

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE – EL- HARRACH

THESE

**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES
AGRONOMIQUES**

Option : Sciences et qualité des aliments

Par

KAHLOUCHE Amal

THEME

Caractérisation biochimique comparée des protéases coagulant le lait d'origine animale (chevreau), végétale (Tourteau de tournesol) et microbienne (*Bacillus mojavensis* P47M). Effets catalytiques sur les caséines des laits bovin et caprin

Soutenue publiquement le **04/07/2018** devant le jury composé de :

Président :	BELLAL Mohand Mouloud	Professeur	ENSA El Harrach
Directeur de thèse :	NOUANI Abdelouahab	Professeur	Univ. Boumerdes
Co Directeur de thèse	BENCHABANE Ahmed	Professeur	ENSA El Harrach
Examineurs :	TRIKI Saddek	Professeur	ENSA El Harrach
	BENAKMOUM Amar	MCA	Univ. Boumerdes
Invité :	BENAMARA Salem	Professeur	Univ. Boumerdes

Année universitaire :2017/2018

REMERCIEMENTS

Un travail de thèse est rarement celui d'une seule personne. Aussi, je souhaite témoigner à tous les étudiants qui ont contribué à la rédaction de cette thèse et qui ont apporté leur contribution à la réalisation de ce travail. Ma profonde reconnaissance en particulier à *Mlles BETATTACHE Fatiha, TOUZENE Fatma Zohra, CHEBBI Fella, FLIH Nadia, GOUIGAH Amel et Dr TALANTIKITE Souad.*

A mon directeur de thèse, le *Professeur NOUANI Abdelouahab*, j'adresse ma reconnaissance pour ces conseils scientifiques judicieux, sa disponibilité exceptionnelle, et la liberté d'action qu'il m'a laissée tout au long de ce projet.

A mon Co directeur de thèse, le *Professeur BENCHABANE Ahmed* pour avoir accepté de co diriger ce travail

Je tiens en particulier à remercier :

- *Monsieur le professeur BELLAL Mohand Mouloud* pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury d'examen de cette thèse.

Que les professeurs TRIKI Sadek de l'ENSA, BENAMARA et BENAKMOUM trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de participer au jugement de ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier les *Professeurs Slimane BELBRAOUEZ et TOUABIA Mohamed* de l'Université de Moncton (Canada) pour m'avoir aidé à réaliser certains essais au niveau de leur laboratoires respectifs

J'exprime ma reconnaissance au professeurs *AMIALI Malek, Darwin Lyew et Yvan Gariepy* pour leur aide et leur contribution qui m'ont permis d'effectuer un stage à l'université de McGill (Canada).

Je tiens à adresser un remerciement à Mme *BENMALEK Nabila*, enseignant chercheur au niveau du département de *Génie des procédés (UMBB)* pour son aide et ses conseils

Mes remerciements vont également au personnel du *département de Technologie alimentaire de l'ENSA et de l'université de Boumerdes* pour leur aimable collaboration.

Dédicaces

Cette thèse est dédiée à ma très chère Maman, décédée lors de ma deuxième année de doctorat, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. Sans elle, je n'aurais certainement pas fait d'études longues. Cette thèse représente donc l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'elle m'a prodigués tout au long de ma vie et particulièrement ma scolarité. Qu'elle en soit vivement remerciée par cette trop modeste dédicace ;

A mon cher Papa, Aucune dédicace, aussi expressive qu'elle soit, ne saurait exprimer la profondeur de mes sentiments et l'estime que j'ai pour toi ;

A mes chers frères et sœurs, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse ;

A Mon cher époux ; Je ne pourrais d'aucune manière exprimer ma profonde affection et mon immense gratitude pour tous les sacrifices consentis, ton aide et ta générosité extrêmes ont été pour moi une source de courage, de confiance et de patience ;

A mes belles sœurs et beaux frères qui m'ont beaucoup soutenu et m'ont toujours aidé et encouragé et étaient toujours à mes côtés

A Mes adorables neveux et nièces :Samy,wassim,Yara et Rabéa ;

A Ma belle famille grand et petit ;

A Toutes mes amies.

LISTE DES ABREVIATIONS

µg : Microgramme.

µl : Microlitre.

α – La :α- lactalbumine .

β- Lg :β - Lactoglobuline.

AC : Activité Coagulante.

AP : Activité Protéolytique.

BSA :Sérum albumine bovine

CaCl₂ : Chlorure de calcium

CCD : Central design composite

cm : centimètre.

CM-50 : Carboxyméthyl-50

CN-α₁:Caséine alpha s₁.

CN- β :Caséine Beta.

CN- κ:Caséine kappa.

DEAE-cellulose: Diéthylaminoéthyl-cellulose.

D.O :Densité Optique.

EEB :Extrait enzymatique brut.

EEB V :Extrait enzymatique brut végétal.

EEB B :Extrait enzymatique bacterien

EEB A :Extrait enzymatique brut animal

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique.

EST :Extrait sec total.

F :Force coagulante.

g:gramme.

h:heure.

kDa :Kilo dalton.

Kg : Kilogramme.

L : Litre.

Log PM : Logarithme du Poids Moléculaire

M: Molarité.

MCA :Milk clotting activity

Met : Méthionine.

ml : millilitre.

mM : milli Molarité.

mn : minute.

MS : Matière Sèche.

N : Normalité.

Na Cl : chlorure de sodium.

Na₂HPO₄ :le phosphate de sodium

nm: nanomètre.

NPN : protéine non azotée

P.C.C. : Phosphate de calcium colloïdal

pH : potentiel d'Hydrogène.

Phe : Phénylalanine.

pHi : pH isoélectrique.

PM : Poids Moléculaire.

R²:Coefficient de corrélation.

SmF :Submerged state fermentation

SSF :Solid-State Fermentation

TCA : Tri Chloroacetic Acid (Acide Trichloracétique).

tr : tour.

