i> .....	7
2.2 CARACTERISTIQUES D'UNE COAGULATION PAR LA PRESURE.....	8
2.3 EXTRACTION DE LA PRESURE.....	9
2.4 L'ACTION DE LA PRESURE DANS LE LAIT .....	9
2.5 L'UTILISATION DE LA PRESURE DANS L'INDUSTRIE .....	10
2.6 LA CONSERVATION DE LA PRESURE.....	10
<b>3 SUCCEDANES (ALTERNATIVES) DE PRESURE.....</b>	<b>11</b>
3.1 PRESURE D'ORIGINE ANIMALE .....	11
3.2 LA PRESURE D'ORIGINE VEGETALE .....	11
3.3 PRESURE D'ORIGINE MICROBIENNE.....	13
3.3.1 <i>Présure provenant de bactérie</i> : .....	14
3.3.2 <i>Présure provenant de champignon</i> .....	15

### Chapitre II : Les extraits coagulants dérivés des succédanés fongiques

<b>1 L'EXTRAIT COAGULANT DERIVE D'ENDOTHIA PARASITICA .....</b>	<b>19</b>
---	-----------

1.1	LA SOUCHE D' <i>ENDOTHIA PARASITICA</i> .....	19
1.1.1	<i>Définition</i> .....	19
1.1.2	<i>Classification</i> .....	20
1.1.3	<i>Caractéristique de la souche</i> .....	20
1.2	OBTENTION DE L'EXTRAIT COAGULANT .....	21
1.3	PURIFICATION DE L'EXTRAIT COAGULANT .....	22
1.4	RECUPERATION DE L'EXTRAIT COAGULANT .....	24
<b>2</b>	<b>L'EXTRAIT COAGULANT DERIVE DE <i>MUCOR MIEHEI</i></b> .....	<b>24</b>
2.1	LA SOUCHE DE <i>MUCOR MIEHEI</i> .....	24
2.1.1	<i>Définition</i> .....	24
2.1.2	<i>Classification</i> .....	24
2.1.3	<i>Caractéristiques de la souche</i> .....	25
2.2	OBTENTION DE L'EXTRAIT COAGULANT .....	25
2.3	PURIFICATION DE L'EXTRAIT COAGULANT .....	27
2.4	RECUPERATION DE L'EXTRAIT COAGULANT .....	27
<b>3</b>	<b>L'EXTRAIT COAGULANT DERIVE DE <i>MUCOR PUSILLUS</i></b> .....	<b>28</b>
3.1	LA SOUCHE DE <i>MUCOR PUSILLUS</i> .....	28
3.1.1	<i>Définition</i> .....	28
3.1.2	<i>Classification</i> .....	28
3.1.3	<i>Caractéristiques de la souche</i> .....	28
3.2	OBTENTION DE L'EXTRAIT COAGULANT .....	28
3.3	PURIFICATION DE L'EXTRAIT COAGULANT .....	29
3.3.1	<i>La première méthode</i> .....	29
3.3.2	<i>La deuxième méthode</i> .....	29
3.4	3.4- RECUPERATION DE L'EXTRAIT COAGULANT .....	30
<b>4</b>	<b>L'ELIMINATION DES ENZYMES CONTAMINANTS ASSOCIEES AUX PRESURES FONGIQUES</b> .....	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>LES CRITERES DES SUCCEDANES</b> .....	<b>32</b>

## **Chapitre III: discussion des Propriétés et utilisations des coagulase**

<b>1</b>	<b>L'ACTIVITE COAGULANTE</b> .....	<b>33</b>
1.1	INFLUENCE DE TEMPERATURE .....	33
1.2	INFLUENCE DU PH .....	36
1.3	INFLUENCE DE CALCIUM SOLUBLE .....	39
<b>2</b>	<b>L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE</b> .....	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>AUTRES PROPRIETES</b> .....	<b>42</b>

3.1	STABILITE DE L'ACTIVITE DES EXTRAITS COAGULANT .....	43
3.2	INHIBITION ET ACTIVATION DE L'ACTIVITE DES EXTRAITS COAGULANT .....	45
3.3	POIDS MOLECULAIRE .....	46
3.4	NOMBRE DE RESIDUS D'ACIDES AMINES DANS LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE .....	47
<b>4</b>	<b>UTILISATION INDUSTRIELLE DES ENZYMES FONGIQUES DANS LA PREPARATION DES FROMAGES : .....</b>	<b>48</b>
	<b>Conclusion.....</b>	<b>50</b>

## **Liste des abréviations**

**pH** : potentiel d'hydrogène

**ATCC** : American Type Culture Collection

**M** : mole

**FLS** : fermentation liquide submergé

**FMS** : fermentation en milieu solide

**Rpm** : rotation par minute

**Ala** : Alanine

**Arg** : Arginine

**Asp** : aspartique

**Cys** : acide cystéique

**Glu** : acide glutamique

**Gly** : glycine

**His** : histidine

**Ileu** : isoleucine

**Leu** : leucine

**Lys** : lysine

**Met** : methionine

**Orn** : ornithine

**Phe** : phenylalanine

**Pro** : proline

**Ser** : serine

**Thr** : threonine

**Trp** : tryptophane

**Tyr** : tyrosine

**Val** : valine

**Mm** : *Mucor meihei*

**Pa** : présure animale

**Ep** : *Endothia parasitica*

**Mp** : *Mucor pusillus*

**HCL** : Chlorure d'hydrogène

**NPN** : azote non protéique

**MI** : millilitre

## Table des figures

<b>Figure 01 :</b> Composition moyenne du lait de vache .....	<b>4</b>
<b>Figure 02: :</b> Schéma illustrant les micelles de caséines .....	<b>5</b>
<b>Figure 03:</b> Schéma de la structure secondaire de la caséine $\kappa$ .....	<b>9</b>
<b>Figure 04:</b> Les phases de la coagulation enzymatique du lait.....	<b>10</b>
<b>Figure 05:</b> Cucurbita pepo.....	<b>13</b>
<b>Figure 06:</b> Cynara cardunculus .....	<b>13</b>
<b>Figure 07:</b> <i>Bacillus subtilis</i> .....	<b>15</b>
<b>Figure 08:</b> <i>Endothia parasitica</i> .....	<b>16</b>
<b>Figure 09:</b> <i>Mucor miehei</i> .....	<b>17</b>
<b>Figure 10:</b> <i>Mucor pusillus</i> .....	<b>17</b>
<b>Figure 11:</b> <i>Endothia parasitica</i> .....	<b>20</b>
<b>Figure 12:</b> Caractéristiques microscopiques et macroscopiques de la souche <i>Endothia parasitica</i> .....	<b>20</b>
<b>Figure 13:</b> <i>Endothia parasitica</i> sous microscope.....	<b>21</b>
<b>Figure 14:</b> Schéma de purification de l'extrait coagulant d' <i>Endothia parasitica</i> .....	<b>23</b>
<b>Figure 15:</b> observation macroscopique de <i>Mucor miehei</i> .....	<b>24</b>
<b>Figure 16:</b> caractéristiques macroscopiques et microscopiques du <i>Mucor sp</i> .....	<b>25</b>
<b>Figure 17:</b> <i>Mucor miehei</i> (CBS 370-65) : mycélium blanc, puis gris, zygospores globulaires de 30 à 45ft, de ton jaune, rouge ou brun (grossissement 500) .....	<b>26</b>
<b>Figure 18:</b> Schéma de purification de <i>Mucor miehei</i> .....	<b>27</b>
<b>Figure 19:</b> Observation microscopique du <i>Mucor pusillus</i> .....	<b>28</b>
<b>Figure 20:</b> Schéma de purification de l'extrait coagulant de <i>Mucor pusillus</i> .....	<b>30</b>
<b>Figure 21:</b> Influence des variations de température (de 20 à 40° C) sur l'activité coagulante de l'enzyme « Pfizer » et de la présure animale .....	<b>33</b>
<b>Figure 22:</b> Influence de la température sur le temps de coagulation par quatre enzymes : présure animale (P.A.), <i>Mucor pusillus</i> (M.P.), <i>Mucor miehei</i> (M.M.), <i>Endothia parasitica</i> (E.P.)....	<b>34</b>
<b>Figure 23:</b> Influence de la température sur le temps de coagulation .....	<b>35</b>
<b>Figure 24:</b> Effet de l'humidité du substrat sur l'enzyme de coagulation du lait Production ...	<b>36</b>
<b>Figure 25:</b> Influence du pH sur le temps de coagulation par Quatre enzymes : présure animale (P.A.), <i>Mucor pusillus</i> (M.P.), <i>Mucor miehei</i> (M.M.), <i>Endothia parasitica</i> (E.P.) .....	<b>37</b>
<b>Figure 26:</b> Stabilité de la protéase acide au pH.....	<b>38</b>
<b>Figure 27:</b> Réponses fongiques et animales diverses concentrations de CaCl <sub>2</sub> dans le lait ....	<b>39</b>

<b>Figure 28:</b> Influence du calcium sur le temps de coagulation par Quatre enzymes : présure animale (P.A.), <i>Mucor pusillus</i> (M.P.), <i>Mucor miehei</i> (M.M.), <i>Endothia parasitica</i> (E.P.)....	<b>40</b>
<b>Figure 29:</b> Effet de la concentration en CaCl <sub>2</sub> du lait sur l'activité coagulante .....	<b>41</b>
<b>Figure 30:</b> Activité protéolytique des échantillons étudiés .....	<b>42</b>
<b>Figure 31:</b> Stabilité du pH en rénine .....	<b>43</b>
<b>Figure 32:</b> Stabilité à la chaleur de la protéase acide purifiée.....	<b>44</b>
<b>Figure 33:</b> Stabilité thermique de l'extrait purifié du mucor pusillus et de la présure .....	<b>44</b>
<b>Figure 34:</b> Stabilité de l'extrait purifié au cours de la conservation .....	<b>45</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Caractéristiques physico-chimiques du lait .....	<b>4</b>
<b>Tableau 2:</b> Propriétés de la chymosine et de la pepsine.....	<b>7</b>
<b>Tableau 3:</b> Composition en acides aminés de la chymosine et de la pepsine .....	<b>7</b>
<b>Tableau 4:</b> Caractéristiques des caillés à présure.....	<b>8</b>
<b>Tableau 5:</b> Les sources d'origine végétales de la présure .....	<b>12</b>
<b>Tableau 6:</b> Les bactéries productrices de la présure.....	<b>14</b>
<b>Tableau 7:</b> les champignons producteurs de la présure .....	<b>15</b>
<b>Tableau 8:</b> les souches fongiques utilisées dans la production de la présure.....	<b>17</b>
<b>Tableau 9:</b> obtention de l'extrait coagulant dérivé d' <i>Endothia parasitica</i> .....	<b>21</b>
<b>Tableau 10:</b> obtention de l'extrait coagulant dérivé du <i>Mucor meihei</i> .....	<b>26</b>
<b>Tableau 11:</b> obtention de l'extrait coagulant dérivé du <i>mucor pusillus</i> .....	<b>29</b>
<b>Tableau 12:</b> Méthodes d'élimination des enzymes indésirables des présures fongiques .....	<b>31</b>
<b>Tableau 13:</b> Temps de coagulation du lait en fonction du pH (min) .....	<b>37</b>
<b>Tableau 14:</b> Nombre de résidus d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique.....	<b>47</b>
<b>Tableau 15:</b> Les fromages fabriqués avec les extraits coagulants fongiques .....	<b>49</b>



# **INTRODUCTION**

## Introduction

Le lait est un liquide biologique comestible, et un aliment complet équilibré. C'est la base de l'alimentation de tous les mammifères, y compris l'Homme. [1] De ce fait, l'intérêt primordial majeur de la transformation du lait en fromage était de conserver ses principaux composants, où les premières transformations laitières en fromage sont apparues. [6] C'est la principale matière première pour la fabrication du fromage. [2]

La transformation du lait en fromage nécessite la coagulation de la caséine. [2] La coagulation du lait est définie comme l'instabilité des micelles de caséine qui flocculent et s'agrègent pour former un gel contenant des composants solubles dans le lait. [6] Différentes techniques de coagulation peuvent être utilisées.

Parmi ces différentes techniques, est la coagulation enzymatique, qui constitue la présence de la présure comme un agent coagulant du lait,

La présure animale est l'agent principal et le plus utilisé pour la coagulation du lait. [6] Cette préparation enzymatique est provenant de la quatrième poche de la caillette (quatrième estomac) des jeunes ruminants nourris exclusivement au lait. [12] Cet extrait coagulant est constitué de deux principaux enzymes ; la chymosine qui est la principale composante et majeure de la présure animale, et la pepsine. [2]

L'augmentation de la production de fromage nécessite une plus grande utilisation de la coagulase, qui ne peut être obtenue par le traitement à la présure seul en raison des rendements irréguliers chez les veaux de lait.

L'extraction de la présure exigerait des sacrifices très coûteux. En effet, elle nécessite la récupération de la caillette des veaux non sevrés après abattage, ce qui impacte fortement les coûts du fait des faibles rendements en viande. [2] Ce qui provoque une situation de pénurie de présure. [39]

A ce regard, le but de notre recherche bibliographique est de répondre aux questions, suivantes ;

- Est-ce qu'il y a une solution pour lutter contre cette pénurie ?
- Est-ce que les chercheurs ont pu trouver des substituts pour remplacer cette dernière ?

- Est-ce le domaine fongique est l'un des solutions qui font l'intérêt de remplacer la présure traditionnelle ?

Pour répondre à ces questions, le présent travail comporte trois parties principales ; la première partie se base sur des généralités sur le lait et la présure, et discute la limitation de la présure traditionnelle et propose des succédanés d'origine animale, végétale et fongiques de cette dernière. La deuxième partie se spécialise sur les souches fongiques productrices des extraits coagulants ; définition, classification et caractéristiques microscopiques et macroscopiques de ces substituts et donne des méthodes d'obtention, purification et récupération des coagulases obtenus à partir de ces souches. Aussi, il parle des différents critères des succédanés pour remplacer la présure animale. La troisième partie analyse les différentes propriétés et les caractères bénéfiques des extraits coagulants dérivés des souches fongiques ; l'activité coagulante, le pouvoir protéolytique, la stabilité, le poids moléculaire, les différents acides aminés qui constituent ces protéases en les comparant avec celle de la présure animale, ainsi, ces utilisations industrielles dans la fromagerie.

Enfin, une conclusion qui récapitule cette recherche par l'obtention de l'extrait coagulant qui a le rendement le plus remarquable et le plus analogue avec la présure animale et ouvre des perspectives dont le but d'enrichir la recherche scientifique dans la production fromagère.

# CHAPITRE I

## Chapitre I : Généralités sur le lait et la présure

### 1 Le lait

#### 1.1 Définition

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires du jeune. Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté, d'une saveur douceâtre et d'un pH légèrement acide, proche de la neutralité. [1]

C'est la principale matière première pour la fabrication du fromage. [2]

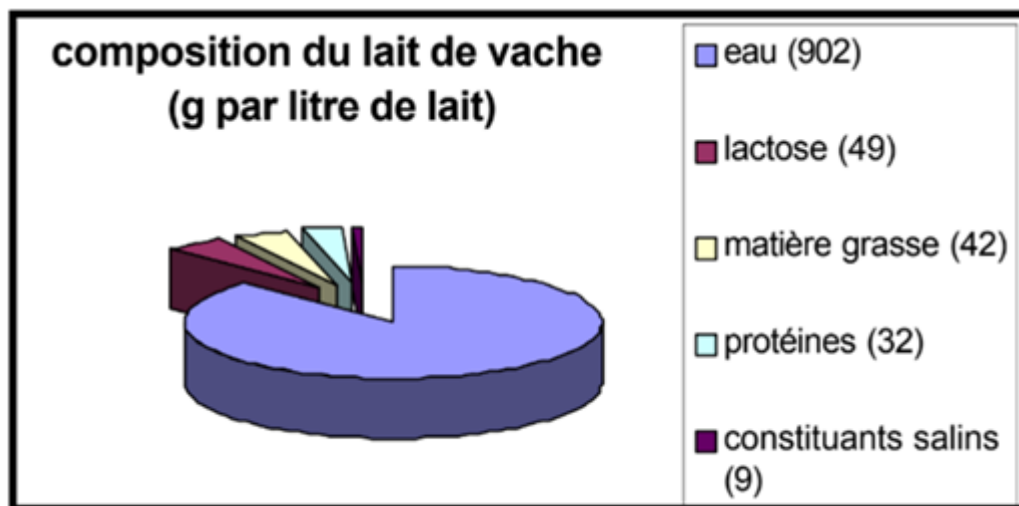
Selon le Congrès International pour la Répression des Fraudes Alimentaires, tenu à Genève en 1908, le lait a été défini :

« Le lait est le produit intégral de la traite totale et interrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum. »

#### 1.2 Composition du lait

Les principaux constituants du lait sont par sont illustré dans (la figure 01). [1]

- l'eau très majoritairement ;
- glucides principalement représentés par le lactose ;
- lipides essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras ;
- protéines : caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles ;
- sels et minéraux à l'état ionique et moléculaire ;
- éléments à l'état de traces mais au rôle biologique important : enzymes, Vitamines, oligo-éléments.