TGEA : glucose tryptonée Alimentaire de levure

UP : Unité de Présure

UV : Ultra violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	5
Figure 2 : Graine de tournesol et coupe transversale du péricarpe (pc), du tégument séminal (t), de l'endosperme (es) et des cotylédons.....	8
Figure 3 : Coupe d'une crypte gastrique avec agrandissement de la partie de la glande sécrétrice d'enzyme et d'acide.....	11
Figure 4 : Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine	20
Figure 5 : Mécanisme réactionnel des peptidases à cystéine	21
Figure 6 : Mécanisme réactionnel des métalloprotéases	22
Figure 7 : Mécanisme réactionnel des protéases acides).....	23
Figure 8 : Distribution des ventes des enzymes.....	23
Figure 9 : Profil d'élution sur Sephadex G-75 de l'extrait enzymatique brut de Tournesol (<i>Helianthus annuus</i>) après précipitation au sulfate d'ammonium à 20% et 65% de saturation, dialysé et concentré.....	42
Figure 10 : Profil d'élution sur CM-50 de l'extrait enzymatique brut de Tournesol (<i>Helianthus annuus</i>) après précipitation au sulfate d'ammonium à 20% et 65% de saturation, dialysé et concentré. (Colonne analytique <i>Spectra Chrom</i> (1 × 30 cm). Tampon d'élution(tampon acétate (0,1M ; pH 5,2).....	43
Figure 11 : Profil d'élution sur gel de filtration Sephadex G-75 de fraction active de chromatographie d'échange cations.	45
Figure 12 : L'effet des inhibiteurs par métaux sur l'activité de l'extrait enzymatique brut de tournesol.....	46
Figure 13 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante.....	46
Figure 14 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante.....	48
Figure 15 : Effet de la en CaCl ₂ du lait sur l'activité coagulante.....	49
Figure 16 : Effet de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante.....	50
Figure 17 : Stabilité thermique de la présure et de l'extrait de Tournesol.....	51
Figure 18 : Stabilité au pH de l'extrait de Tournesol et de la présure.....	52
Figure 19 : Profil d'élution sur Sephadex G-75 des protéine standards	53
Figure 20 : Profil électrophorétique de la fraction active de l'enzyme végétale récupérée d'une gel filtration	54
Figure 21 : La séquence en acides aminés de la protéase NT3 extraite de tourteau de	

tournesol.....	55
Figure 22: Arbre phylogénétique dérivé de l'analyse de la séquence d'ADNr 16S de la souche P47M et des séquences apparentées obtenues à partir de NCBI. Barre d'échelle. 0,001 substitutions par position nucléotidique. Le numéro d'accession de GenBank pour chaque souche suit le nom de l'espèce.....	70
Figure 23 (A): profile d'élution sur Sephadex G-75 de l'extrait enzymatique de <i>Bacillus mojavensis</i> partiellement purifié par précipitation au sulfate d'ammonium a 40-80% de saturation (QTY 5 (1,5 × 30 cm), tampon d'élution Acétate (0,01 M, pH 5,5), débit : 36 ml/h, fraction de 1,2 ml).	72
Figure 23(B) : Profil Électrophorographie SDS-PAGE de l'enzyme purifiée de <i>Bacillus mojavensis</i> P47M	73
Figure 24: fromage frais et aspect de l'activité coagulante du lait dans les tubes a essai produits par <i>Bacillus mojavensis</i> P47M (A) et présure commerciale <i>Aspergillus niger var. Awamori</i> (B).....	74
Figure 25(A-B): Effet de pH et de la température sur l'activité coagulante.....	75
Figure 25-C: Effet de CaCl ₂ sur l'activité coagulante.....	76
Figure 25-D: Effet de concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante.....	77
Figure 26 : Surface de réponse montrant l'effet de la température et de l'agitation sur la valeur de l'indice AC/AP pour le son comme milieu de base.....	83
Figure 27 : Surface de réponse montrant l'effet de la température et de l'agitation sur la valeur de l'indice AC/AP pour le tourteau de tournesol comme milieu de base.....	84
Figure 28: Surface de réponse montrant l'effet de la température et de l'agitation sur la valeur du paramètre AC pour le son de blé et le tourteau de tournesol et sur le paramètre AP	90
Figure 29 : Résultats d'optimisation pour l'indice AC/AP quelque soit le milieu le milieu de base.....	85
Figure 30: Influence de température de lait sur l'activité coagulante.....	103
Figure 31: Influence de PH de lait sur l'activité coagulante.....	104
Figure 32: Influence de CaCl ₂ sur l'activité coagulante.....	105
Figure 33 : Influence de concentration d'enzyme sur l'activité coagulante.....	106
Figure 34 : Cinétique de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique de chevreau et de présure commerciale.....	107
Figure 35 : Profil d'élution sur Sephadex G-75 de l'extrait enzymatique brut issue de caillette de chevreau, (colonne 1x30cm, tampon d'élution phosphate 0,1M pH 5,5, débit 0,3ml/min,	

fraction 3 ml).....	108
Figure 36 : Profil d'élution sur Sephadex G-75 des protéines standards. (Colonne <i>SpectraChrom</i> (1 x 30 cm), tampon d'élution Acétate (0,01 M; pH 5,5), débit : 0,66ml /mn, Fraction de 2,5ml). Proteines standards :1- γ -Globuline (158 k Da), 2- BSA (67 k Da), 3 – Trypsine (23,8 k Da).....	109
Figure 37 : Profil électrophorétique de la fraction active de l'enzyme du chevreau résupérée d'une gel filtration.....	110
Figure 38 : Profil HPLC en phase inverse des caséines standards (2mg/ml), e : Caséine de lait bovin, f : caséine ce lait caprin, g : Caséine commerciale, a : κ caséine, b : β caséine, c : α s caséine, d : mélange des caséines α s, β et κ	122
Figure 39 : Profil HPLC en phase inverse de l'hydrolyse des caséines du lait bovin et du lait caprin par les protéases purifiées obtenues a partir des caillètes de jeune caprin, de tourteau de tournesol et par fermentation de <i>Bacillus mojavensis</i> P47M après 40mn d'incubation a 37°C.....	124
Figure 40 : Profil HPLC en phase inverse de l'hydrolyse des κ et α caséines standards par les protéases purifiées obtenues par fermentation de <i>Bacillus mojavensis</i> P47M et a partir des caillètes de jeune caprin et de tourteau de tournesol apres 40mn d'incubation a 37°C.....	125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés analytiques de quelques enzymes protéolytiques.....	6
Tableau 2 : Composition des graines de tournesol (% MS).....	9
Tableau3 : Principales caractéristiques des enzymes coagulantes des présures animales.....	10
Tableau 4: Quelques substrats utilisés pour la production des protéases	19
Tableau 5 : Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de Tournesol.....	40
Tableau 6 : Concentration en protéines totales de l'extrait coagulant brut de Tournesol et rendement d'extraction.....	41
Tableau 7 : Bilan de purification de l'extrait coagulant de <i>Tournesol</i> par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G75 (après précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium).....	43
Tableau 8: Rendement et facteur de purification (CN50).....	44
Tableau 9 : L'effet des inhibiteurs chimiques sur l'activité l'extrait enzymatique brut de tournesol.....	45
Tableau 10: Détermination du poids moléculaire de la fraction active (Protéase de Tournesol).....	53
Tableau 11: La séquence en acides aminés de la protéase coagulante purifiée de Tourteau de tournesol et pourcentage de résidus d'acides aminés et le poids moléculaire.....	55
Tableau 12: Étapes de purification de l'enzyme coagulant le lait de <i>B. mojavensis</i> P47M...	71
Tableau 13: Effet des inhibiteurs sur l'activité de la coagulation du lait de l'extrait enzymatique de <i>B. mojavensis</i> P47M	74
Tableau 14: Niveau des variables utilisés dans le CCD.....	79
Tableau 15 : Matrice des Niveaux codés (pour 28 expériences dupliquées).....	81
Tableau 16 : Matrice du plan composite centré (56 expériences).....	82
Tableau 17 : Analyse de la variance	83
Tableau 18: Caractéristiques physiques et biochimiques de l'extrait enzymatique clarifié de chevreau.....	98
Tableau 19 : Caractéristiques des extraits ultrafiltres.....	100
Tableau 20: Indice de purification des extraits enzymatiques ultrafiltrés du chevreau.....	100
Tableau 21: Effet la Pepstatine A sur l'activité de la coagulation du lait (MCA) de l'extrait enzymatique du chevreau.....	101
Tableau 22: détermination du poids moléculaire de la fraction active du chevreau.....	109