**Figure 1 :** Composition moyenne du lait de vache [1]

### 1.3 Paramètres physico-chimiques du lait

Les paramètres physico-chimiques sont résumés dans (**le tableau 1**)

**Tableau 1:** Caractéristiques physico-chimiques du lait. [3]

Constantes	Moyennes	Valeurs extrêmes
Densité du lait entier à 20 °C	1,031	1,028-1,033
Densité du lait écrémé	-	1,036
Densité de la matière grasse	-	0,94-0,96
pH à 20°C	6,6	6,6-6,8
Acidité titrable (°Dornic) *	16	15-17
Point de congélation (°C)	-	-0,520-0,550
Conductivité électrique à 25°C (siemens)	45 x 10 <sup>-4</sup>	40 - 50 x 10 <sup>-4</sup>

\*1° D = 0,1 g d'acide lactique/litre.

#### 1.4 Les caséines du lait

La caséine constitue la majeure partie des protéines du lait. Cette partie est la plus déterminante en matière de technologie fromagère. La caséine se présente sous forme de micelles formées par une combinaison de différents composants, dont : la caséine  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , la caséine bêta, la caséine kappa, et des minéraux, notamment du calcium et du phosphate. La kappa-caséine est une protéine du lait qui joue un rôle clé dans la coagulation du lait par la présure.

Les micelles de caséine peuvent être déstabilisées par l'acidification ou l'action de certaines enzymes protéolytiques comme la présure. Cette instabilité peut faire cailler le lait. C'est ainsi que l'ajout de présure au lait provoque sa coagulation en hydrolysant la  $\kappa$ -caséine, située à la périphérie des micelles. [4,5]

Les micelles de caséines sont illustrées par (la figure 02)

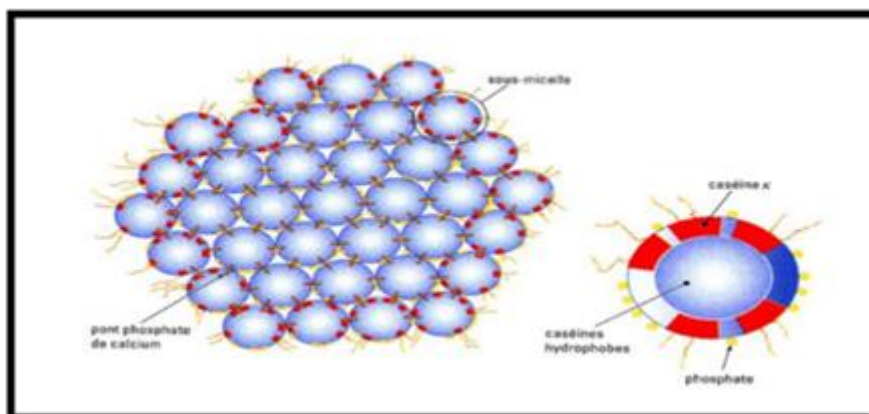


Figure 2: : Schéma illustrant les micelles de caséines [6]

#### 1.5 Mécanisme de la coagulation du lait

La coagulation du lait est une étape essentielle qui nécessite l'emploi d'un agent coagulant. [2] La coagulation du lait est la dénaturation de la caséine du lait sous l'action d'acidification (abaissement du pH) ou par action d'enzyme spécifique présure ou la combinaison des deux actions. [6]

Les différents mécanismes de coagulation, sont : [2]

### 1.5.1 La coagulation mixte

Le caillage mixte du lait est le résultat d'une combinaison d'enzymes spécifiques et d'une acidification. [2]

C'est la voie la plus utilisée dans l'industrie fromagère, notamment pour la production de fromages frais et à pâte molle et de pâtes pressées non cuites. [6]

### 1.5.2 La coagulation acide

La coagulation acide du lait s'effectue en présence d'un levain acide ou lactique qui transforme le lactose en acide lactique, ce qui provoque une baisse du pH, qui se traduit par une modification de l'état des micelles de caséine. [6]

Le gel lactique obtenu est perméable, friable, fragile et ne permettra qu'un égouttage limité. [2]

### 1.5.3 La coagulation par la présure

Considéré comme le meilleur moyen d'obtenir un fromage de meilleure qualité, qui comporte deux phases essentielles ; phase enzymatique et phase de coagulation. [6]

## 2 La présure

### 2.1 Définition

La présure est la préparation coagulante provenant de la quatrième poche de la caillette (quatrième estomac) des jeunes ruminants nourris exclusivement au lait. Elle constitue la principale enzyme traditionnellement utilisée dans l'industrie laitière. En fait, l'extrait coagulant est un mélange constitué de deux principaux enzymes protéolytiques acides (la chymosine 80% et la pepsine 20%). [7]

#### 2.1.1 Chymosine

La chymosine est la principale composante de la présure animale. Elle 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 sous l'action de l'acidité du milieu.



## 2.1.2 Pepsine

La pepsine est l'un des constituants de la présure, Sécrétée par la caillette des ruminants, après sevrage. La caillette secrète beaucoup de pepsine et très peu de chymosine ; elle ne devient prépondérante qu'une fois la synthèse de la chymosine est arrêtée. [2]

## 2.1.3 Propriétés de la chymosine et de la pepsine

**Tableau 2:** Propriétés de la chymosine et de la pepsine [8,9,10].

Enzyme	Nature	Stabilité en température	Stabilité pH	Optimum de Ph	Poids moléculaire
Chymosine	Protéase acide	Activité optimale à 42°C Inactivation : 50°C-61°C.	5.3-6.3	3.5 (Caséine) 3.7 (hémoglobine)	30,000-40,000
Pepsine	Protéase acide	Thermosensible à 50°C. Dénaturation à partir de 70°C.	2.0	6.0	34,000

## 2.1.4 Composition en acides aminés de la chymosine et de la pepsine

**Tableau 3:** Composition en acides aminés de la chymosine et de la pepsine [11]

Présure	<i>Chymosine</i>	<i>Pepsine</i>
Nombres d'acides aminés		
Ala	13	16
Arg	5	2
Asp	30	40
Cys	6	6
Glu	29	26
Gly	25	34

His	4	1
Ileu	15	23
Leu	19	28
Lys	8	1
Met	7	4
Phe	14	14
Pro	12	16
Ser	27	43
Thr	18	25
Trp	4	6
Tyr	15	16
Val	21	20

## 2.2 Caractéristiques d'une coagulation par la présure

Les caractéristiques de la coagulation sont résumées dans **le tableau 4** :

**Tableau 4:** Caractéristiques des caillés à présure [12].

Les caractéristiques	Action des enzymes (présure)
*Processus biochimique	*action enzymatique [lactose non dégradé]
* Modification de la caséine	*Transformation en para caséine, Séparation d'une partie non protéique
M*Ph	* 6.8
* Composition du coagulum	* phosphoparacaseinate de calcium
* nature de coagulum	* gel élastique imperméable
* synérèse (rétraction naturelle du gel et expulsion du sérum)	*rapide

* rendement (kg/1 00 L)	* 20%
* durée de coagulation	*longue (10-20 minutes)

### 2.3 Extraction de la présure

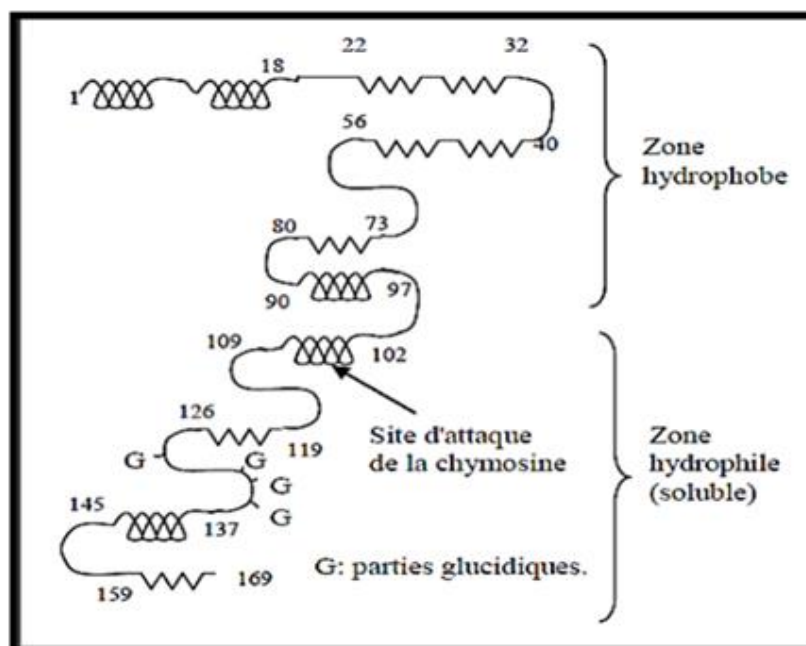
Cette substance « la présure » est obtenue par macération de caillettes des jeunes bovidés, des veaux, des agneaux ou des chevaux, dans une saumure de l'eau salée NaCl à la température de 35°C. Le jus et la présure sont ensuite purifiés ; dont le pouvoir coagulant est très fort, par diverses méthodes physico-chimiques et chromatographiques. Des additifs nécessaires à la conservation et à la coloration sont ajoutés ; pour assurer la conservation, on ajoute 4% d'acide borique. [12]

### 2.4 L'action de la présure dans le lait

La coagulation par l'action des enzymes protéolytiques se déroule en deux étapes :

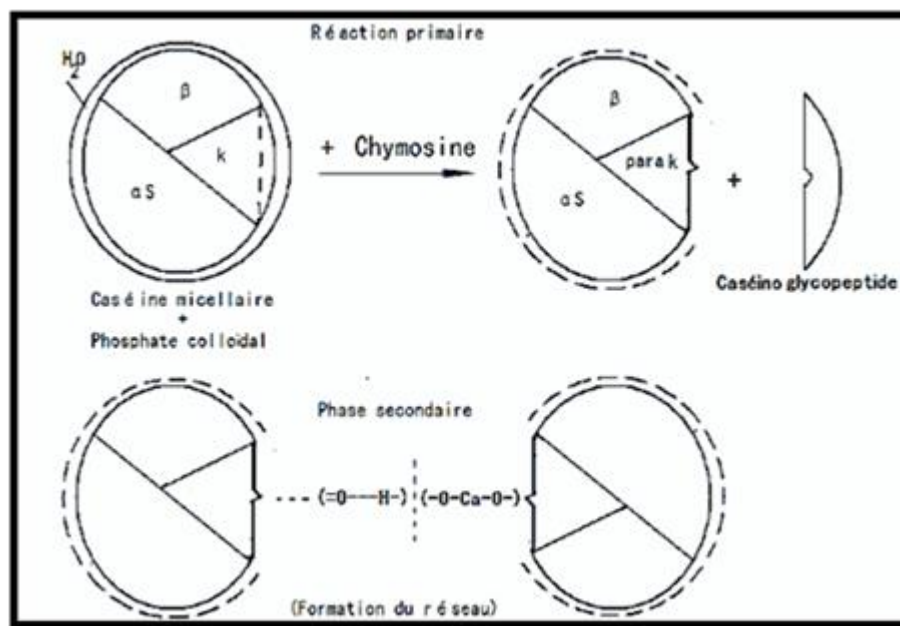
La première est purement enzymatique. Elle correspond à une protéolyse très limitée et très spécifique de la caséine par la présure. En effet, la chymosine, principale composante de la présure, exerce une action spécifique sur la caséine en hydrolysant sa liaison très labile (Phe105-Met 106). Elle n'exige pas la présence de Calcium ionisé Ca<sup>2+</sup>. [49]

la structure secondaire de la caséine  $\kappa$  est illustré par (la figure 3)



**Figure 3:** Schéma de la structure secondaire de la caséine  $\kappa$  [2].

Ainsi, en deuxième étape, dont le  $\text{Ca}^{2+}$  est exigé, la molécule de la caséine k se scinde en deux segments inégaux : le para-caséine K qui reste intégrée à la micelle, est insoluble et acide, et le caséinomacropeptide qui se dissocie de la micelle, il est soluble, acide et est éliminé dans le lactosérum. Le détachement du caséinomacropeptide de la micelle la rend instable. En effet, il se produit la réduction des charges négatives de la micelle et de son degré d'hydratation. Ainsi, ses facteurs de stabilité se trouvent affectés. Des liaisons s'établissent entre les micelles modifiées permettent leur agrégation et la formation d'un gel dans la mesure où il n'est pas agité ; c'est la phase de coagulation. [2] Les phases de la coagulation enzymatique du lait sont observées dans (la figure 4).



**Figure 4:** Les phases de la coagulation enzymatique du lait [2].

## 2.5 L'utilisation de la présure dans l'industrie

L'industrie fromagère emploie une quantité importante de protéases. Les Protéases employées sont surtout des protéases acides. 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. [7]

## 2.6 La conservation de la présure

La présure est conservée à des températures ambiantes, les extraits liquides perdent lentement leur activité, ils doivent être répartis dans des flacons bouchés et placés soit au

Réfrigérateur entre 3 et 5° C, soit au congélateur entre - 28° C et - 30° C. [12,13]. Il existe également des présures sèches (Poudre ou Comprimé), mieux adaptées à la conservation, mais moins pratiques à l'emploi ; elles sont obtenues par relargage au sel D'extraits liquides [12].

### 3 Succédanés (alternatives) de présure

La pénurie mondiale et La forte demande de la présure animale par les industries fromagères et le prix relativement élevé de ce coagulant ont conduit à l'approvisionnement de plus en plus difficile de la présure traditionnelle. A cet égard, des recherches ont été entreprises, afin d'exploiter d'autres sources potentielles de coagulases capables de remplacer la présure désignée sous le terme de succédanés de présure [2].

Actuellement, les différents succédanés de la présure peuvent être divisés en divers groupes :

- Les produits d'origine animale.
- Les produits d'origine végétale
- Les produits d'origine microbienne provenant de bactéries ou de champignons.

#### 3.1 Présure d'origine animale

L'appareil digestif de certains mammifères secrète diverses protéases autres que la présure notamment la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine. Les deux premières enzymes bien que capables de coaguler le lait, ont donné de mauvais résultats à cause de leur activité protéolytique excessive [14]. La recherche a été orientée vers la possibilité d'explorer les abats de bovins adultes et ceux de poissons. [2]. Des travaux qui ont porté sur l'emploi de trypsine, enzyme extraite du pancréas du bétail, et qui se sont révélés sans intérêt [14]. Bien que certains succédanés puissent être comme des substituts de présure de veau, leur disponibilité dépend toujours du marché de la viande.

#### 3.2 La présure d'origine végétale

**Le tableau 5** contient différentes préparations enzymatiques obtenues à partir de certains organes de végétaux sont capable de cailler le lait ; les plus connues sont : la ficine, la papaine et la broméline. [2]

Tableau 5: Les sources d'origine végétales de la présure [10].

Le nom scientifique	Le nom commercial
<i>Albizia julibrissin</i>	-
<i>Calotropis procera</i>	Pomme de Sodome
<i>Carica papaya</i>	Papaye
<i>Cucurbita pepo</i>	Citrouille
<i>Cynara cardunculus</i>	Cardon
<i>Ficus carica</i> , <i>F. glomarata</i> ,	Figuier
<i>F. religiosa</i>	Chardon bénit
<i>Silybum marianum</i>	-
<i>Streblus asper</i>	Pissenlit
<i>Taraxacum officinale</i>	Baie de Withania

Plus récemment, des recherches, portant sur l'emploi de protéinase extraite du latex du figuier et sur la coagulation du lait et la décomposition de la caséine par ces produits. De nouvelles plantes ont fait l'objet de plusieurs études, l'utilisation d'une enzyme extraite de *Cucurbita pepo*. [14]



**Figure 5:** *Cucurbita pepo* [40].

Le coagulant des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*) augmente son activité baisse du pH et est plus protéolytique que la présure (15 %). [15]

Ainsi, une utilisation efficace de ces préparations enzymatiques oblige à les purifier au préalable, ce qui augmente leur prix de revient.