SOMMAIRE

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Enzymes protéolytiques	4
1.1. Définition.....	4
1.2. Classification	4
1.3. Propriétés physico-chimiques des protéases.....	5
2. Les protéases d'origine végétale	6
2.1. Généralité.....	6
2.2. Tourteaux de tournesol.....	7
3. Les protéases d'origine animale	9
1.3-Généralités	9
3.2. Localisation tissulaire des pro-enzymes	10
3.3. Les facteurs affectant la sécrétion des enzymes animales	11
3.4. Mécanismes d'activation des pro-enzymes	12
3.5. La chymosine	13
3.5.1. Les facteurs physico-chimiques affectant l'activité de la chymosine caprine	14
3.5.2. Action de la chymosine sur la caséine k	16
3.6. La pepsine.....	16
3.7. Généralités sur les présures issues de jeunes ruminants	17
4. Les protéases d'origine microbienne	18
4.1. Production d'une enzyme industrielle d'origine microbienne.....	18
4.2. Intérêt industriel	19
4.3. Les protéases de <i>Bacillus</i>	20
5. Mécanisme d'action des protéases	20
5.1. Sérilylprotéases	20
5.2. Cystéylprotéases	21
5.3. Métalloprotéases	21
5.4. Aspartylprotéases	22
6. Application technologique des protéases	23
Références Bibliographiques	25

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Propriétés biochimiques d'une protéase végétale extraite du tourteau dégraissé de tournesol	32
1. Résumé.....	32
2. Introduction	32
3. Matériel et méthodes	33
3.1. Matériels végétal	33
3.1.1. Matière première employée	33

3.1.2. Obtention et prétraitement des graines de Tournesol	33
3.1.3. Méthode d'extraction du système enzymatique	33
3.2. Analyse de l'extrait enzymatique brut	34
3.2.1. Mesure de l'activité coagulante	34
3.2.2. Dosage des protéines	34
3.2.3. Mesure de l'activité protéolytique	34
3.2.4. Détermination de l'indice AC/AP	35
3.3. Méthode de purification	35
3.3.1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (Pré purification)	35
3.3.2. Purification analytique	36
• Purification de l'extrait coagulant par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75	36
• Purification de l'extrait coagulant par chromatographie d'échange de cations sur CM-50	36
• Purification de l'extrait coagulant par chromatographie d'échange ionique suivie par gel filtration	36
3.4. Etudes des inhibiteurs de l'extrait enzymatique brut	36
3.4.1. Inhibiteurs chimiques	36
3.4.2. Inhibiteurs par quelques métaux	37
3.5. Caractérisations de l'extrait coagulant brut	37
3.5.1. Influence de la température du lait	37
3.5.2. Influence de pH du lait	38
3.5.3. Influence de la concentration optimale de CaCl ₂	38
3.5.4. Influence de concentration en enzyme	38
3.6. Stabilité de l'enzyme	38
3.6.1. Stabilité au pH	38
3.6.2. Stabilité à la température	38
3.7. Détermination du poids moléculaire	38
3.8. Electrophorèse PAGE-SDS	39
3.9. Détermination de la séquence des acides aminés de la protéase NT3 de tourteaux de tournesol	39
4. Résultats et discussion	39
4.1. Résultat de l'extraction	39
4.1.1. Activité coagulante de l'extrait brut	39
4.1.2. Concentration en protéines totales et rendement d'extraction	40
4.1.3. Activité protéolytique de l'extrait brut	41
4.1.4. Indice AC/AP	42
4.2. Résultats de Purification	41
4.2.1. Purification partielle de l'extrait enzymatique brut (Précipitation au sulfate d'ammonium et dialysé)	42
4.2.2. Purification analytique de l'EEB prépurifié par chromatographie d'exclusion moléculaire	42
4.2.3. Purification de l'extrait coagulant par chromatographie d'échange de cations sur CM-50	43
4.2.4. Purification de la fraction active par gel filtration sur G75	44
4.3. Etudes des inhibiteurs de l'extrait enzymatique brut NT3	45
4.3.1. Inhibiteurs chimiques	45
4.3.2. Inhibiteurs métalliques	46

4.4. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut	46
4.4.1. Influence de la température du lait	46
4.4.2. Influence du pH du lait	48
4.4.3. Influence de la concentration en CaCl ₂ du lait	49
4.4.4. Influence de la concentration en extrait enzymatique	50
4.5. Etude de la stabilité	51
4.5.1. Stabilité à la température	51
4.5.2. Stabilité au pH	52
4.6. Détermination du poids moléculaire	53
4.7. Electrophorèse SDS-PAGE	54
4.8. La séquence des acides aminés de la protéase NT3 de tourteaux de tournesol	55

Conclusion	58
-------------------------	-----------

Références bibliographiques	59
------------------------------------------	-----------

Chapitre II : Propriétés biochimiques d'une protéase produite par la Souche *Bacillus mojavensis* P47M isolée du sol d'une laiterie

1. Résumé	63
2. Introduction	63
3. Matériel et méthodes	64
3.1. Microorganisme, conditions de culture et méthode d'isolement	64
3.2. Identification de la souche P47M	65
3.3. Production de protéase par fermentation en fiole, composition du milieu de culture et inoculum	66
3.4. Optimisation des paramètres de fermentation de <i>Bacillus mojavensis</i> Procédures analytiques	66
3.5. Procédures analytiques	66
3.5.1. Activité de coagulante	66
3.5.2. Activité protéolytique	67
3.5.3. Dosage des protéines	67
3.6. Purification partielle par fractionnement à (NH ₄) ₂ SO ₄ l'extrait enzymatique brut	67
3.7. Chromatographie d'exclusion moléculaire	67
3.8. Détermination du poids moléculaire	68
3.9. Electrophorèse PAGE-SDS	68
3.10. Effet des inhibiteurs	68
3.11. Propriétés biochimiques de l'enzyme purifiée	68
3.11.1. pH et température optimales	68
3.11.2. Effet de la concentration de CaCl ₂ sur la coagulation du lait	68
3.11.3. Effet de la concentration de l'enzyme	69