**Figure 6:** *Cynara cardunculus* [41]

### 3.3 Présure d'origine microbienne

Le développement de la biotechnologie, a insisté sur la place importante des microorganismes utiles pour la production des protéases susceptibles de la présure traditionnelle. Ces microorganismes peuvent être des bactéries ou des champignons, qui offrent

des avantages et plusieurs bienfaits qui l'important sur les inconvénients liés aux industries. On peut citer : [2]

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

### 3.3.1 Présure provenant de bactérie :

Un certain nombre de bactéries produisent des enzymes de coagulation du lait. La production de ces enzymes est généralement attrayante en raison du titre élevé de la préparation active et des temps de génération plus courts. [10]

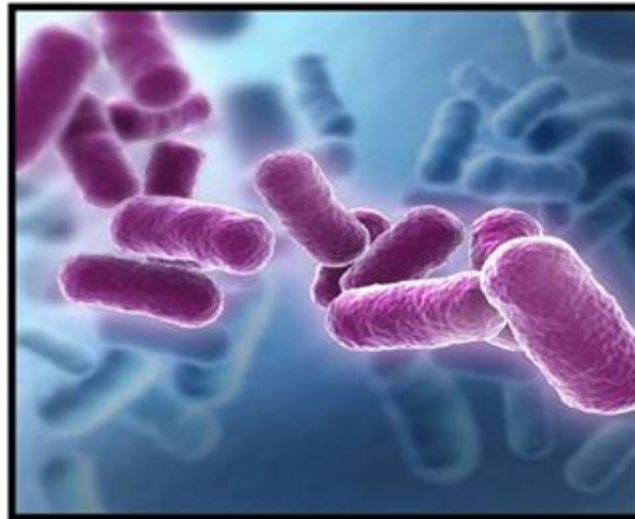
Quelque souche bactérienne productrice sont cité dans **le tableau 6**

**Tableau 6:** Les bactéries productrices de la présure [10]

<i>Akaligenes sp.</i>
<i>Bacillus brevis</i>
<i>B. cereus</i>
<i>B. coagulans</i>
<i>B. polymyxa</i>
<i>B. subtilis</i>
<i>Escherichia sp.</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>Staphylococcus spp.</i>

Le genre *Bacillus* est le plus étudié pour la production d'enzymes coagulantes, en particulier *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus polymyxa*. La présure de *B. subtilis* comme source potentielle de présure bactérienne ; l'activité protéolytique importante de cette enzyme de coagulation du lait a empêché une production commerciale significative. [2,10]





**Figure 7:** *Bacillus subtilis* [42]

Cependant, la production commerciale de présures à base de bactéries n'a pas dépassé le stade expérimental, en raison de l'action protéolytique invariablement forte et non spécifique des enzymes, entraînant une perte de graisse et d'azote dans le lactosérum, rendement réduit et mauvaise qualité, par comparaison à la présure dans les mêmes conditions de la coagulation du lait. [2]

### 3.3.2 Présure provenant de champignon

De nombreux champignons présentent un intérêt industriel citez dans **le tableau 7**, leur utilisation dans des procédés de fabrication offre une valeur majeure qui a encouragé l'exploration plus approfondie pour des enzymes similaires à présure. Parmi les espèces fongiques à pouvoir coagulant.

**Tableau 7:** les champignons producteurs de la présure [16,17,18,19].

Champignons	Références
<i>Aspergillus flavus</i>	[16]
<i>Aspergillus giganteus</i>	
<i>Aspergillus hennenbergii</i>	
<i>Aspergillus nidulans</i>	

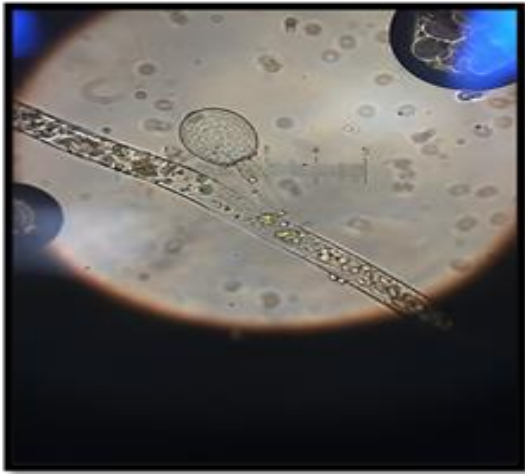
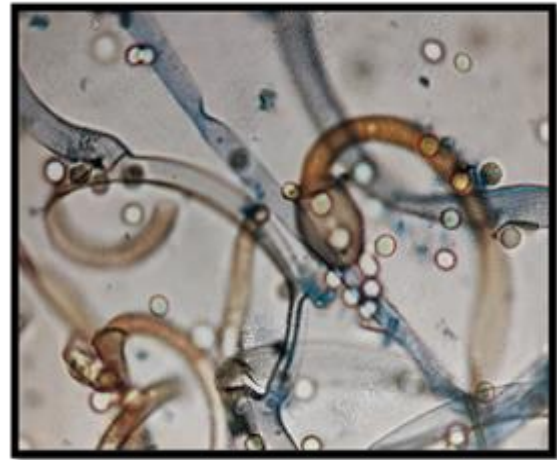
<i>Aspergillus niger</i>	
<i>Aspergillus versicolor</i>	
<i>Byssochlamys fulva</i>	
<i>Candida lipolytica</i>	
<i>Epicoccum purpurascens</i>	
<i>Rhizopus oryzae</i>	
<i>Rhizopus rhizopodijormis</i>	
<i>Endothia parasitica</i>	[17]
<i>Mucor michei</i>	[18]
<i>Mucor pusillus</i>	[19]

Seules trois moisissures sont exploitées par les grandes usines de fermentation en vue de la production de coagulase.

*Endothia parasitica*



**Figure 8:** *Endothia parasitica* [43]

*Mucor miehei***Figure 9:** *Mucor miehei* [44]*Mucor pusillus***Figure 10:** *Mucor pusillus* [44]

On trouve dans **Le tableau 8** le nom commercial des extraits coagulants des trois dernières souches fongiques

**Tableau 8:** les souches fongiques utilisées dans la production de la présure [16]

Le nom scientifique	Le nom commercial	Fournisseur
<i>Endolhia parasilica</i>	Suparen	Pfizer International
<i>Endolhia parasilica</i>	Sure-Curd	Pfizer, Inc.
<i>Mucor miehei</i>	Fromase	Wallerstein Company
<i>Mucor michei</i>	Hannilase	Laboratoire de Chr. Hansen, Inc.
<i>Mucor miehei</i>	Marzyme	Miles Laboratories, Inc.
<i>Mucor michei</i>	Rennilase	Novo Industrie A/S
<i>Mucor pusillus</i> var. <i>Lindl</i>	Emporase	Dairyland Food Laboratories, Inc.

---

<i>Mucor pusillus</i> var. <i>Lindt</i>	Meito MR	Meito Sangyo
<i>Mucor pusillus</i> var. <i>Lindt</i>	Présure nourricière	Vitex

# CHAPITRE II

## Chapitre II : Les extraits coagulants dérivés des succédanés fongiques

De nombreux champignons produisent des protéases. Celles-ci sont d'intérêt industriel dans les domaines où l'hydrolyse des protéines est souhaitée. A cet égard, leur exploitation dans les usines de fermentation en vue de fabrication fromagère est d'un intérêt majeur. Un certain nombre de présures disponibles dans le commerce, principalement dérivées des thermophiles *M. pusillus* et *M. miehei*, et du mésophile *E. parasitica*. [10]

Trois présures microbiennes, la présure dérivée de *Mucor pusillus*, *M. miehei* et *Endothia parasitica*, ont été évaluées comme substituts de la présure de veau et sont bien adaptés dans la fabrication fromagère. [20]

En général, la présure produite par les champignons est une protéase acide-aspartate à une seule chaîne polypeptidique.

### 1 L'extrait coagulant dérivé d'*Endothia parasitica*

#### 1.1 La souche d'*Endothia parasitica*

##### 1.1.1 Définition

Le champignon pathogène *Endothia parasitica* (*Cryphonectria parasitica*) est un champignon invasif de la famille de *Cryphonectriaceae*, [21] un membre des Ascomycota (champignons à sac). Ce champignon nécrotrophe est originaire d'Asie de l'Est et du Sud-Est et a été introduit en Europe et en Amérique du Nord au début des années 1900. [22]

Le champignon s'est rapidement propagé et a causé une perte importante d'arbres dans ces deux régions. C'est un champignon responsable de la maladie du mildiou. [21]

D'autre part, *Endothia parasitica* a été utilisée par les industries laitières. L'enzyme extraite de cette espèce est une protéase acide aspartate. [10] La présure élaborée par ce microorganisme s'est révélée inadéquate pour la production du fromage et a été proposée pour remplacer la présure animale pour certaines raisons. [23]

1.1.2 Classification

Classification	
Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Sous-division	<i>Pezizomycotina</i>
Ordre	<i>Diaporthales</i>
Famille	<i>Cryphonectriaceae</i>
Genre	<i>Cryphonectria</i>
Espèce	

*Cryphonectria parasitica*



Figure 11: *Endothia parasitica* [24]

1.1.3 Caractéristique de la souche

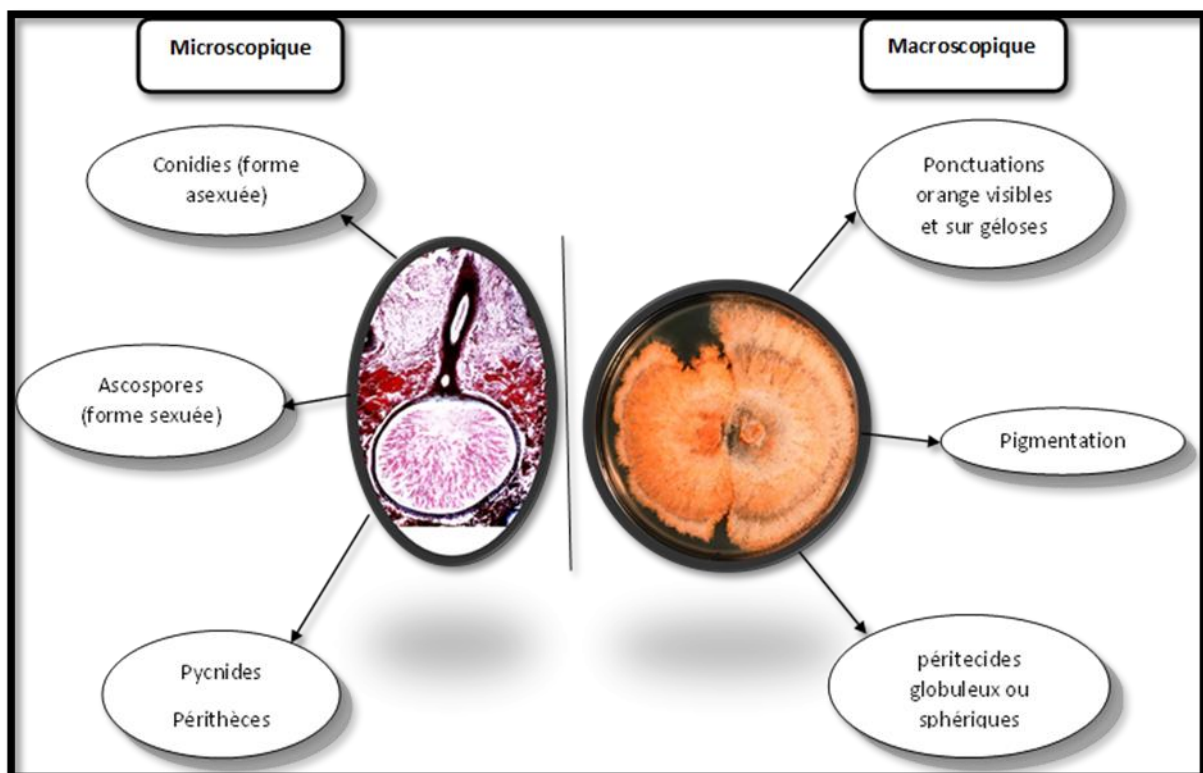


Figure 12: Caractéristiques microscopiques et macroscopiques de la souche *Endothia parasitica* [45,46]

### 1.2 Obtention de l'extrait coagulant

L'isolement de cette enzyme est le résultat d'une étude à grande échelle de centaines de micro-organismes producteurs d'enzymes. Le microorganisme producteur est le parasite du châtaignier ; il appartient à la classe des Ascomycètes, le nom scientifique est *Endothia parasitica* (ATCC 14729) ; c'est une souche mésophile [25], et le nom commercial de la préparation coagulante extraite de cette souche est Suparen. [10,20]

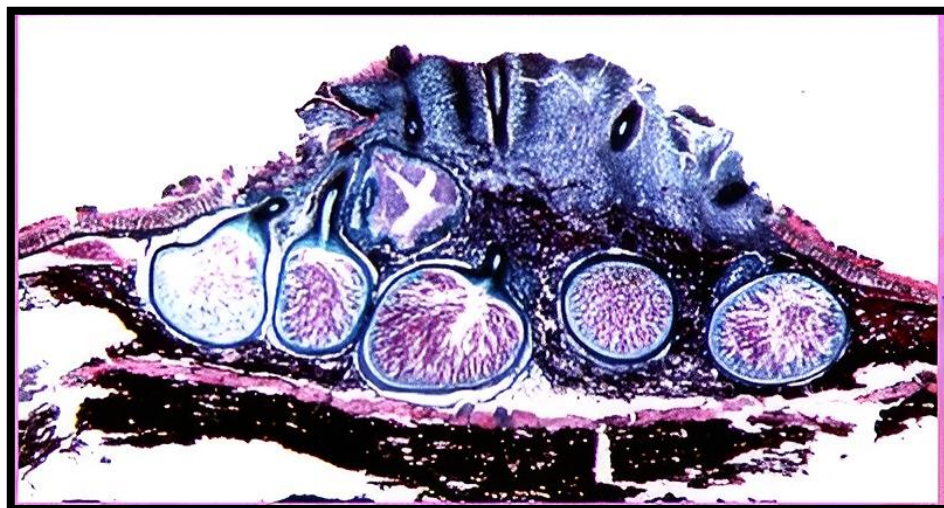


Figure 13: *Endothia parasitica* sous microscope [45]

La culture de l'organisme est maintenue sur de la gélose dextrose de pomme de terre ; l'organisme se développe dans un milieu de croissance contenant une source d'hydrates de carbone, d'azote et de sels inorganiques. La fermentation utilisée est de type submergé. La présure produite par *Endothia parasitica* est une protéase acide-aspartate. L'enzyme est extraite de bouillon de fermentation et purifiée en plusieurs étapes, puis récupérée et cristallisée

Tableau 9: obtention de l'extrait coagulant dérivé d'*Endothia parasitica* [10,17]

Nature de fermentation	Cultivée en culture submergée ;
Préparation du milieu de croissance	La gélose dextrose de pomme de terre ;
Préparation du milieu de culture / production	Farine de soja, de cérélose glucose, NaNO <sub>3</sub> , lait écrémé, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> ;
PH du milieu	Voisin a 6,8 ;



<b>Incubation</b>	À 28°C pendant 48H ;

### 1.3 Purification de l'extrait coagulant

La protéase du champignon *Endothia parasitica* a été purifiée par deux méthodes, l'une conduisant à une enzyme cristalline.

#### 1.3.1- La première méthode

La première méthode impliquait un fractionnement au sulfate d'ammonium, une filtration sur gel sur Sephadex G-100, et deux chromatographies sur DEAE-cellulose. Toutes les étapes ultérieures sont réalisées entre 0° et 2°. La centrifugation est effectuée à 10 400 g dans une centrifugeuse réfrigérée Sevall (vitrine) pendant 20 minutes. [17]. La dialyse contre 0,05M du tampon acétate, avec un PH=4,60. [26]

#### 1.3.2- La deuxième méthode

La seconde méthode comportait un fractionnement au sulfate d'ammonium d'acétone, un traitement au charbon de bois, filtration sur gel sur Sephadex G-100, et la cristallisation à partir d'eau-isopropanol. Les étapes ultérieures ont été réalisées entre 0° et 2°C. La centrifugation a été effectuée à 11000g pendant 30min. La dialyse contre 0,01M du tampon acétate, avec un PH=4,50.

Le matériel cristallisé avait seulement la moitié de l'activité spécifique du matériel purifié par la première méthode. [26]

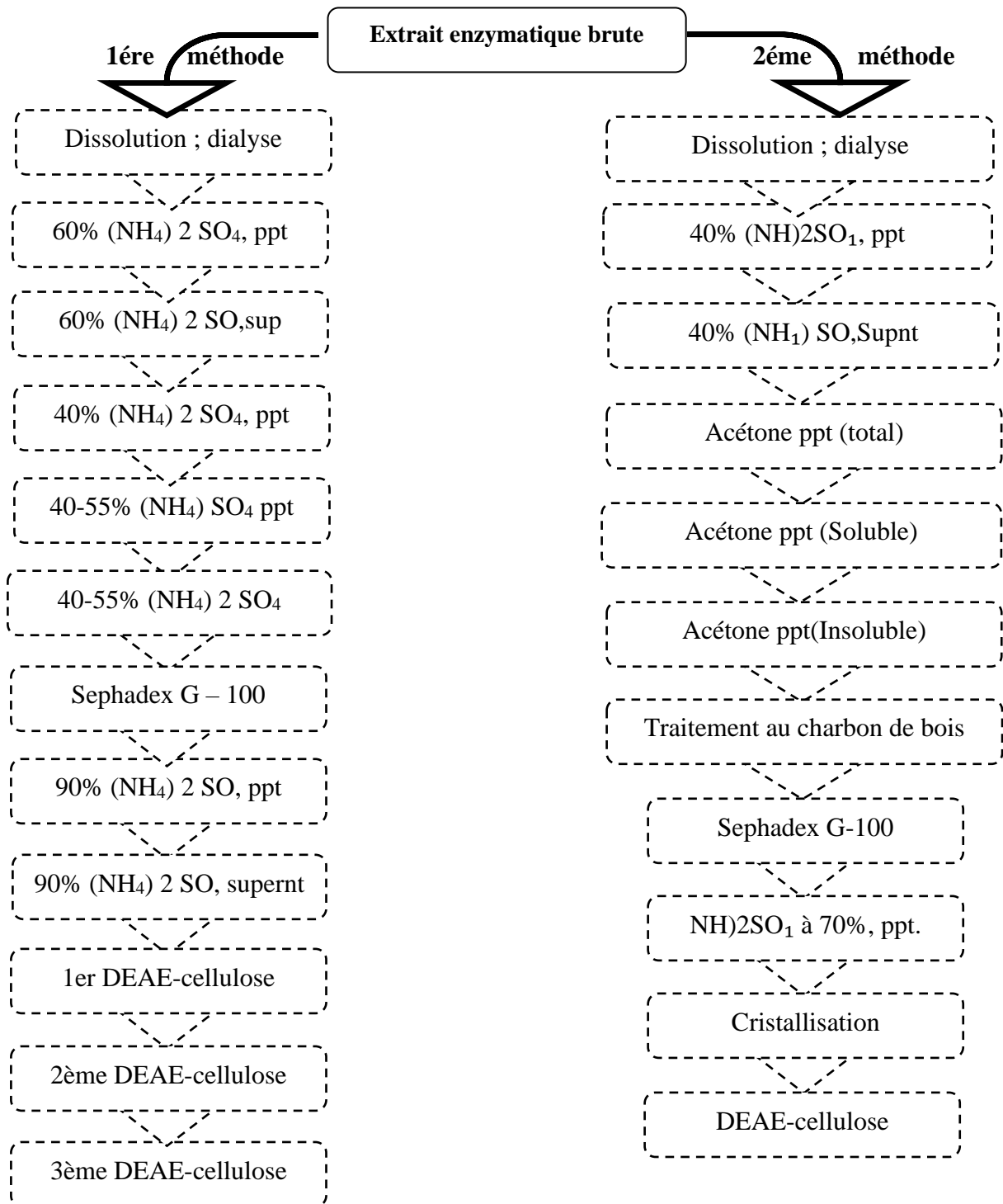


Figure 14: Schéma de purification de l'extrait coagulant d'*Endothia parasitica* [26]

### 1.4 Récupération de l'extrait coagulant

- La récupération globale de l'activité de coagulation de la 1ère méthode était plus grande que celle obtenue par la 2ème méthode ; 11,6>8,30. [17]
- La récupération à basse température en l'absence d'oxygène ; en poudre. [10]

## 2 L'extrait coagulant dérivé de *Mucor miehei*

### 2.1 La souche de *Mucor miehei*

#### 2.1.1 Définition

*Mucor miehei* est une espèce de champignons (moisissure) banale du sol ; appartient de la famille *Mucoraceae*. Cette espèce est plutôt thermophile. Il est cultivé dans des conditions permettant d'obtenir beaucoup de mycélium et peu de spores. L'enzyme est extrait du liquide, Qu'on l'appelle présure après élimination du mycélium, par des précipitations et filtrations diverses. Pour la coagulation du lait et la fabrication du fromage. [27]

#### 2.1.2 Classification

Classification	
Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Zygomycota</i>
Sous-division	<i>Mucoromycotina</i>
Ordre	<i>Mucorales</i>
Famille	<i>Mucoraceae</i>
Genre	<i>Mucor</i>
Espèce	

*Mucor miehei*



Figure 15: observation macroscopique de *Mucor miehei* [47]

## 2.1.3 Caractéristiques de la souche

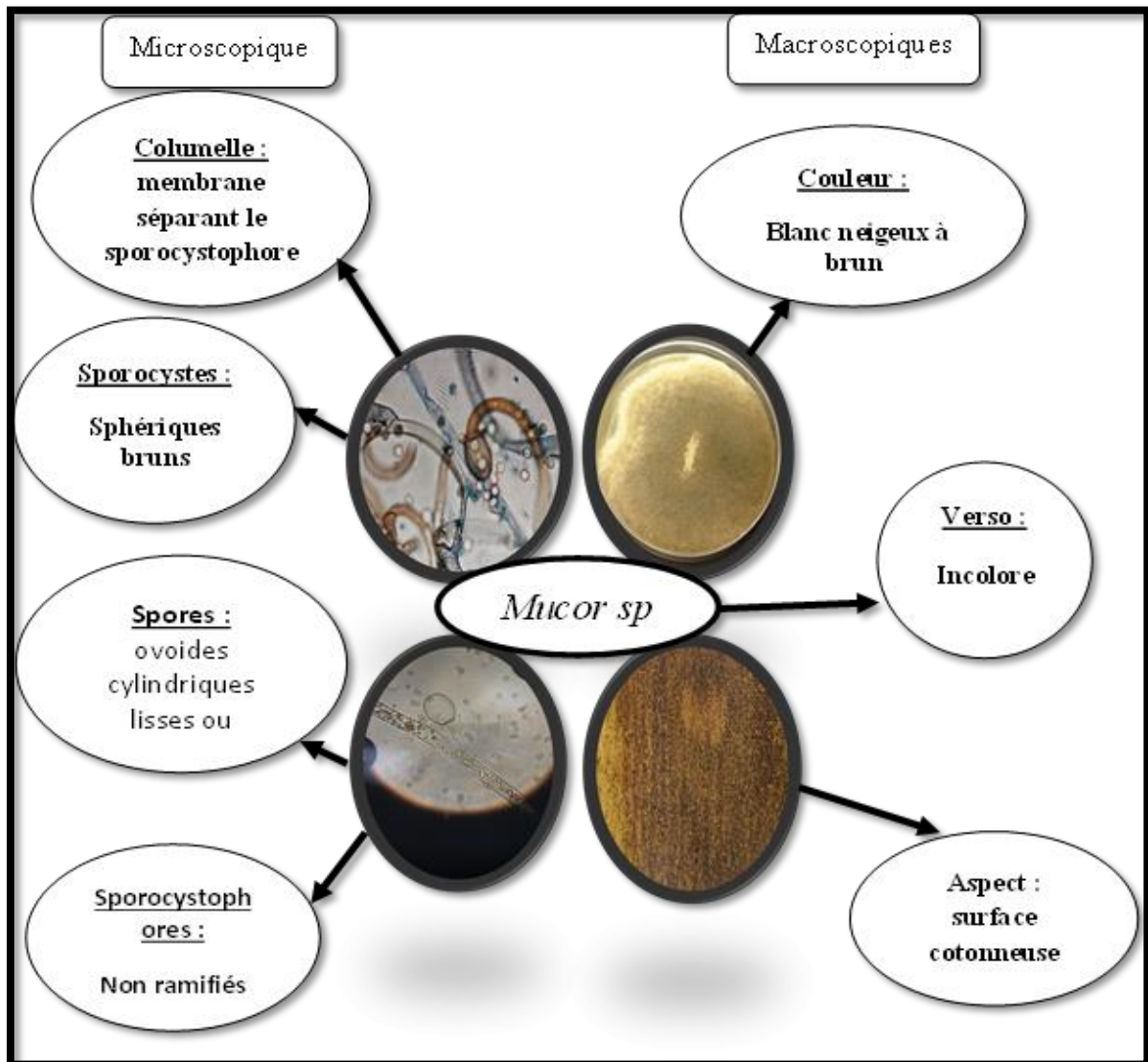


Figure 16: caractéristiques macroscopiques et microscopiques du *Mucor sp* [44]

## 2.2 Obtention de l'extrait coagulant

Le microorganisme producteur est un champignon mucoral ; il appartient à la classe des zygomycètes, le nom scientifique est *Mucor miehei* (CBS 370.65, NRRL 3420) ; c'est une souche thermophile, et le nom commercial de la préparation coagulante extraite de cette souche est Rennilase, [20] La culture de l'organisme est maintenue sur milieu Sabouraud agar à 15° C. Les fermentations utilisées sont de type submergé et solide.



**Figure 17:** *Mucor miehei* (CBS 370-65) : mycélium blanc, puis gris, zygospores globulaires de 30 à 45µm, de ton jaune, rouge ou brun (grossissement 500). [27]

La présure produite par *Mucor miehei* est une protéase acide-aspartate. L'enzyme est extraite de bouillon de fermentation et purifiée en plusieurs étapes, puis récupérée et cristallisée.

Dont le but obtenir l'extrait coagulant dérivé du *Mucor meihei*

**Tableau 10:** obtention de l'extrait coagulant dérivé du *Mucor meihei* [10,28].

Nature de fermentation	Cultivée en culture submergée (FLS)	Cultivée en culture solide (FMS)
Préparation du milieu de croissance	Glucose ; peptone ; caséine ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; liqueur de maïs et Proflo.	Son de blé ; caséine ; ajout de l'eau ou de HCl ; son de blé. L'humidité initiale du son de blé.
Préparation du milieu de culture	Sabouraud Agar à 15°C	Sabouraud Agar à 15°C
PH du milieu	6,0	6,0
Incubation/ agitation	L'agitateur à 35 °C et 150 rpm	À 35°C pendant 72H ;

### 2.3 Purification de l'extrait coagulant

La solution a été dialysée pendant 24 heures contre un grand volume d'eau distillée et lyophilisée. [27]

La séparation de la protéase de coagulation à partir de *Mucor miehei*, contient cinq étapes de purification, chaque étape contient plusieurs fractions, en donnant à la fin une préparation cristalline.

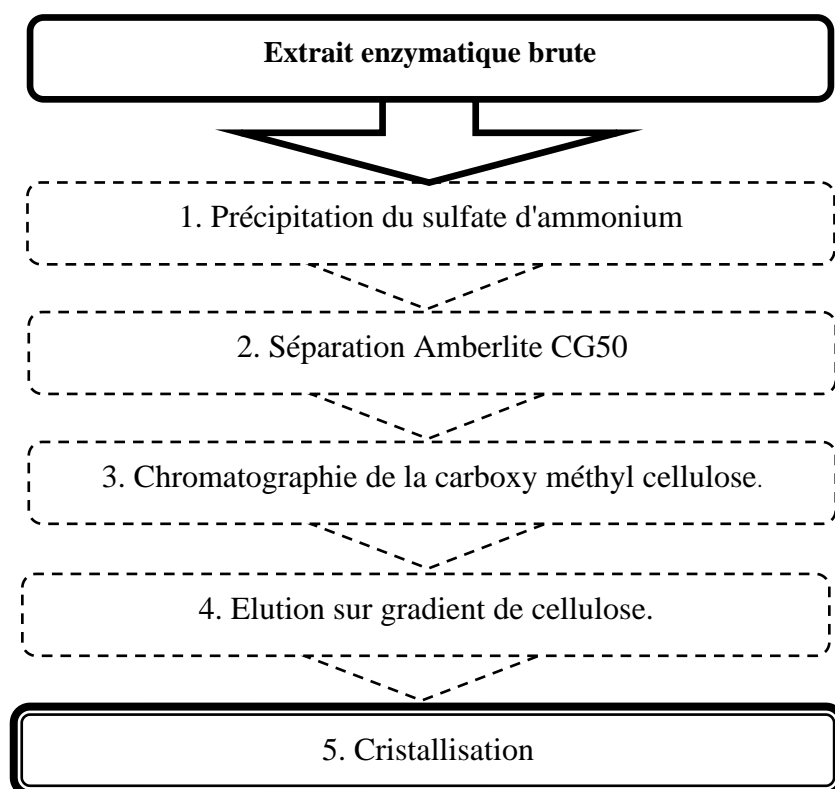


Figure 18: Schéma de purification de *Mucor miehei* [29]

### 2.4 Récupération de l'extrait coagulant

La récupération globale de l'activité de coagulation y compris l'étape cristalline, était de 37,2 %. [29]

### 3 L'extrait coagulant dérivé de *Mucor pusillus*

#### 3.1 La souche de *Mucor pusillus*

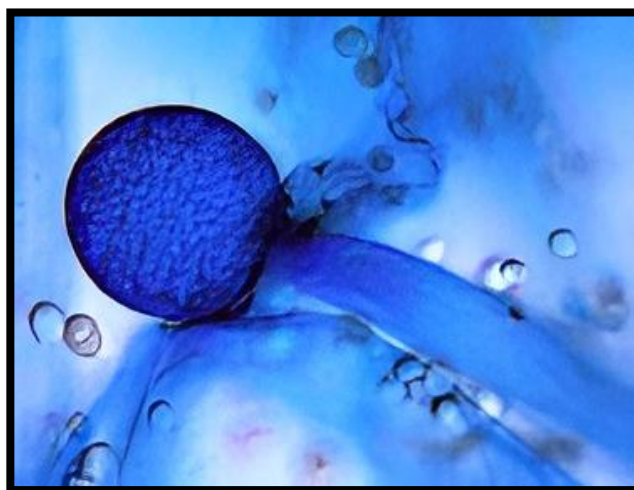
##### 3.1.1 Définition

En culture, *Mucor pusillus* est une espèce thermophile qui peut croître à des températures comprises entre 54 °C et 58 °C. Une espèce différente, *Mucor variables* a une température de croissance maximale de 38°C. [30] et est un champignon mucoral, il appartient à la classe des zygomycetes, La culture de l'organisme est maintenue sur milieu Sabouraud agar à 35° C. La fermentation utilisée est de type solide ou submerges.

##### 3.1.2 Classification

Classification	
Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Zygomycota</i>
Sous-division	<i>Mucoromycotina</i>
Ordre	<i>Mucorales</i>
Famille	<i>Mucoraceae</i>
Genre	<i>Rhizomucor</i>
Espèce	

*Rhizomucor pusillus*



**Figure 19:** observation microscopique du *Mucor pusillus* [48]

##### 3.1.3 Caractéristiques de la souche

Le genre *Mucor sp* a les mêmes caractéristiques soit *Mucor miehei* soit *Mucor pusillus*, illustrés par (la figure 16).

#### 3.2 Obtention de l'extrait coagulant

Le microorganisme producteur est un champignon mucoral ; il appartient à la classe des zygomycètes, le nom scientifique est *Mucor pusillus* ; c'est une souche thermophile, et le nom commercial de la préparation coagulante extraite de cette souche est Présure nourricière (alichandis), La culture de l'organisme est maintenue sur milieu Sabouraud agar à 35° C. La fermentation utilisée est de type solide.

La présure produite par *Mucor pusillus* est une protéase acide-aspartate. L'enzyme est extraite de bouillon de fermentation et purifiée en plusieurs étapes, puis récupérée et cristallisée.

**Tableau 11:** obtention de l'extrait coagulant dérivé du *mucor pusillus* [2]

Nature de fermentation	Cultivée en culture solide
Préparation du milieu de croissance	La gélose dextrose de pomme de terre ou la gélose d'extrait de malt
Préparation du milieu de culture / production	Son de blé
PH du milieu	5,0
Incubation	À 35°C pendant 5 jours ;

### 3.3 Purification de l'extrait coagulant

La protéase du champignon *Mucor pusillus* a été purifiée par deux méthodes. Les principales étapes des 2 méthodes sont : Précipitation au sulfate d'ammonium, dessalage de l'extrait enzymatique et la concentration en saccharose. La dialyse contre le tampon phosphate (0,02M ; PH=6) à +4°C pendant 16h. [31]

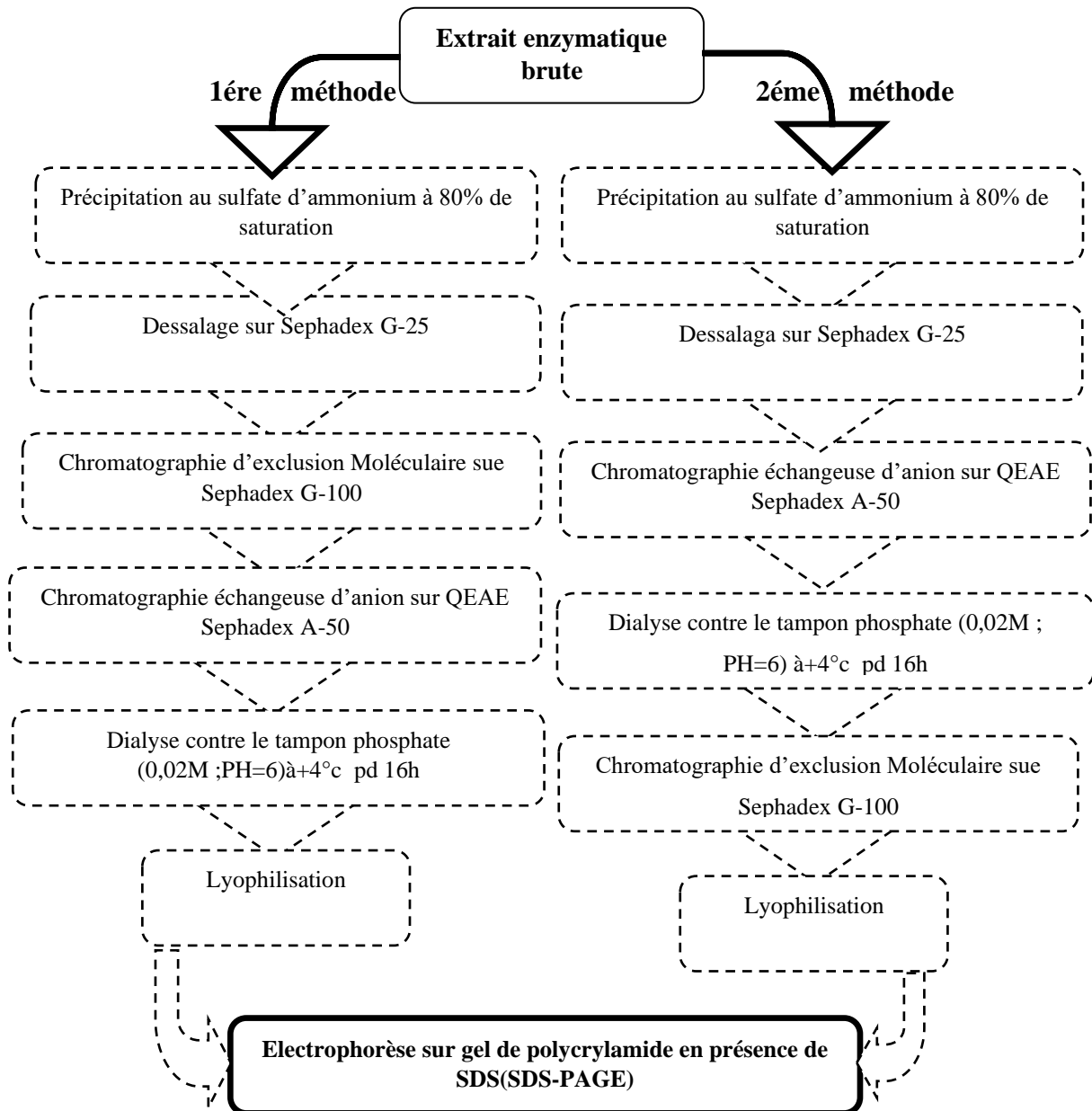
#### 3.3.1 La première méthode

La 1<sup>ère</sup> méthode, qui préconise une échangeuse d'ions suivie d'une gel filtration. [19]

#### 3.3.2 La deuxième méthode

La 2<sup>ème</sup> méthode, inverse les étapes de purification. [32]





**Figure 20:** Schéma de purification de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus* [19,33]

### 3.4- Récupération de l'extrait coagulant

La récupération globale de l'activité de coagulation de la 1ère méthode était plus grande que celle obtenue par la 2ème méthode ;  $18,82 > 10,03$ .