4. Résultats et discussion	69
-----------------------------------------	-----------

4.1. Identification de la souche	69
4.2. Production d'enzyme coagulant le lait	69
4.3. Purification enzymatique et masse moléculaire	71
4.4. Effet des inhibiteurs	74
4.5. Propriétés de l'enzyme	75
4.5.1. Effets de la température et du pH	75
4.5.2. Effet de la concentration en CaCl ₂ sur l'activité de l'enzyme	75

4.5.3. Effet de la concentration d'enzyme sur la coagulation du lait	76
Conclusion	77
Sous chapitre : Optimisation des paramètres de fermentation par la méthode de surface des réponses	78
1. Introduction	78
2. Méthodologie	78
2.1. Optimisation de la production d'enzyme et conception d'un plan d'expérience.....	78
2.2. Analyse Statistique	80
3. Résultats et discussion	81
Références bibliographiques	88
Chapitre III : Propriétés biochimiques des protéases coagulant le lait d'origine caprine (Chevreau)	92
1. Résumé.....	92
2. Introduction.....	92
3. Matériel et méthodes	93
3.1. Matériel biologique	93
3.1.1. Caillettes caprines	93
3.1.2. Préparation des caillettes	93
3.2. Extraction et clarification des extraits enzymatiques bruts	94
3.3. Prépurification et concentration des extraits enzymatiques par Ultrafiltration	94
3.4. Purification de l'extrait coagulant par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75	95
3.5. Electrophorèse PAGE-SDS	95
3.6. Méthode analytique	96
3.6.1. Dosage des protéines	96
3.6.2. Mesures l'activité coagulante	96
3.6.3. Mesure l'activité protéolytique	96
3.6.4. L'activité spécifique (AS)	97
3.6.5. Purification relative (Facteur de purification)	97
3.6.6. Détermination de l'indice AC/AP	97
3.7. Effet des inhibiteurs	97
3.8. Caractérisations de l'extrait coagulant ultrafiltré	97
3.8.1. Influence du pH ,température,concentration en CaCl ₂ ,concentration en enzyme... ..	97
3.8.2. Activité protéolytique (cinétique)	97
4. Résultats et discussion	98
4.1. Extraction et clarification des extraits enzymatiques	98
4.2. Purification partielle des extraits enzymatiques par ultrafiltration	99
4.3. Indice AC /AP	101
4.4. Effet des inhibiteurs	101
4.5. Caractérisations de l'extrait coagulant ultrafiltré	101
4.5.1. Détermination de la température optimale d'activité	101
4.5.2. Influence de pH du lait	103

4.5.3. Influence de CaCl ₂	104
4.5.4. Influence de la concentration en extrait enzymatique	105
4.6. Cinétique de l'activité protéolytique	106
4.7. Purification de l'extrait enzymatique brut issu de la caillette de chevreau	107
4.8. Détermination du poids moléculaire	108
4.9. Electrophorèse SDS-PAGE	110
Conclusion	111
Références bibliographiques	113
Chapitre IV : Effet catalytique des extraits purifiés sur les caséines des laits bovin et caprin	117
1. Résumé	117
2. Introduction	117
3. Matériel et méthodes	118
3.1. Obtention des extraits purifiés	118
3.2. Préparation des caséines entières des laits bovins et caprins	118
3.3. Effet catalytique des extraits enzymatiques purifiés sur les caséines entières et les standards caseiniques	118
4. Résultats et discussion	120
4.2. Chromatographie des caséines entières et des fractions caseiniques	121
4.3. Suivi d'hydrolyse des caséines entières	123
Conclusion	127
Références bibliographiques	128
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	132

INTRODUCTION

Dans l'industrie fromagère, la présure est le principal agent coagulant de lait, elle est utilisée depuis très longtemps dans la fabrication de fromage.

En 1874, Hansen, un pharmacien danois, commercialise la première présure qui est une préparation coagulante extraite de l'abomasum de veau non sevré et renfermant deux enzymes actives : la chymosine (80%) et la pepsine (20%). Cet extrait est depuis standardisé et utilisé directement par l'industrie laitière.

Actuellement, la présure de veau est la plus largement utilisée en fromagerie (**Mahaut et al, 2000 ; Ramet, 2006**). Toutefois, elle couvre seulement 20 à 30 % de la demande mondiale en coagulants (**Jacob et al, 2011**).

A la lumière du cas particulier de l'Algérie ; L'augmentation de la production fromagère impose une utilisation croissante de la présure traditionnelle ce qui a entraîné l'importation de la quasi totalité de cette dernière ce qui représente un ennui pour l'économie locale d'autant plus que l'Algérie se classe comme le plus gros consommateur de laits et dérivés au Maghreb. et par conséquent l'impossibilité de satisfaire les besoins par le seul traitement des présures, car la production de veaux de lait est fluctuante, ainsi La valorisation des sous produits d'origine animale, végétale et microbienne dans la préparation des enzymes de substitution constitue une autre alternative pouvant susciter un intérêt industriel en fromagerie locale

Dans notre étude on s'efforce d'explorer le mécanisme de production et de caractérisation des enzymes d'intérêt fromager a partir de déchets de produits comestibles sans valeur ajoutée mais non polluant, et dont les caractères intrinsèques seront confrontés a ceux d'une présure industrielle. Les espèces étudiées est un exemple de bioressource qui a servi de base d'exploration des possibilités d'application en fromagerie à savoir l'animal (caquette de chevreau), le végétal (tourteau de tournesol) et le microbien (*Bacillus mojavensis*)

Une bonne connaissance des extraits de coagulation étudiés demeure l'objectif principal ou nous avons effectué des essais plus poussés des caractéristiques biochimiques de la protéase :

Purification, Inhibition, caractérisation de l'activité et séquençage en acides aminés et étude de leurs effets catalytiques sur les caséines et fractions caséiniques.

Ces travaux devraient montrer l'intérêt de l'utilisation des trois extraits étudiés comme succédanés de la présure dans la fabrication des fromages et de déterminer les caractéristiques biochimiques des protéases coagulantes.

Dans un premier temps, des rappels bibliographiques généraux présentent les enzymes protéolytiques dans leurs généralités, les protéases de différentes origines, la classification des protéases selon leur mécanisme d'action sur la caséine et les fractions caséiniques.

Un chapitre est consacré à chaque extrait enzymatique étudié ou il est rapporté le résumé des essais, une introduction, matériel et méthodes, résultats et discussion, une conclusion et les références bibliographiques.

Par ailleurs, nous avons consacré un sous-chapitre concernant l'optimisation des paramètres de fermentation de *Bacillus mojavensis* car il est bien connu que la production de protéase extracellulaire par les microorganismes est fortement influencée par des facteurs physiques comme le pH, la température, l'agitation en fermentation submergée ou liquide, le volume de l'inoculum et autres paramètres (Nehete et al, 1985). De plus, Les méthodes de modélisation mathématique trouvent une large application dans l'industrie biotechnologique. Ces méthodes donnent la possibilité d'optimiser les conditions de culture et de fermentation des bactéries en vue d'une production optimale généralement d'enzymes d'intérêt industriel. Aussi, la méthodologie de la surface de réponse (RSM), qui comprend la conception factorielle et l'analyse de régression, permet d'évaluer les facteurs effectifs et de concevoir des modèles afin d'étudier l'interaction et sélectionner les conditions optimales des variables pour une réponse souhaitable (Haaland, 1989, De Coninck 2000). Cette méthode a été appliquée avec succès dans de nombreux domaines de la biotechnologie, comme la production d'enzymes (Lee et al, 2003)

De plus, un dernier chapitre qui entame l'effet catalytique de nos protéases extraites sur les caséines du lait bovin et caprin en évaluant leurs actions d'hydrolyse sur les liaisons caséiniques en se référant toujours à la présure commerciale.

Et enfin, une conclusion générale récapitule l'ensemble du travail précédent avec les résultats aboutis suivis des perspectives souhaitées.

Références bibliographiques

- **De Coninck J., Bouquelet S., Dumortier V., Duyme F. and Denantes VI. (2000).** Industrial media and fermentation process for improved growth and protease production by *Tetrahymena thermophila* BIII, *J Ind Microbiol Biotech.*;24:285–90

- Haaland PD. (1989).** Statistical problem solving. In: Haaland PD, *editor. Experimental design in biotechnology.* New York: Marcel Dekker, Inc.,p. 1–18.

- **Jacob M., Jaros D. and Roham H. (2011).** Recent advances in milk clotting enzymes. *Int. J. Dairy Tech.*, 64, 14-33.

- **Lee H., Song M. and Hwang S. (2003).** Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem*;38:1685–93.

- **Mahaut M., Jeantet R., Schuck P. and al. (2000).** Les produits industriels laitiers, *Éditions Tec & Doc*, Paris.41p.

- **Nehete PN., Shah VD. and Kothari RM. (1985).** Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the state of culture *Biotech. Lett* 7:413-418.

- **Ramet J.P. (2006).** Les agents de la transformation du lait ; in « *le fromage* » éd *Eck et Gillis. Tech. et doc.*, 3^{ème} éd., Lavoisier, Paris.

Partie bibliographique

1. Enzymes protéolytiques

1.1. 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**). Ces enzymes sont produites aussi bien par les animaux que les végétaux et les microorganismes ; leur synthèse s'effectue extracellulairement comme intracellulairement (**Palma et al. 2002**).

1.2. Classification

La classification des protéases 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**).

- **Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique**

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisés en deux classes ; les endopeptidases qui agissent à l'intérieur de la chaîne peptidique et les exopeptidases agissent seulement sur les liens peptidiques près des extrémités de la chaîne peptidique (**Penasse, 1974**). Ces dernières sont subdivisées en deux sous-classes : les aminopeptidases et les carboxypeptidases. La plupart des enzymes utilisées industriellement sont des endopeptidases.

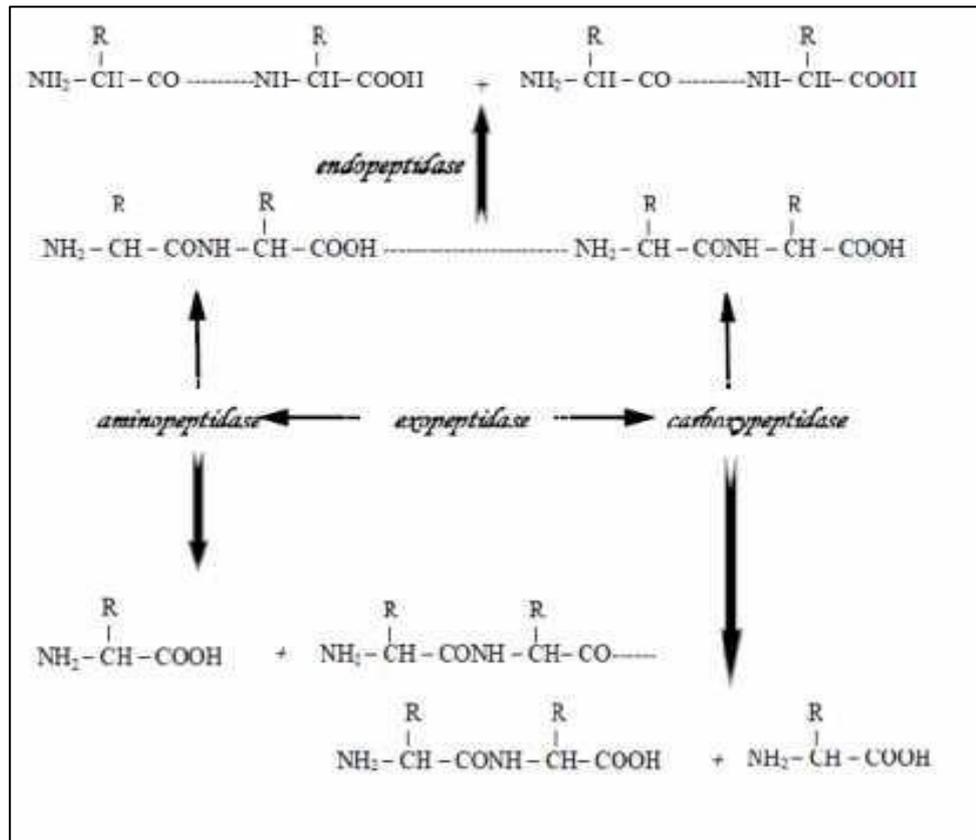


Figure 1 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).

- **Selon le pH d'activité**

Les enzymes protéolytiques sont classées selon la gamme de pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides, neutres et alcalines.

- **Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif**

En se basant sur les séquences primaires et la spécificité des acides aminés de leur site actif, et selon la classification de référence, disponible dans la base de données électronique MEROPS, il existe sept familles des endopeptidases : Aspartyl, Cystéyl, Métallo, Séryl, Glutamyl, Asparagyl, et Thréonylprotéases.

1.3. Propriétés physico-chimiques des protéases

L'activité protéolytique dépend de la structure de la molécule enzymatique (monomérique ou oligomérique), de la nature du site actif (sérylprotéase, aspartylprotéases, cystéylprotéase et métalloprotéases) et des conditions de la réaction (pH, température et effecteurs) (Penasse, 1974) (tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés analytiques de quelques enzymes protéolytiques (Deymié et al., 1981).