#### 4 L'élimination des enzymes contaminants associées aux présures fongiques

La présence d'enzymes contaminants telles que la cellulase, la lipase, l'estérase, la protéase non spécifique et autres, ainsi que de coagulants microbiens, pose de sérieux problèmes pendant la fabrication du fromage. Ces contaminants augmentent les chances de variation de la qualité des lots individuels de présure microbienne. En outre, ils interfèrent également avec la transformation du fromage et empêchent le bon développement de la texture. [10]

Le **tableau 12** résume les différentes méthodes utilisées pour l'élimination des contaminants accompagnant les présures microbiennes commerciales.

**Tableau 12:** Méthodes d'élimination des enzymes indésirables des présures fongiques [10]

L'enzyme contaminant /impureté	Microorganisme	Traitement
<b>Estérase</b>	<i>Mucor michei</i>	pH 2,0-3,5 à 20°-55°C jusqu'à ce que l'estérase décompose.
<b>Lipase</b>	<i>Mucor michei</i>	Précipitation à pH 4,5-4,7 et élimination par centrifugation.
<b>Lipase</b>	<i>Mucor michei</i> <i>Mucor pusillus</i>	Précipitation réversible avec polyionique Polymères.
<b>Protéase non spécifique</b>	<i>Mucor michei</i> <i>Endolhia parasilica</i>	Traitement au silicate.
<b>Protéase non spécifique</b>	<i>Endolhia parasilica</i>	Filtration sur gel et chromatographie sur CM-cellulose.

## 5 Les critères des succédanés

Tout succédané de présure doit respecter, les modalités habituelles du déroulement du processus de la fabrication fromagère et doit répondre aux critères suivants :**[50]**

- Le pouvoir protéolytique du coagulum ne doit pas être trop élevée ;
- Les propriétés rhéologiques de l'agglomérat doivent évoluer après floculation de manière à assurer le travail mécanique du gel dans les délais usuels.
- La synérèse du coagulum pendant l'égouttage et la maturation devrait donner les caractéristiques habituelles du fromage dans sensiblement la même période de temps que la présure.
- Le rendement fromager doit être très proche ou supérieur à celui de la présure.

D'autre part, l'utilisation des enzymes doit respecter une réglementation stricte pour éviter tout risque de toxicité. **[51]**

- Le milieu utilisé pour les enzymes microbiennes ne doit laisser aucun résidu nocif ou toxique ;
- Les micro-organismes utilisés doivent être non pathogènes et ne pas produire de toxines ou de substances cancérigènes ;
- Les préparations enzymatiques vendues ne doivent pas contenir de contaminants microbiens ;
- Les stabilisants et les diluants doivent être en bon état ;
- Le dosage des préparations enzymatiques doit être respecté pour éviter les conséquences dangereuses d'un surdosage ;

Par ailleurs, un contrôle de pureté doit être effectué de façon systématique au cours de la production pour les préparations enzymatiques microbiennes.

# CHAPITRE II

## Chapitre III : discussion des Propriétés et utilisations des coagulase

Les propriétés de ces coagulases ont été déterminées en mesurant les facteurs influençant sur l'activité coagulante ; l'influence de température, du pH et du Calcium soluble ajouté et le pouvoir protéolytique ; en mesurant l'azote soluble non protéique libéré. Ainsi, d'autres propriétés ont été aussi analysés ; stabilité thermique, l'inhibition et l'activation des enzymes, poids moléculaire et déterminer nombre des acides aminés résidus dans les extraits coagulants.

### 1 L'activité coagulante

La mesure est basée sur l'influence des facteurs affectant la coagulation :

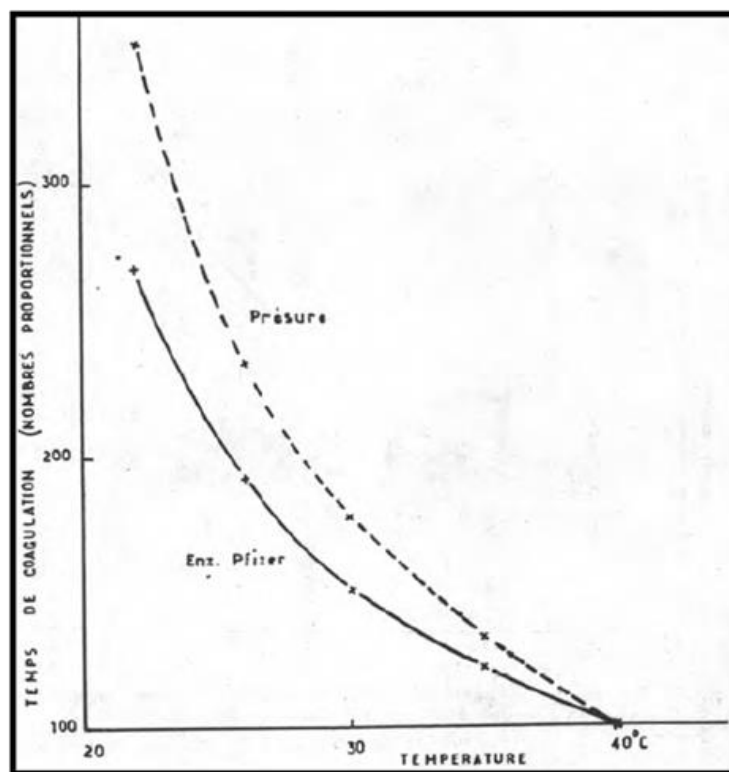
Température, pH et teneur en Calcium  $\text{CaCl}_2$ . [33]

#### 1.1 Influence de température

- **Extrait 1- L'extrait coagulant dérivé d'*Endothia parasitica***

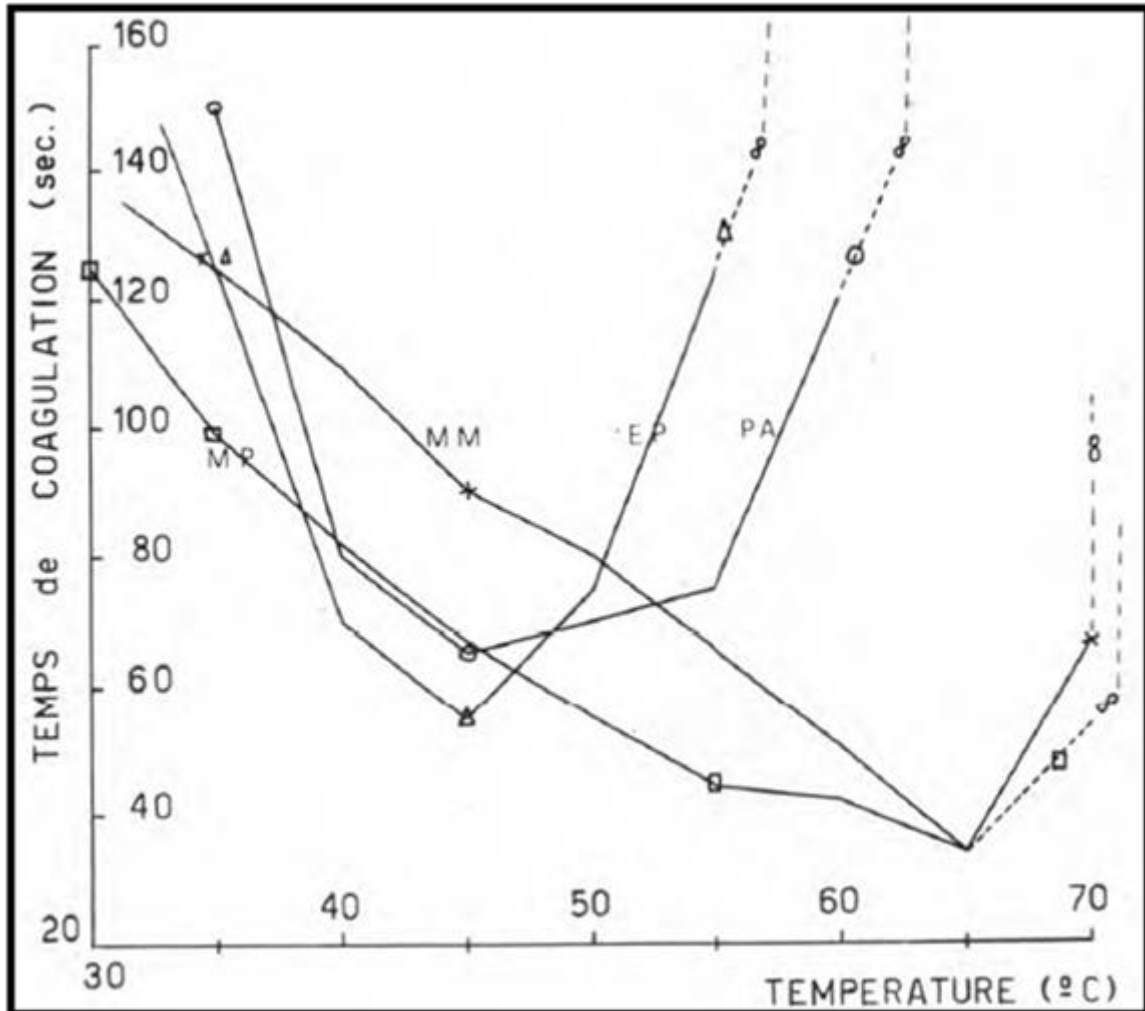
L'activité maximal de cette enzyme a été à 40 °c l'enzyme est moins sensible aux variations de température que la présure animale ; l'activité coagulante maintient mieux que la présure animale lorsque la température diminue.[25]

L'effet de température sur le temps de coagulation est illustré par (la figure 21).



**Figure 21:** Influence des variations de température (de 20 à 40° C) sur l'activité coagulante de l'enzyme « Pfizer » et de la présure animale [25]

Presque les mêmes résultats obtenus en 1973, indiquent une ressemblance remarquable dans le comportement d'extrait coagulant dérivé d'*E.parasitica* et la présure animale ; un maximum d'activité coagulante à 45°C, illustré par (la figure 22). [33]



**Figure 22:** Influence de la température sur le temps de coagulation par quatre enzymes : présure animale (P.A.), *Mucor pusillus* (M.P.), *Mucor miehei* (M.M.), *Endothia parasitica* (E.P.) [33]

L'enzyme est détruit à haute température 60°C pendant 5 min [23]

- **Extrait 2- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor miehei***

Cette enzyme est plus sensible aux variations de la température, l'activité coagulante maximale a été à 40°C. [27]

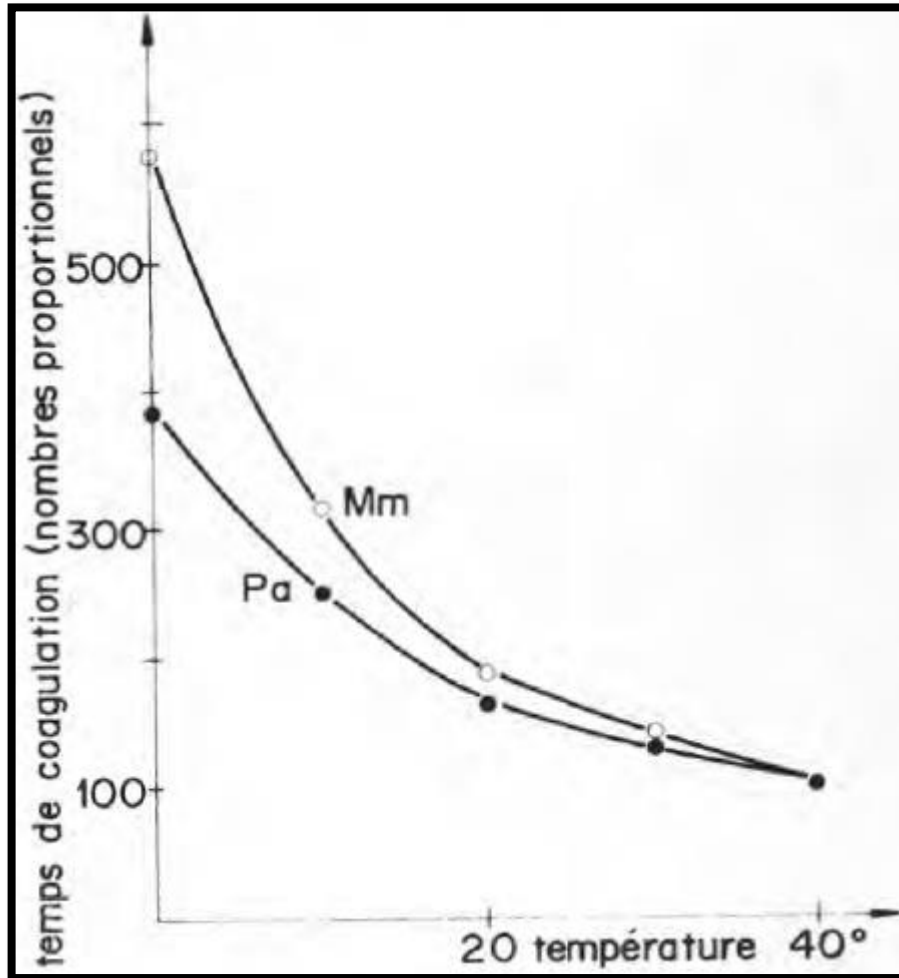
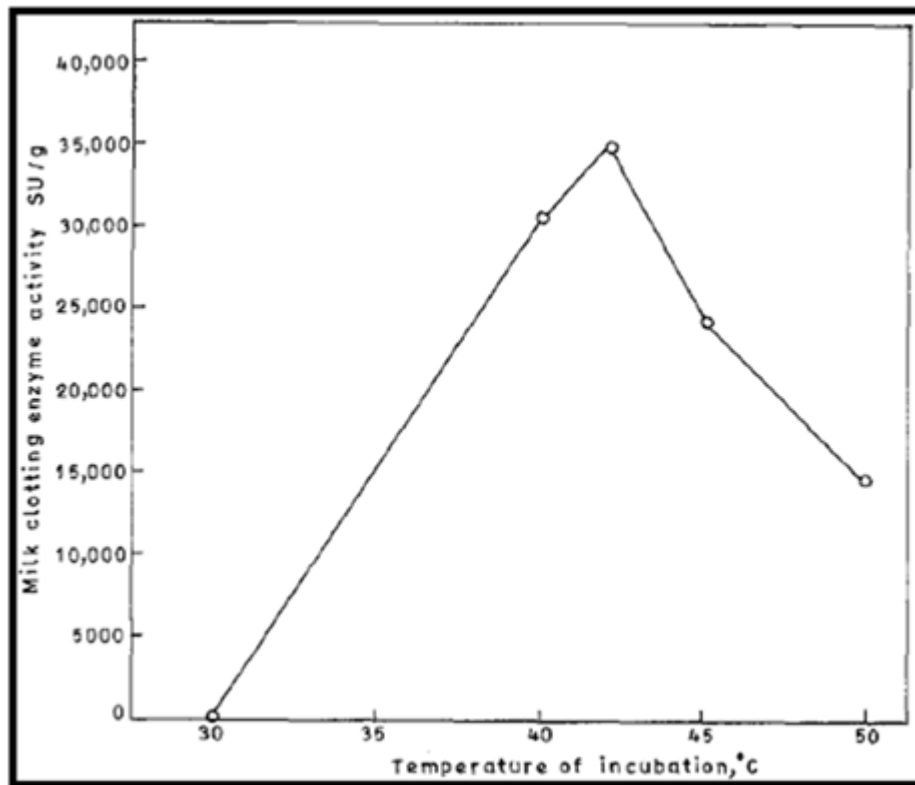


Figure 23: Influence de la température sur le temps de coagulation [27]

Des résultats obtenus en 1973, l'extrait coagulant dérivé de *M.miehei* a montré une activité coagulante maximale à 65°C. [33]

Par contre, des résultats plus récents a montré que l'activité coagulante maximale de cet extrait a été à 42°C, et dans l'intervalle de température supérieure et inférieure, y'a une baisse considérable de l'activité exprimée par (la figure 24). [18]



**Figure 24:** Effet de l'humidité du substrat sur l'enzyme de coagulation du lait Production [19]

- **Extrait 3- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor pusillus***

Un optimal d'activité coagulante a été obtenus à 55°C. [19]

La figure 25, a montré un maximum d'activité coagulante à 65°C, proche de la température d'inhibition thermique.