Classe	Exemple	Origine	pH Optimal	T ° Optimale	Inhibiteur
Serylprotéases	Chymotrypsine	Pancréas	8.0 - 8.5	35°C	nombreux aa PPN ou OP α TSF inhibiteurs naturels PMSF nombreux aa
	trypsine	//	7.5 – 8.0	45°C	
	subtilisine	<i>B. subtilis</i>	7.4	60°C	
		<i>B. licheniformis</i>	10	56°C	
		<i>B. amyloliquefaciens</i>	10	60°C	
	P. extracellulaire	<i>Fusarium culmorum</i>	8.3 – 9.6	50°C	
	Endopeptidase	<i>Trichoderma viride</i>	7.0 – 8.0	40°C	
Cystéylprotéase	papaïne	<i>Carica papaya</i>	8.0 – 8.5	35°C	Hg EDTA oxydants agents chélateurs // et EDTA
	ficine	<i>Ficus glabrata</i>	4.0 – 6.0	35°C	
	protéase neutre	<i>Geotrichum candidum</i>	7.0	42°C	
	aminipeptidase	<i>Lb. helveticus</i>	7.0	37°C	
	streptopain	<i>Streptococcus sp</i>	7.2		
	cathepsineK	cellules animales	6.5	37°C	
Aspartylprotéases	pepsine A	estomac	1.5 – 2.5	40°C	alcools pepstatine des époxydes (EPNP et le DAN)
	chymosine	estomac de veau	4.0 – 4.5	40 – 42°C	
	cathepsine D	cellules animales	2.5 – 3.5	37°C	
	P. extracellulaire	<i>Trichoderma harzianum</i>	4.5	40°C	
	//	<i>Aspergillus niger</i>	4.6	50°C	
Métalloprotéases	carboxypeptidaseA	intestin grêle des vertébrés	7.5	37°C	certains aa certains aa agents chélateurs
	carboxypeptidaseB	//	8.0	37°C	
	P.bactérienne	<i>Micrococcus caseolyticus</i>	7.4	50°C	
	Collagénase	cellules animales	7.4	38°C	

2. Les protéases d'origine végétale

2.1. Généralités

Les protéases ont été identifiées et étudiées chez plusieurs familles végétales, particulièrement chez les *Asteraceae*, les *Caricaceae*, les *Moraceae*, *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae* et *Euphorbiaceae* (Domsalla et Melzig, 2008).

Le groupe des protéases le plus répandu se retrouve dans les fruits des broméliacées (Pardo et al., 2000). C'est le cas de la bromélaïne et de l'ananaïne (Lee et al., 1997) extraites de tige de l'ananas (*Ananas comosus*), de la ficine issue du figuier (*Ficus glabrata*) (Alais, 1975 ; Scriban, 1993 ; Moodie, 2001) et de la

papaine (*Caricapapaya*) (Mitchel et al., 1970 ; Dubey et al., 2007). Ces plantes sont riches en cystéylprotéases.

2.2. Tourteaux de tournesol

La culture des oléagineux est essentiellement destinée à la production d'huile et de tourteaux mais très peu travaux se sont intéressés aux tourteaux qui sont sources abondantes de protéine utilisées principalement en alimentation animale. En vue de l'augmentation de la demande mondiale en protéines végétales après la crise de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et l'interdiction en 1996 d'utiliser des protéines d'origine animales pour l'élevage, il est nécessaire de trouver de nouvelles sources de protéines facilement exploitables et les travaux de Park et al., (2001) et Egito et al., (2007), ont mis évidence une protéase coagulant le lait dans les graines de tournesol .

L'amande des graines protéagineuses est très riche en protéines, selon Cabine et al., (1999) le taux de protéines de l'amande des gaines de tournesol varie entre 43 et 50% de matière sèche.

Le tournesol est une plante oléagineuse annuelle appartient aux dicotylédones, famille des Astéracées dont le nom scientifique est *Helianthus annuus* L. L'appellation tournesol provient de sa tendance à se tourner vers le soleil pendant la journée, alors que son nom scientifique fait référence à la forme caractéristique de son inflorescence composée, ou capitule : en grec *Helios* signifie soleil et *anthos* signifie fleur.

L'akène de tournesol, ce que nous nommons communément "graine", est généralement constitué d'une amande et d'une coque ou d'un péricarpe (Figure 2). La dimension de cette graine varie selon variété, de 7 à 25 mm de longueur et de 4 à 13 mm de largeur. Leur poids est compris entre 30 et 80 g pour 1000 graines.

Un akène entier contient :

- Une coque qui constitue 18 à 35% du poids total de la graine. Campbell.,(1983) rapporte que la proportion de coque dans la graine de tournesol riche en huile ($\pm 23\%$) est plus faible que dans la graine pauvre en huile ($\pm 43\%$). D'après Canibe et al., (1999), la proportion est d'environ 230 g de coque par kg de graine.

- Une amande, qui est formée par une membrane diaphane, un endosperme et un embryon comprenant deux cotylédons, dont les cellules sont remplies des globules d'huile et de corpuscules protéiques.

La graine de tournesol est ainsi essentiellement constituée de lipides, de protéines, d'une fraction ligno-cellulosique et de polysaccharides non cellulose (Canibe *et al.*, 1999) (Tableau 2).

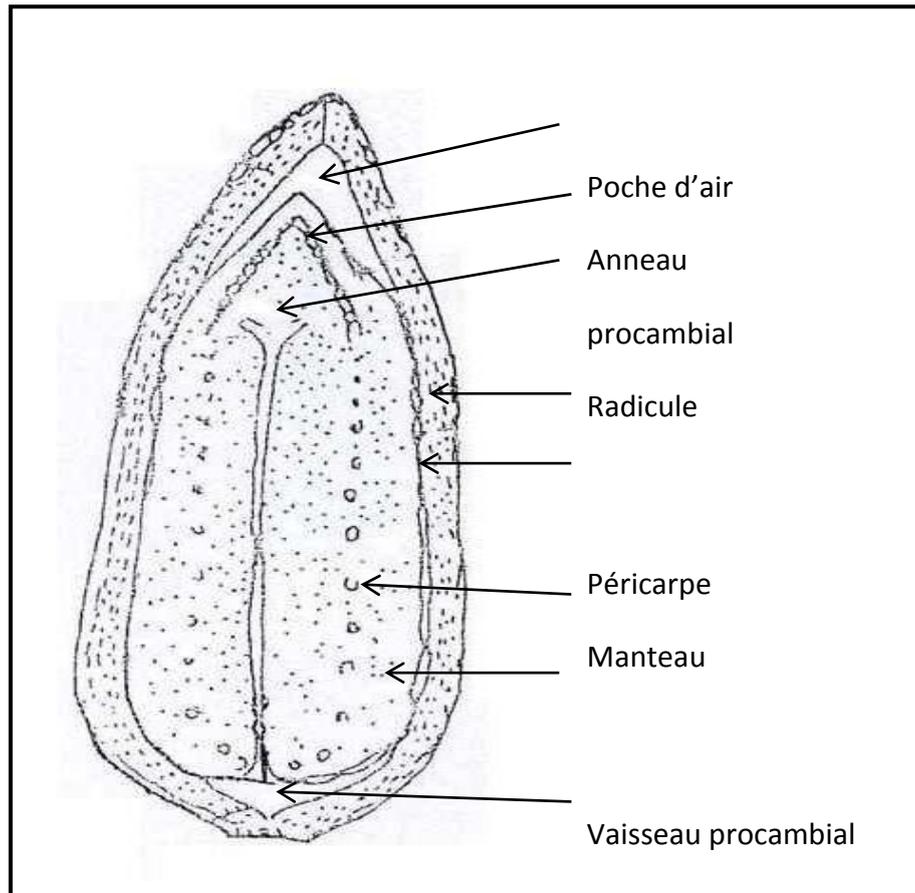


Figure 2 : Graine de tournesol et coupe transversale du péricarpe (pc), du tégument séminal (t), de l'endosperme (es) et des cotylédons (Karleskind, 1996).

Tableau 2: Composition des graines de tournesol (% MS) (Cabine *et al.*, 1999)

Composés	Graines entières		Amandes		Coques		
Lipides	40-60	44-52	62.9-69.0	50-70	3.1-7.7	2.5-4.5	3-3.5
Protéines	13.5-25.5	15-19	43.4-50.4*	20-35	/	4.5-6.0	3-3.5
Ligno-cellulose	38-55	13-22	1.4-2.5	3-5	41.8-53.3	50-60	60-76.5
Polysaccharide non cellulosique	/	/	3.9-5.1	/	28.4-36.4	/	13-20

% MS : valeurs rapportées à la teneur en matière sèche de la graine.

*valeur rapportée à l'amande déshuilée partiellement.

Des recherches récentes montrent que les protéines de tournesol ont peu de composés antinutritionnels et d'excellentes propriétés physico-chimiques qui les rendraient intéressantes autant en alimentation humaine qu'en alimentation animale. Leurs principaux inconvénients sont ; la présence de composés phénoliques qui leur confère une coloration brune et une sensibilité à la dénaturation qui impliquerait une modification des procédés de triturations si l'on veut exploiter des tourteaux de bonne qualité. Le tourteau de tournesol déshuilé contient d'avantage de protéines et par conséquent la possibilité de récupérer une masse non négligeable d'enzyme coagulant le lait.

3. Les protéases d'origine animale

1.3-Généralités

Les enzymes coagulantes d'origine animale ou les protéases aspartiques gastriques sont des enzymes protéolytiques retrouvées chez pratiquement tous les organismes vivants. Au niveau du tube digestif, elles sont responsables de la digestion des protéines alimentaires par hydrolyse des liaisons

peptidiques. Elles sont sécrétées sous formes inactives appelées «pro-enzymes » ou «zymogènes » (Sidikou et al, 2005).

Une fois dans la lumière du tube digestif, elles deviennent actives sous l'action de l'acide gastrique ; l'enzyme active agit ainsi directement sur les liaisons peptidiques des protéines. Les essais de classification des protéases ont abouti à définir cinq grandes catégories à savoir : les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les métallo-protéases, les protéases à thréonine et les protéases à acide aspartique. Le pepsinogène et la pro-chymosine appartiennent à ce dernier groupe qui comprend beaucoup d'autres protéases aspartiques.

Tableau 3.Principales caractéristiques des enzymes coagulantes des présures animales

Origine	Coagulant	Espèces	MM kDa	pHi	Nombre d'isoforme	pH optimum	T° optimale	Glycosylation	phosphorylation	Références
animale	Chymosine	Bovine	36	4.5-5.0	A, B et C	5.5-6.0	--	Non glycosylée	--	(BAUDYS et al,1988 ;FO LTMANN,1993 ; MARTIN et CORRE,1984)
		Caprine	36	4.6 - 5.1	2 à 3	5.5-6.0	65 à pH5.5 46 à pH 6.6	Non glycosylée	--	(KUMAR et al, 2006 ;MOSCHHOPOULO U et al,2011).
	Pepsine	Bovine	33	3.0	4	1.5-2.2	40	--	Oui	(MARTIN et al, 1982 ; MARTIN,1984 ; RAMPILLI et al , 2006)
		Caprine	39-41	3.0	A : 3 C : 2	--	--	Non glycosylée	Probable	(SUZUKI et al,1995 ;MOSCHHOPOULO U et al,2006)

Légende (--): Non rapportée.

La chymosine (EC 3.4.23.4), la pepsine A (EC 3.4.23.1) et gastriscine (ou la pepsine B ou la pepsine C) (EC 3.4.23.3) sont des protéases aspartiques gastriques sécrétées dans la muqueuse de la caillette des jeunes ruminants sous forme de zymogènes et leur action est de coaguler et digérer le lait. (Moschopoulou, 2011).

3.2. Localisation tissulaire des pro-enzymes :

La sécrétion du pepsinogène et de la pro-chymosine commence très tôt au cours de la vie fœtale même si elle semble très faible à ce stade de développement. Après la naissance et

avant la différenciation et la maturation des cellules gastriques, les mêmes cellules produisent simultanément le pepsinogène et la pro-chymosine. Après leur différenciation, la totalité des cellules principales et une partie des cellules muqueuses représentent la principale source de pepsinogène. La prochymosine, quant à elle, n'est produite que par les cellules muqueuses et une partie des cellules principales situées dans la zone supérieure de la glande gastrique. (Sidikou,2005).

On sait que les protéases produites par les cellules principales sont converties en enzymes actives. Ce processus est sous contrôle de la production d'acide par les cellules pariétales, les deux types cellulaires étant stimulés par la gastrine. Selon Sidikou (2005) les faibles concentrations de pepsinogène chez les fœtus résultent de l'absence de la sécrétion de gastrine. En effet, cette hormone n'est détectable qu'au 93^e jour de la vie fœtale chez le porc et entre 75 et 80 jours chez le mouton

Ensuite, les concentrations plasmatiques en gastrine augmentent progressivement jusqu'à la naissance et atteignent leur pic à 3 et 2 semaines d'âge respectivement chez le porcelet et l'agneau. Cette libération de gastrine est elle-même sous contrôle vagal.