Des études plus récente sur la coagulase de *M.pusillus*, ont rapporté un optimum thermique de 55°C . [10]

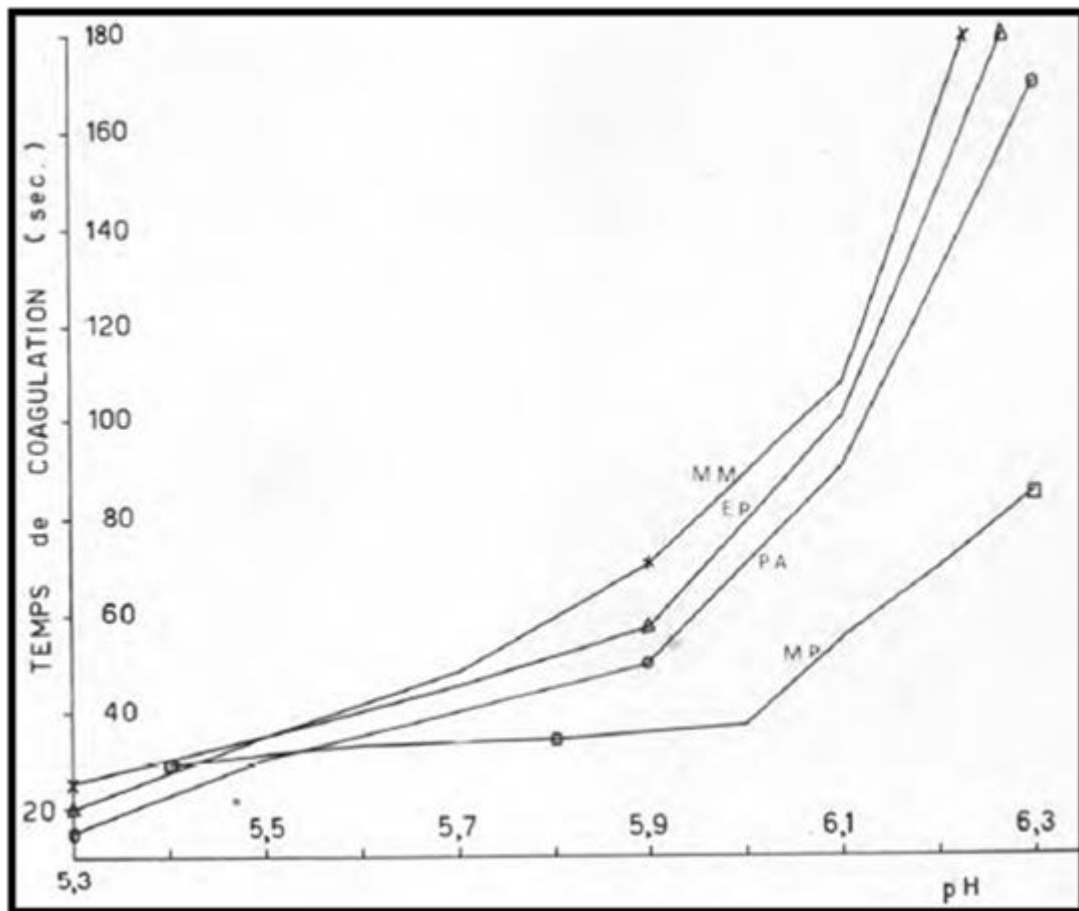
## 1.2 Influence du PH :

- **Extrait 1- L'extrait coagulant dérivé d'*Endothia parasitica***

Lorsque le PH augmente, l'augmentation du temps de coagulation a été significativement réduite avec l'enzyme d'*E.parasitica* est meilleur que la présure animale.

Au-delà de pH 6.5, l'enzyme se coagule plus facilement que la présure animale [25]. D'une autre part, la coagulase d'*E.parasitica* montre une sensibilité à la variation de pH entre pH 5,3 et pH 6, illustré par la figure 25, qui montre une activité coagulante maximale a un pH moins que 5,3 et une augmentation du temps de coagulation au-delà de cette valeur. [33]





**Figure 25:** Influence du pH sur le temps de coagulation par Quatre enzymes : présure animale (P.A.), *Mucor pusillus* (M.P.), *Mucor miehei* (M.M.), *Endothia parasitica* (E.P.) [33]

- **Extrait 2- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor miehei***

Le tableau 13, l'enzyme fongique de *M.miehei* a indiqué une activité maximale entre pH 5,5 à pH 6,5, l'activité coagulante devient très lente à des pH supérieurs à pH 7,0 ; l'inactivité progressive d'enzyme. [27]

**Tableau 13:** Temps de coagulation du lait en fonction du pH (min) [27]

PH	5,55	5,83	6,0	6,22	6,32	6,44	6,53	6,62	6,70	6,85
<b>Présure animale</b>	0,82	1,13	1,38	1,95	2,56	3,71	5,50	8,88	11,51	29,45
<b>Enzyme Mm</b>	0,85	1,22	1,47	2,10	2,71	3,81	5,86	8,92	11,89	31,75

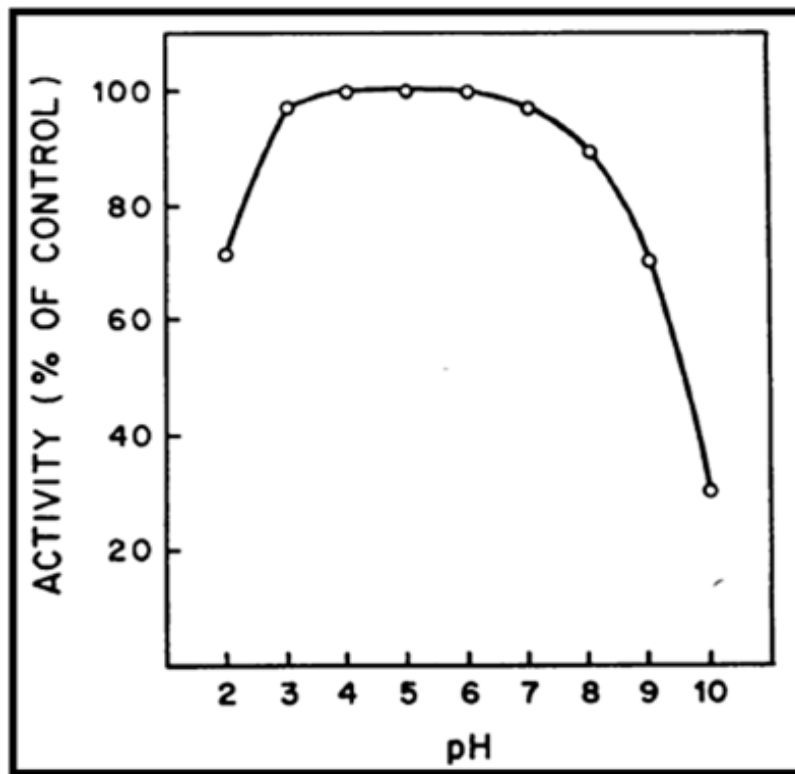
Des résultats plus récents obtenus en 1973 rapportent une diminution de l'activité au-delà de pH 5,3. [33]

Un pH optimal de 5,2 a été rapporté par une étude faite en 2005 qui confirme le 1<sup>er</sup> résultat. [28]

Des résultats plus récentes, expérimentés et obtenues en 2008, ont indiqués que l'activité coagulante atteint son maximum entre pH 4 et pH 4,5. [34]

- **Extrait 3- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor pusillus***

La coagulase de *M.pusillus* a rapporté un maximum d'activité coagulante à pH optimum voisin à 3,8 [19], illustré par (la figure 26)



**Figure 26:** Stabilité de la protéase acide au pH [19]

En revanche, l'activité coagulante de l'extrait reste stable jusqu'à pH 6. [33]

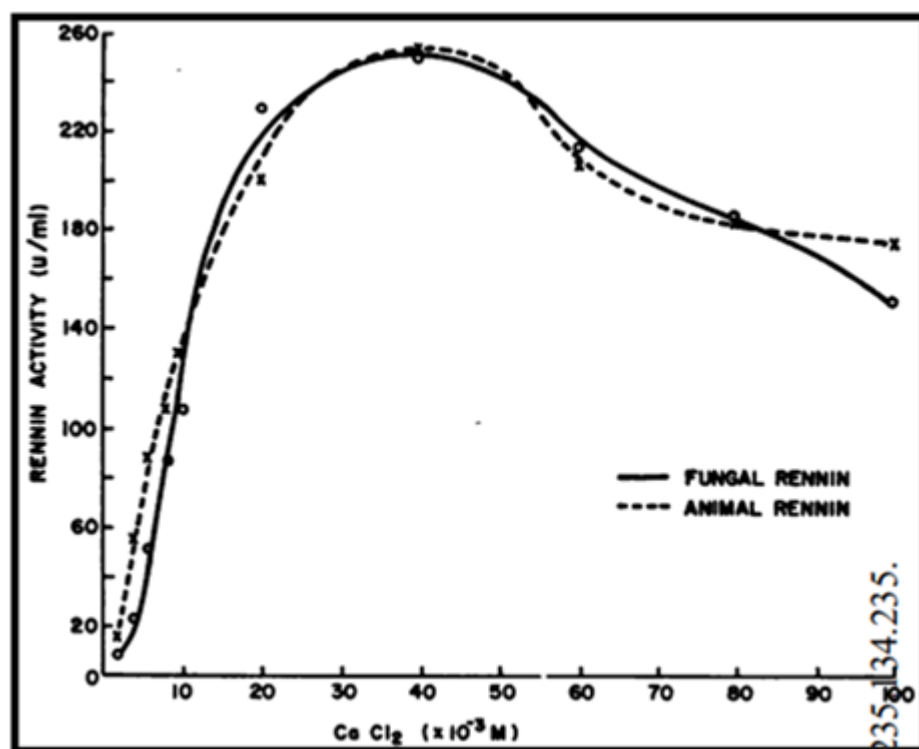
Des résultats plus récents [52], et confirment les résultats obtenus par [19], ont rapporté un pH optimum de 3,8, d'un autre côté l'optimum d'hydrolyse de la caséine par la chymosine et la pepsine est compris entre pH 5,4 et pH 5,7 et entre pH 2 et pH 3.

### 1.3 Influence de Calcium soluble :

- **Extrait 1- L'extrait coagulant dérivé d'*Endothia parasitica***

Une étude faite en 1968, l'extrait enzymatique est moins sensible aux variations de la teneur en Calcium que la présure animale ; l'activité coagulante atteint son maximum au faible teneur en calcium. [25]

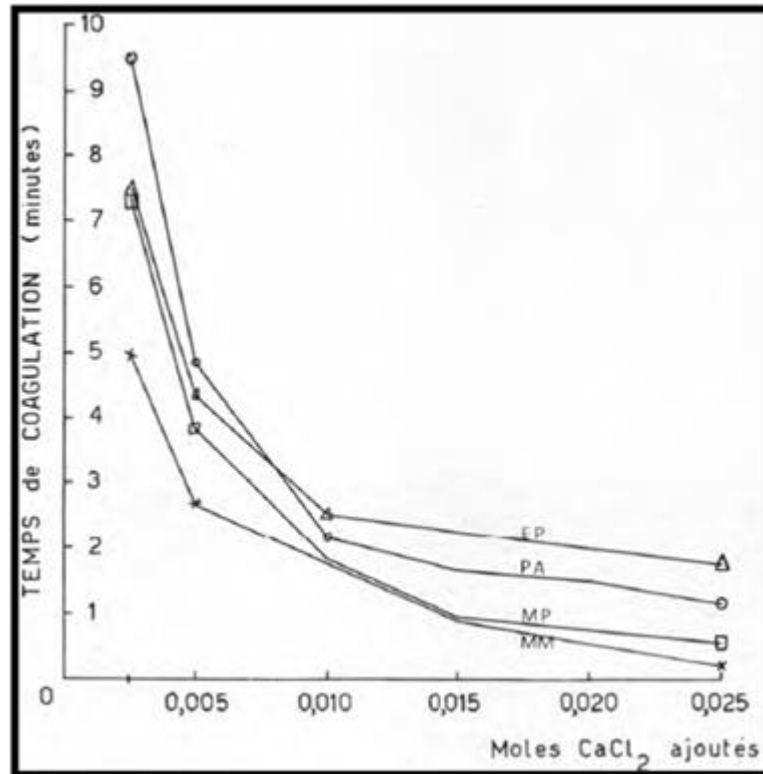
L'activité de coagulation de l'extrait fongique et animale s'est avérée être essentiellement identiques en contenant diverses concentrations de  $\text{CaCl}_2$ , Les deux extraits ont manifesté une réponse parallèle d'activité de coagulation. [23]



**Figure 27:** Réponses fongiques et animales diverses concentrations de  $\text{CaCl}_2$  dans le lait [33].

Des résultats plus récents obtenus en 1973, ont montrés que les deux enzymes sont sensibles aux ions de calcium à faible concentrations, cette sensibilité est légèrement plus grande quand les teneurs de calcium ajoutés augmentent, qui signifie que l'activité de coagulation augmente à son maximum et le temps de cette activité diminue lorsque les teneurs de calcium augmentent. [33]

L'effet du calcium soluble sur le temps de coagulation est illustré par la figure 28.



**Figure 28:** Influence du calcium sur le temps de coagulation par Quatre enzymes : présure animale (P.A.), *Mucor pusillus* (M.P.), *Mucor miehei* (M.M.), *Endothia parasitica* (E.P.) [33]

- **Extrait 2- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor miehei***

L'extrait coagulant dérivé de *M.miehei* est peu sensible aux ions de Calcium que la présure animale, quand les quantités de  $Ca^{2+}$  sont aux minimum ; presque 0,008M de Calcium le temps de coagulation n'a été pas dans son minimum [33]. Les mêmes résultats ont été obtenus et confirmés en 2008, et aussi, quand les doses de Calcium ajoutés sont plus de 0,010 jusqu'à 0,025 presque, l'enzyme fongique a montré une sensibilité légèrement plus grande que la présure animale ; ce qui donne une activité de coagulation maximale. [34]

Les même résultats et opinions sont obtenus en 1972, ces expériences ont montrés que l'activité coagulante atteint son maximum dans des concentrations élevées de  $Ca^{2+}$ . Au-dessous ou au-delà de cette concentration, l'enzyme devient moins sensible et le temps de coagulation augmente ; activité coagulante lente. Ce qui confirme les résultats de la concordance comparable entre l'extrait dérivé de *M. miehei* et la présure animale. [27]

- **Extrait 3- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor pusillus***

L'optimum d'activité coagulante de l'extrait obtenue pour une concentration de 0,02M de  $\text{CaCl}_2$  qui est la même pour la présure animale. [2]

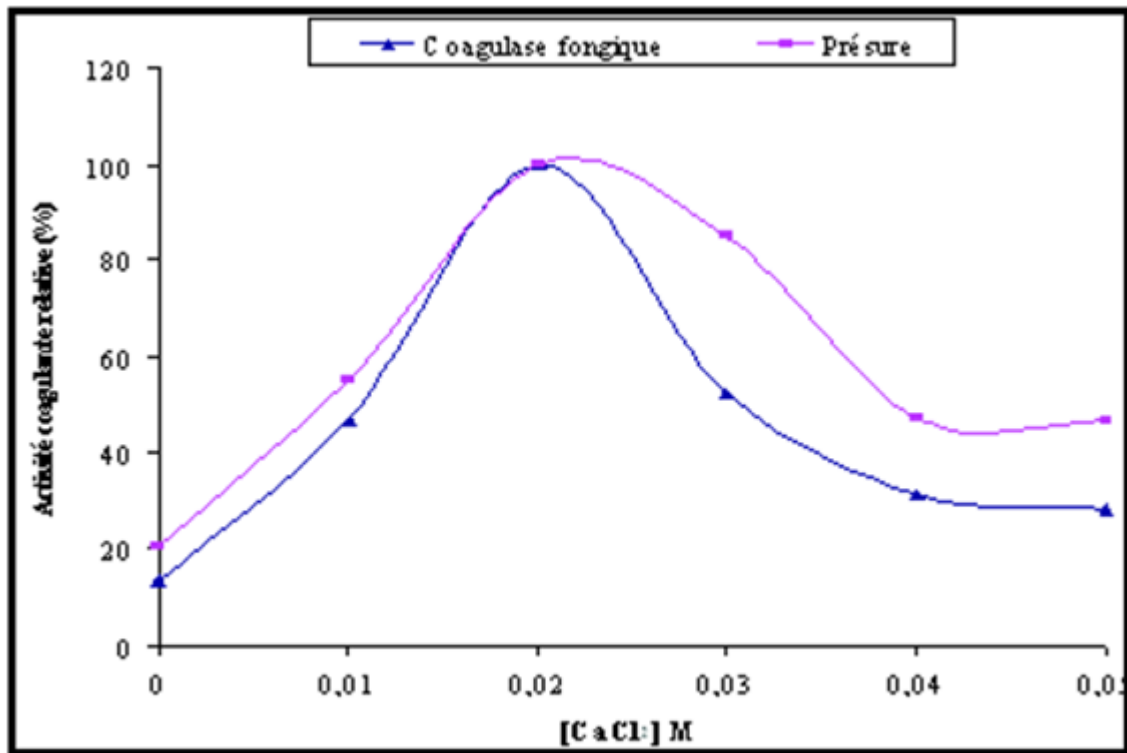


Figure 29: Effet de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  du lait sur l'activité coagulante [2]

Au-delà de cette concentration (0,02M de  $\text{CaCl}_2$ ), la coagulase de *M.pusillus* a montré une sensibilité légèrement grande aux ions de Calcium. [33].

L'activité baisse par un effet inhibiteur de l'ion de Calcium. [2]

## 2 L'activité protéolytique :

L'action protéolytique sur la caséine est caractérisée par la mesure de l'accroissement d'azote non protéique (NPN), à partir du substrat emprésuré (lait). Les concentrations en présure sont telles que 1 ml de solution enzymatique coagule à 35° C 100 ml de substrat après 8 mn.

- **Extrait 1- L'extrait coagulant dérivé d'*Endothia parasitica***

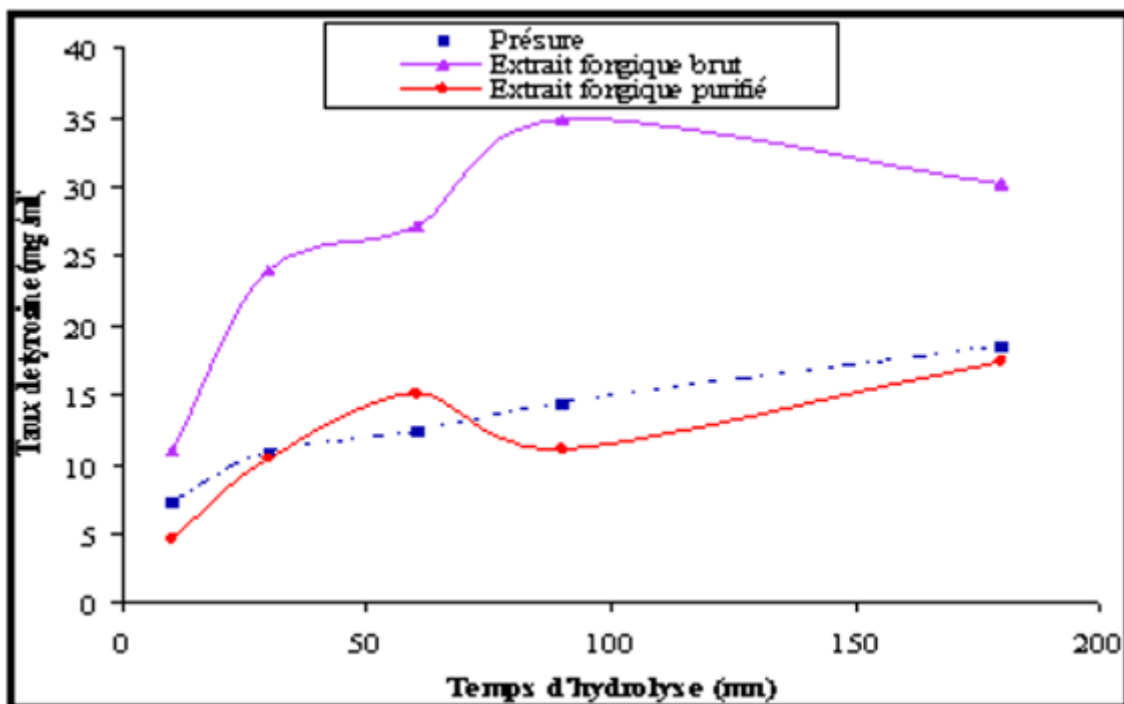
Les résultats obtenus ont montré que l'enzyme coagulant a une faible activité protéolytique que celle obtenue de la présure animale. [23]

- **Extrait 2- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor miehei***

L'activité protéolytique sur la caséine est plus progressive que celle de la présure, la proportion d'azote non protéique libéré par l'enzyme de *M. miehei* est faible. Le maximum d'activité protéolytique sur la caséine se situe entre pH 3,5 et 5,5. L'enzyme résiste bien à la congélation et à la dessiccation. [29]

- **Extrait 3- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor pusillus***

L'évolution d'azote non protéique rapporté au cours de l'hydrolyse enzymatique de la caséine a été rapportée par la figure 30. [2]



**Figure 30:** Activité protéolytique des échantillons étudiés [2]

La protéolyse de l'extrait enzymatique purifié évolue rapidement pour atteindre un maximum au bout d'une heure d'incubation, au-delà de cette durée, elle diminue. [2]

### 3 Autres propriétés :

D'autres propriétés ont été prises en considération pour les extraits coagulants, les suivants :

### 3.1 Stabilité de l'activité des extraits coagulant :

- **Extrait 1- L'extrait coagulant dérivé d'*Endothia parasitica***

Des résultats obtenus en 1968, ont montré que l'enzyme est stable à pH 4,5. [23]

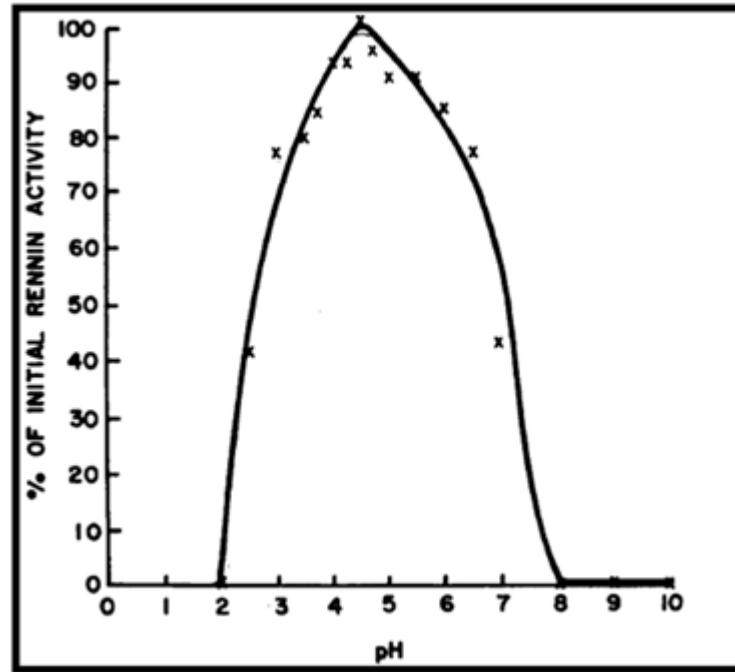


Figure 31: Stabilité du pH en rénine [23]

Ce qui concerne sa thermo stabilité, cette enzyme est détruite à 60°C pendant 5 min, elle perd 40% de son potentiel à 20°C pendant 10 jours. [23]

La stabilité de l'enzyme paraît être excellente ; il a gardé la même activité coagulante pendant 10 mois à une conservation froide de 4°C à 7°C. [25]

Autres études en 1970, l'enzyme est stable entre pH 3,8 à 4,5. A 50°C, il perd juste 30% de son activité pendant 30 min. Au-delà de pH 6,5, l'activité de l'enzyme se perd rapidement et se perd directement à pH 8. [17]

- **Extrait 2- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor miehei***

La protéase est remarquablement stable à 40°C. Cette enzyme à une bonne stabilité, l'enzyme perd 4% de son activité en 6 mois à 4°C sur une large gamme de pH. [29]

Des résultats obtenus en 1972, montrent que cette enzyme est stable entre pH 3 et pH 6. A des valeurs supérieures à pH 8,5 la protéase devient instable. [34]

L'enzyme résiste bien à la congélation et la dessiccation. [27]

- **Extrait 3- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor pusillus***

L'activité protéolytique résiduelle a été déterminée à 30°C. La figure 32 montre une stabilité thermique dans l'intervalle de 30°C à 50°C. [19]

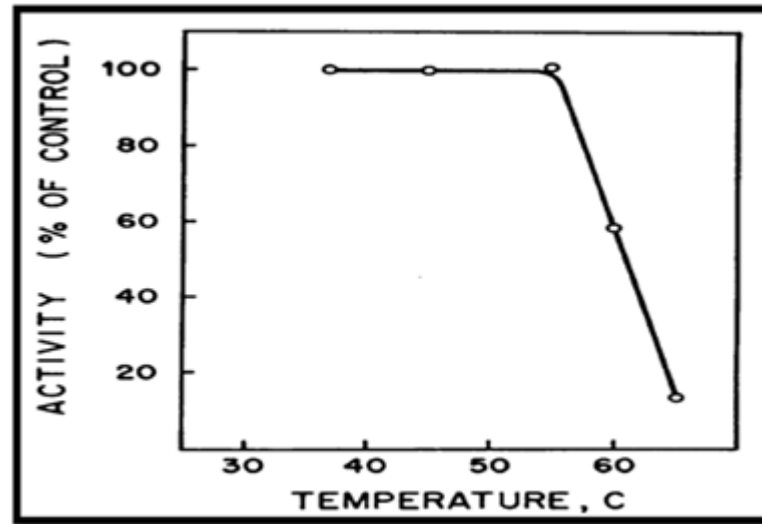


Figure 32: Stabilité à la chaleur de la protéase acide purifiée [19]

La protéase fongique présente une baisse ; d'abord progressive de son activité coagulante à 55°C, puis rapide à 60°C [2]

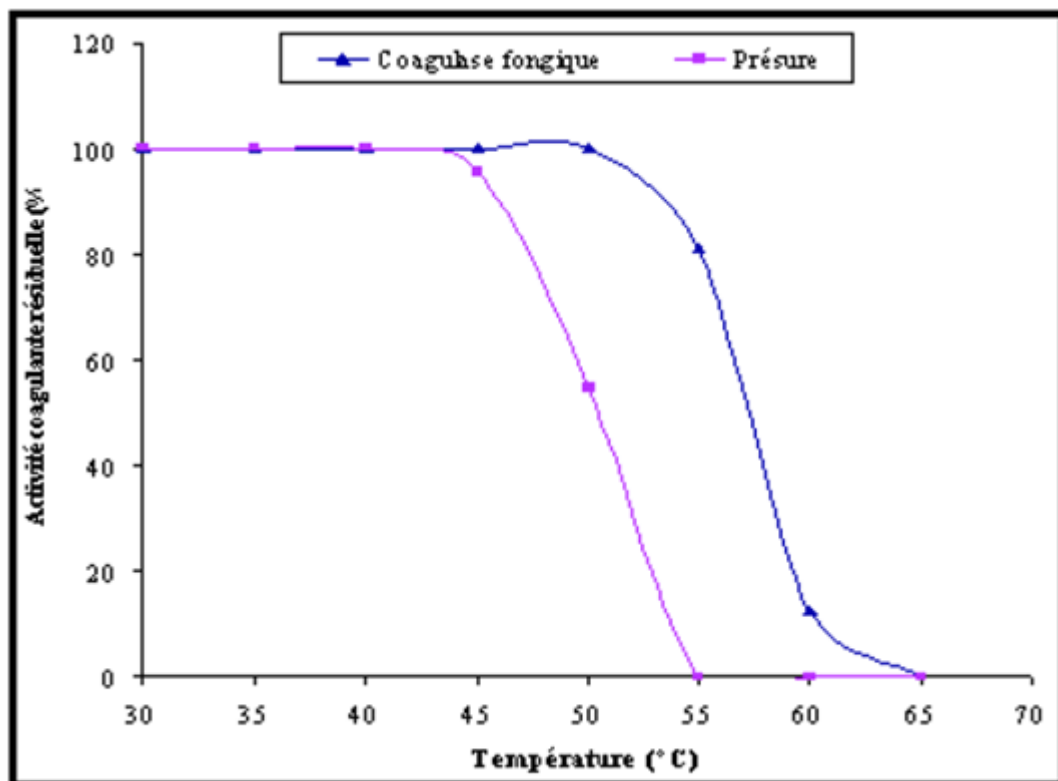


Figure 33: Stabilité thermique de l'extrait purifié du *mucor pusillus* et de la présure [2]



La protéase a perdu environ 90% de son activité après une exposition à 65°C pendant 15 min. [19]

L'extrait purifié ne montre aucune baisse d'activité, à -18°C, au bout de 56 jours ; à 70 jours, l'enzyme perd 23,38 % de son activité initiale. [2]

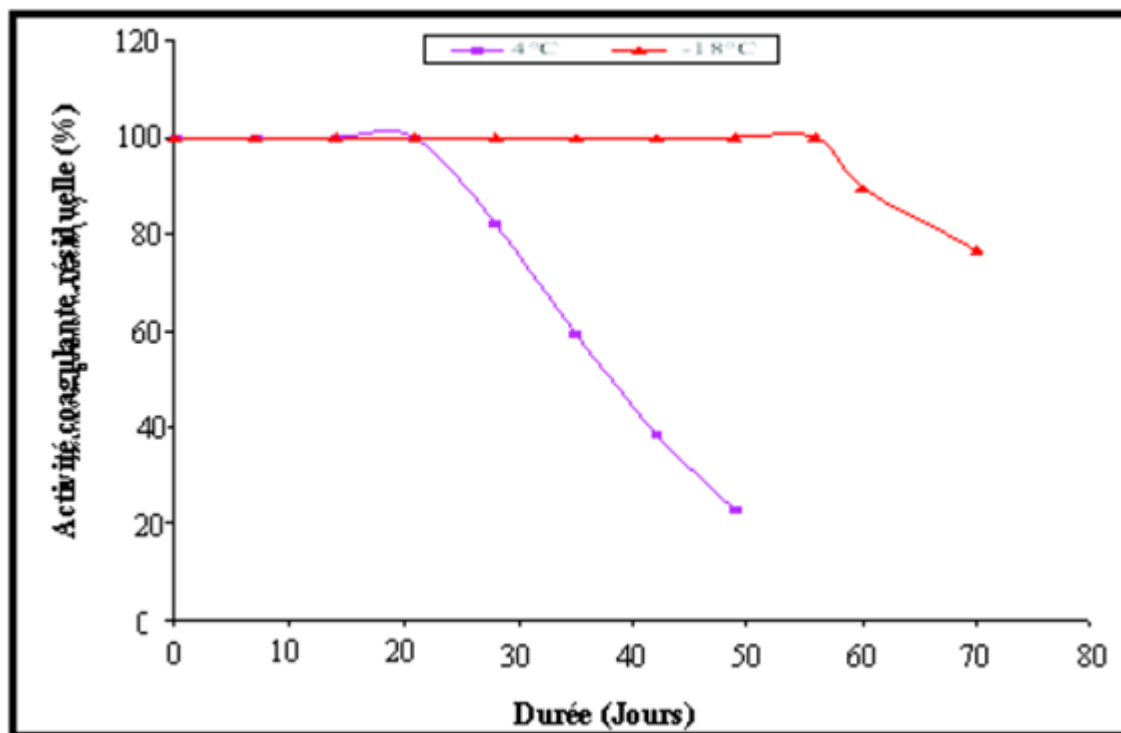


Figure 34: Stabilité de l'extrait purifié au cours de la conservation [2]

L'extrait enzymatique dérivée de *M.pusillus*, a exposé une stabilité dans un intervalle de pH entre 3,0 et 6,0. [19]

L'extrait coagulant a indiqué une sensibilité nulle entre pH 5,3 et pH 6. [33]

### 3.2 Inhibition et activation de l'activité des extraits coagulant :

- **Extrait 1- L'extrait coagulant dérivé d'*Endothia parasitica***

L'enzyme n'est pas inhibée ni par le sodium tetrathionate, ni par HgCl<sub>2</sub>, ni N-éthylmalimide, ni iodocetonide, ni P-chromercuribenzoate, ni cysteine. [17]

- **Extrait 2- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor miehei***

L'activité coagulante et protéolytique ont été inactivées par : HgCl<sub>2</sub>, mereaptoethanol, Aluminium et le cuivre. [10]

Les effets des inhibiteurs indiquent que cette enzyme n'est pas dépendante du métal.

[37]

- **Extrait 3- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor pusillus***

La protéase fongique est inactivée par les ions métalliques, et réactivée par Ethylene-Diaminetetraacetate et 0-phananethroline. [19]

### 3.3 Poids moléculaire :

- **Extrait 1- L'extrait coagulant dérivé d'*Endothia parasitica***

Le poids moléculaire de cette enzyme est entre 34000 DA et 37000 DA. [17]

Autres résultats, ont indiqués que le poids moléculaire de cette enzyme est 34000 DA.

[23]

- **Extrait 2- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor miehei***

Le poids moléculaire de l'extrait a été de 37000DA. [29]

D'autres résultats ont signalé par C. Alais et A. Lagrange, 1972, indiquent que le poids moléculaire de cette enzyme est 38000DA. [27]

Des études plus récentes, obtenues par Grag ont montrés que le poids moléculaire est entre 34000DA et 39000DA. [10]

- **Extrait 3- L'extrait coagulant dérivé de *Mucor pusillus***

L'enzyme purifiée de *M.pusillus* est une protéase acide typique avec un résidu aspartate sur son site actif, elle constitue d'une simple chaîne de peptides et son poids moléculaire est environ 30000 DA. [35]

Mais selon Garg, le poids est entre 29000 DA à 30600 DA. [10]

### 3.4 Nombre de résidus d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique

**Tableau 14:** Nombre de résidus d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique [10]

Organismes	<i>Endothia parasitica</i>	<i>Mucor Miehei</i>	<i>Mucor pusillus</i>
Nombres d'acides aminés			
Ala	29	22	16-17
Arg	2	4	4
Asp	26	42	44
Cys	2	4	2
Glu	15	15	20
Gly	38	24	34
His	3	2	1-2
Ileu	17	11	12
Leu	19	14	15
Lys	12	8	11-12
Met	1	5	3
Orn	-	1	-
Phe	13	14	19
Pro	13	11	14
Ser	44	25	22
Thr	50	18	21
Trp	3	3	2-3

Tyr	19	13	13
Val	22	16	24

#### 4 Utilisation industrielle des enzymes fongiques dans la préparation des fromages :

L'acceptation par les consommateurs des fromages fabriqués avec des présures microbiennes est un fait établi. Il n'y a pas d'identité parfaite entre la technologie fromagère utilisant la présure de veau et la technologie utilisant des coagulants microbiens, mais l'industrie a appris à utiliser les présures microbiennes, d'abord en mélange avec la présure de veau, puis en remplacement total, puis comme substituts totaux de la présure de veau. [16]

Les rendements obtenus avec les coagulants animaux et microbiens sont similaires. Les présures microbiennes produites par deux fabricants censés utiliser la même espèce de microorganisme peuvent donner des résultats différents si les présures n'ont pas été fabriquées avec des souches et des procédures de fermentation identiques. Les présures commerciales peuvent également avoir des compositions enzymatiques différentes. [16]

A l'échelle industrielle, les trois souches fongiques *Mucor pusillus*, *miehei* et *Endothia parasitica* sont exploitées par les grandes usines de fermentation en vue de fabrication fromagère. En effet, en 1974, les coagulants fongiques ont assuré la fabrication de 60% de fromage aux états unis [2]. La production extensive d'une grande variété de fromages (par exemple, cheddar, suisse, Colby, variétés italiennes, etc.) fabriqués avec des préparations partiellement purifiées de coagulase. [23]

La saveur, la texture et l'apparence en général se comparent favorablement aux témoins de fromages fabriqués avec la présure animale. De nombreuses variétés de fromages ont été préparées à partir de lait avec des présures microbiennes. [16]

**Tableau 15:** Les fromages fabriqués avec les extraits coagulants fongiques [16]

Présure microbienne	Le fromage fabriqué
<i>Endothia parasitica</i>	Cheddar Crescenza Duch Gouda Herve Italico Kortowski Robiola Taleggio Tilsit
<i>Mucor miehei</i>	Bel Paese, Camembert Cheddar Crescenza Domiati Edam Emmental Gouda Italiro Kachkaval Saint Paulin Taleggio

	Trapiste Saumure blanche
<i>Mucor pusillus</i>	Cheddar, Wigley Crescenza, Edam Gouda, Grana Italico Kortowski Robiola Taleggio Tilsit

**CONCLUSION**

## Conclusion

La souche mésophile ; telle qu'*Endolhia parasilica*, et les souches thermophiles ; telles que *Mucor michei* et *Mucor pusillus*, ont défié avec succès les coagulants d'origine animale. Grâce à leur faible coût, le vide laissé par les pénuries de présure de veau. [16]

Une ressemblance remarquable dans le comportement de l'extrait coagulant dérivé d'*E.parasitica* et la présure animale ; les deux enzymes sont marqués sensibilité aux variations de température, du pH et aux ions de Calcium [33]. L'enzyme de coagulation produite par *M.miehei* a montré que la capacité de coagulation du lait est proche de celle de la présure animale en termes de variations de pH ; en revanche, cette enzyme est plus sensible aux variations de température et aux ions calcium[27]. L'activité coagulante de l'enzyme produite par *M.pusillus* a montré qu'il a une capacité de coagulation à une température élevée et moins sensible aux concentrations minimales et élevées en ions de calcium, avec une sensibilité nulle en pH acide ; un maximum d'activité coagulante dans ce pH que la présure animale. [2]

Une activité protéolytique faible pour les trois substituts de la présure [23,2 ,29]. Ainsi, la protéase d'*E.parasitica* comporte une activité protéolytique supérieure à celles issues de *Mucor spp.* [35]

D'autres propriétés de ces protéases ont indiquées un comportement différent ; chaque un de ces enzymes a une température de stabilité spécifique, un nombre d'acides aminés différent à l'autre et un poids moléculaire presque similaire pour les deux enzymes dérivés d'*E.parasitica* et *M.miehei*. La protéase d'*E.parasitica* est la seule qui n'a aucun inhibiteur qui peut inhiber son activité coagulante ou protéolytique.

Le remplacement de la présure de veau par des présures fongiques est une solution de remplacement pour la fabrication d'un type de fromage particulier. [16]

La protéase d'*E.parasitica* n'est pas très utilisée, mais Elle a montré de bons résultats pour la production de fromage emmental. Les protéases de *Mucor* se sont avérées excellentes pour la préparation de la plupart des types de fromage après l'ajustement des techniques de production. Puisqu'il semble important de réduire la concentration en enzymes durant le procédé, particulièrement quand les enzymes proviennent de *M.pusillus* ; il est souvent recommandé d'augmenter le contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le lait. [35]



Le mélange d'enzymes microbiennes purifiées pourrait même donner des préparations supérieures à la présure de veau en ce qui concerne la rapidité de la maturation et le développement de la saveur (l'arôme). Les présures fongiques sont un progrès dans la bonne direction.

## Liste des références

- 1- Pougheon, S. (2001). Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et leurs conséquences en technologies laitières. Thèse : VETERINAIRE. Toulouse : l'Université Paul-Sabatier de Toulouse, 102.
- 2- BELHAMICHE, N. (2005). Extraction, purification et caractérisation de la coagulase de *Mucor pusillus*. Thèse : science agronomique. EL-HARRACH : INSTITUT NATIONAL AGRONONIQUE, 70.
- 3- Chemmam, D. A. (2019). Caractérisation physicochimique et Microbiologique du lait cru de mélange en zones de montagne. Memoire : Biologie. GUELMA : UNIVERSITÉ 8 MAI 1945 GUELMA, 79.
- 4- Brulé, G., Lenoir, J., & Remeuf, F. (1997). La micelle de caséine et la coagulation du lait. *Dans le fromage: de la science à d'assurance qualité. ECRA et gillis JC (Ed), lavoisier TES. DOC, Paris, 89.*
- 5- Remeuf, F., Cossin, V., Dervin, C., Lenoir, J., & Tomassone, R. (1991). Relations entre les caractères physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Le Lait, 71(4), 397-421.*
- 6- Saidi, A. et Zennad, T. (2021). Recherche de succédanés d'origine animale ou végétale de la présure. Mémoire : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire. BEJAIA : Université Abderrahmane MIRA –BEJAIA, 61.
- 7- BOULKROUNE, A. et DEBBAH, A. (2019). Valorisation du lactosérum pour la production d'une enzyme coagulante du lait. Mémoire : Bioindustrie, Analyse et Contrôle. Constantine: Université Frère Mentouri Constantine 1, 77.
- 8- Foltmann, B. (1969). Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin). *Biochemical Journal, 115(3), 3P.*
- 9- Berridge, N. J. (1945). The purification and crystallization of rennin. *Biochemical Journal, 39(2), 179.*
- 10- Garg, S. K., & Johri, B. N. (1994). Rennet: current trends and future research. *Food Reviews International, 10(3), 313-355.*
- 11- Huang, W. Y., & Tang, J. (1969). On the specificity of human gastricsin and pepsin. *Journal of Biological Chemistry, 244(5), 1085-1091.*
- 12- Laouet, L., Benalioua, H., Zioune, N., & Idoui, T. (2003). Essais de fabrication du fromage frais type\* demi-sel\* et évaluation de sa qualité physico-chimique et micro-biologique au cours de la conservation. Thèse : Microbiologie. JIJEL : Centre

universitaire de jijel ABDELHAK BEN HAMOUDA institut des sciences de la nature,59.

- 13- Valles, E., Mocquot, G., Forster, L., & Furet, J. P. (1972). Etude sur la technique de préparation de la présure utilisée dans les fabrications traditionnelles des fromages de gruyère de Comté et d'Emmental. *Le Lait*, 52(515-516), 259-282.
- 14- Génin, G. (1968). Les succédanés de la présure. *Le lait*, 48(471-472), 53-59.
- 15- Green, M. L. (1977). Milk coagulants. *Journal of Dairy Research*, 44(1), 159-188.
- 16- Sternberg, M. (1976). Microbial rennets. In *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press. 20, 135-157.
- 17- Whitaker, J. R. (1970). [29] Protease of *Endothia parasitica*. In *Methods in Enzymology*. Academic Press. 19, 436-445.
- 18- Thakur, M. S., Karanth, N. G., & Nand, K. (1990). Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 32(4), 409-413.
- 19- Somkuti, G. A., & Babel, F. J. (1968). Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. *Journal of bacteriology*, 95(4), 1407-1414.
- 20- Alichanidis, E., Anifantakis, E. M., Polychroniadou, A., & Nanou, M. (1984). Suitability of some microbial coagulants for Feta cheese manufacture. *Journal of Dairy Research*, 51(1), 141-147.
- 21- Fernandez-Conradi, P. (2017). Diversité des arbres et résistance des forêts aux invasions biologiques: application au chataignier et son complexe de bioagresseurs exotiques, chancre (*Cryphonectria parasitica*) et cynips (*Dryocosmus Kuriphilus*). Thèse : Ecologie Fonctionnelle, Evolutive et des Communautés. BORDEAUX : L'université de Bordeaux,261.
- 22- Barr, M. E. (1978). The Diaporthales in North America with emphasis on *Gnomonia* and its segregates. *Mycologia memoir*, 7, 1-232.
- 23- Sardinias, J. L. (1968). Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. *Applied Microbiology*, 16(2), 248-255.
- 24- European Union funding. EPPO Global Database [en ligne]. (page consultée le 22/02/2022).  
<https://gd.eppo.int/taxon/ENDOPA>
- 25- Alais, C., & Novak, G. (1968). Étude d'un enzyme coagulant microbien dérivé de *Endothia parasitica*. I.-Propriétés biochimiques de l'enzyme coagulant Pfizer et propriétés rhéologiques des caillés formés dans le lait. *Le lait*, 48(477), 393-418.

- 26- Hagemeyer, K., Fawwal, I., & Whitaker, J. R. (1968). Purification of protease from the fungus *Endothia parasitica*. *Journal of Dairy Science*, 51(12), 1916-1922.
- 27- Alais, C., & Lagrange, A. (1972). Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*. I. Activité coagulante et activité protéolytique. *Le lait*, 52(517), 407-427.
- 28- Silveira, G. G. D., Oliveira, G. M. D., Ribeiro, E. J., Monti, R., & Contiero, J. (2005). Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 931-937.
- 29- Sternberg, M. Z. (1971). Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *Journal of Dairy Science*, 54(2), 159-167.
- 30- Zak, J. C., & Wildman, H. G. (2004). Fungi in stressful environments. In *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods* (pp. 303-315). Elsevier Inc..
- 31- NOUANI, A. (2009). Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait. Thèse : science agronomique. EL-HARRACH : Institut National Agronomique,140.
- 32- Fernández,L. H. M., Fraile, E. R., & Cascone, O. (1998). Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. *Journal of Biotechnology*, 62(2), 83-93.
- 33- Houins, G., Deroanne, C., & Coppens, R. (1973). Etude comparative de l'activité coagulante et du pouvoir protéolytique de la présure animale et de trois de ses succédanés. *Le lait*, 53(529-530), 610-624.
- 34- De Lima, C. J. B., Cortezi, M., Lovaglio, R. B., Ribeiro, E. J., Contiero, J., & De Araújo, E. H. (2008). Production of rennet in submerged fermentation with the filamentous fungus *Mucor miehei* NRRL 3420. *World Appl Sci J*, 4, 578-585.
- 35- Meunier, N. (1999). Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales.memoire : Biochimie. Québec : Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique,184.
- 36- Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P., Brule G(2008). Les produits laitiers- 2ème édition. TEC&DOC. Paris: EMD S.A.S.176p
- 37- Troch, T., Lefébure, É., Baeten, V., Colinet, F., Gengler, N., & Sindic, M. (2017). Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 21.
- 38- Desmazeaud M., (1997). Les enzymes utilisées en industrie laitières PP582-602 in *Laits et produits laitier scoord*. Luquet F.M. Tech et Doc Lavoisier.

- 39- Seker, S., Beyenal, H., & Tanyolac, A. (1999). Modeling milk clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*. *Journal of food science*, 64(3), 525-529.
- 40- Frau-Doktor. Identification des plantes [en ligne]. (page consultée le 05/02/2022). <https://planteset.com/cucurbita-pepo-ssp-pepo/>
- 41- Alimentarium. From the garden to curdling milk [en ligne]. (page consultée le 05/02/2022). <https://www.alimentarium.org/en/magazine/garden-curdling-milk>
- 42- Alfred Pasioka. SCIENCEphotoLIBRARY [en ligne]. (page consultée le 05/02/2022). <https://www.sciencephoto.com/media/206303/view/rod-shaped-bacillus-bacteria>
- 43- [Marta González García](#). Asturnatura.com [en ligne]. (page consultée le 05/02/2022). <https://www.asturnatura.com/fotografia/setas-y-hongos/cryphonectria-parasitica-1/30363.html>
- 44- Nasraoui, B. (2006). Les champignons parasites des plantes cultivées. *Collection M/Science de l'ingénieur. Centre de publication universitaire Tunisie*, 456.
- 45- Tom Volk. Tom Volk's Fungi Department of Biology [en ligne]. (page consultée le 07/02/2022). [http://botit.botany.wisc.edu/toms\\_fungi/](http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/)
- 46- Institute of Medicine (US), & Olsen, L. (2011). *Fungal diseases: an emerging threat to human, animal, and plant health: workshop summary*. National Academies Press.
- 47- EDUCALINGO. *Mucor* [en ligne]. (page consultée le 07/02/2022). <https://educalingo.com/fr/dic-en/mucor>
- 48- Nowak.Schimmemelpilz-Untersuchung[en ligne]. (page consultée le 07/02/2022). <http://www.schimmel-schimmelpilze.de/mucor-pusillus.html>
- 49- Lenoir J., Remeuf, et Schneid N. (1985) : Le lait de fromagerie. In : Eck A. et Gillis J.C.Le fromage de la science à l'assurance- qualité. 3e ed. Tec. Et Doc. Lavoisier
- 50- Smeets S.R., (1995) Enzyme coagulation. Dairy technology paper, 5 (2): 14-16.
- 51- Noor-Develiet P.E., Gist-Brocades N.N. et Delft N.C.D., (1983) . Les enzymes alimentaires : utilisation et innocuité. Microbiol. Alim. Nut, 1:1-5.
- 52- Khan M.R., Blain J.A. et Patterson J.D.E., (1983). Partial purification of *Mucor pusillus* intracellular proteases. Appl. Envir. Microbiol., 45 (1): 94-96.

**Année universitaire:** 2021-2022

**Présenté par:** MEDJOU DJ Hamza Alla-Eddine  
TAYEB Mohamed Chaker  
BENDA OUD Yasser

## **Les extraits coagulants dérivés des succédanés d'origine fongique de la présure animale**

### **Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en mycologie et biotechnologie fongique**

L'évolution de la technologie laitière et la forte demande de la présure traditionnelle pour la fabrication fromagère dans les marchés, ont engendrées une pénurie mondiale de cette enzyme. Des succédanés d'origine animale, végétale et microbienne (provenant de bactéries ou champignons) ont été étudiés pour remplacer cette dernière. Trois extraits coagulants dérivés des souches fongiques d'*Endothia parasitica*, *Mucor Miehei* et *Mucor pusillus* ont fait l'intérêt de cette recherche. Les souches fongiques productrices de ces enzymes ont été définies, classifiées et caractérisées. Ainsi, des méthodes d'obtention, de purification et de récupération de ces protéases, ont été analysées dont le but de connaître de plus en plus ces propriétés en les comparant avec celle de la présure animale. D'après les résultats des recherches analysés dans ce travail, les coagulases dérivés du genre *Mucor* ont été révélés d'être les meilleurs pour les utiliser dans la fabrication fromagère.

**Mots-clés:** présure, coagulation du lait, présure animale, succédané de présure, *Endothia parasitica*, *Mucor Miehei*, *Mucor pusillus*,

#### **Laboratoires de recherche:**

(Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Encadreur:** Mme MEZIANI Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 1:** Mme. ABDELAZIZ Wided (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 2:** Mme.BENKAHOUL Malika (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).