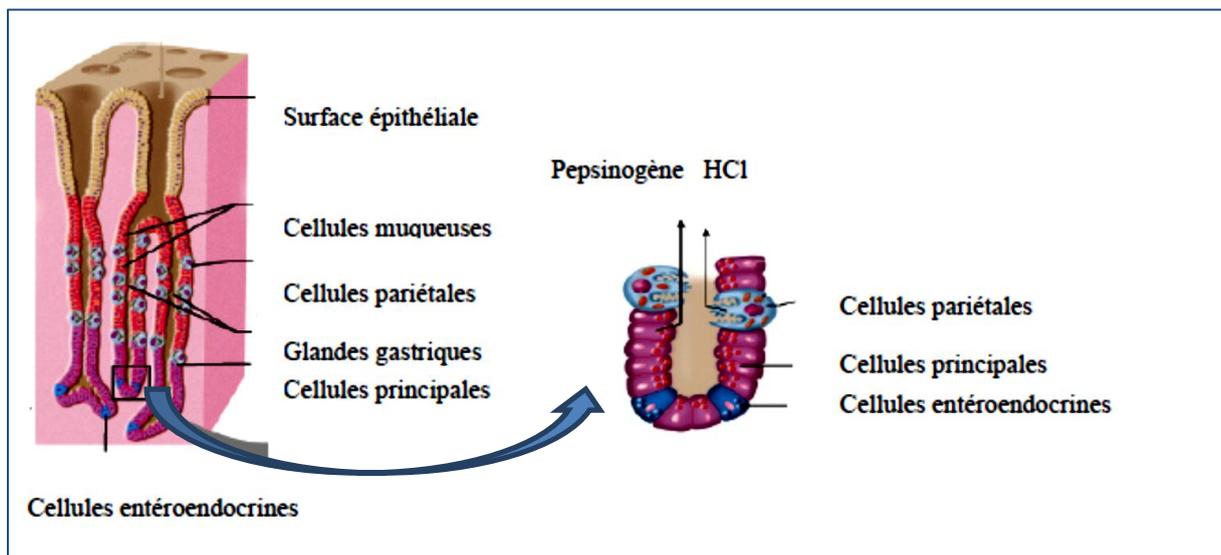


Figure 3 : Coupe d'une crypte gastrique avec agrandissement de la partie de la glande sécrétrice d'enzyme et d'acide (adaptée d'après Elaine N. Marieb).

3.3. Les facteurs affectant la sécrétion des enzymes animales

Selon Andren (1992), la prochymosine est produite tôt pendant la vie prénatale dès la 10^e semaine de gestation. Après la naissance, sa production est sensiblement liée à la consommation de lait (Andren *et al.*, 1986). Les pepsinogènes A et C commencent à être

produits plus tard pendant la vie prénatale (20^e semaine), et sont exprimés à de faibles niveaux aussi longtemps que le veau reçoit du lait.

De nombreuses études décrivent l'influence de l'âge, du régime alimentaire et du sevrage sur les sécrétions enzymatiques abomasales du veau (**Garnot *et al*, 1980 ; Garnot *et al*, 1977 ; Guilloteau *et al*, 1984 ; Guilloteau *et al*, 1985 ; Andren et Bjorck, 1986**).

Chez le veau nouveau-né, il a été rapporté la présence dans la caillette de concentrations de chymosine plus élevées que celles de la pepsine (**Garnot *et al*, 1977 ; Guilloteau *et al*, 1984**). Il a été également rapporté que la consommation de nourriture solide fait diminuer la sécrétion de prochymosine et augmenter celle du pepsinogène. **Guilloteau et collaborateurs (1983)** ont rapporté que, chez l'agneau, les quantités d'enzymes gastriques par rapport au poids vif augmentent légèrement entre la naissance et 2 jours d'âge tandis que celles de la prochymosine diminuent.

D'après les études de **Suzuki et collaborateurs (1999)**, la proportion de pepsinogène par gramme de muqueuse gastrique est de 0,54 mg chez l'espèce caprine. Alors qu'elle se situe entre 1,8 et 4,3 mg chez les bovins (**Andren et al, 1992**), elle est de 3,4 mg chez l'homme (**Kageyama et Takahashi, 1980**) et de 8,6 mg chez le lapin (**Kageyama et Takahashi, 1984**). Bien que les ruminants soient des herbivores typiques, leur estomac vrai (abomasum) est aussi adapté pour la digestion d'aliments à haute valeur protéique (présence de microflore).

3.4. Mécanismes d'activation des pro-enzymes

En 1972, **Al- janabi et collaborateurs** démontraient que le pepsinogène et la prochymosine étaient capables de s'activer par deux mécanismes différents : un mécanisme « intramoléculaire » et un mécanisme « autocatalytique ». Le mode intramoléculaire, où la molécule se digère elle-même, est accentué par la présence d'un pH acide ($\text{pH} < 3$) et d'une concentration protéique inférieure à 1 mg/ml (**Hartsuck *et al*, 1977**), alors que le mode autocatalytique où les molécules enzymatiques se digèrent les unes les autres, et devient dominant à de plus fortes concentrations en protéine.

La partie active des zymogènes se compose de deux domaines reliés par un axe de symétrie, à la jonction entre les deux bras se trouvent les deux résidus d'acide aspartique formant ainsi le site catalytique de l'enzyme. (**Sidikou, 2005**).

Ce site est occupé par le pro-segment bloquant ainsi l'entrée du substrat et maintenant le zymogène sous sa forme inactive à pH neutre. La conversion du pepsinogène en pepsine se produit spontanément en solution acide et comporte une ou plusieurs réactions. **(Sidikou et al, 2005)**. Les enzymes inactives prochymosine, le pepsinogène et progastriscine sont les précurseurs de la chymosine, la pepsine et gastriscine respectivement

L'activation du pepsinogène C caprin tourne autour d'un pH 3 qui est deux fois plus élevée que ceux des pepsines A, la différence entre les activités de l'hémoglobine digestive autour du pH 3 entre la pepsine A et C est observé chez un certain nombre de mammifères. **(Suzuki et al, 1999)**.

3.5. La chymosine

La Chymosine est une protéase acide produite dans le quatrième estomac des ruminants nourris au lait y compris la chèvre et la brebis sous la forme d'un précurseur inactif prochymosine. Ce dernier est utilisé pour la préparation de fromage par le clivage de la liaison peptidique entre phénylalanine et méthionine(105-106) dans la chaîne de la caséine k **(Kumar et al, 2006)**.

La sécrétion de la chymosine est maximale pendant les premiers jours après la naissance, la consommation de nourriture solide fait diminuer la sécrétion de la prochymosine qui est remplacé par la pepsine, la chymosine et la pepsine ont un double rôle dans la fabrication du fromage Ils convertissent le lait en caillé en quelques minutes sous des conditions spécifiques (activité coagulante du lait) et puis ils contribuent à la protéolyse qui est produite lors de l'affinage du fromage (activité protéolytique). Ainsi, le rapport de la chymosine et la pepsine dans une présure est d'une importance majeure car elle affecte son équipement technologique comme l'activité coagulante et l'activité protéolytique **(IDF, 1997)**.

Les Buffalo, ovins, caprins et lapins sont jugées comme de bonnes sources de présure. Bovin **(Foltmann, 1992, 1993)**, le buffle **(Mohanty et al, 2003)** et l'agneau **(Baudys et al, 1988)** ont été caractérisées largement. Pour la chymosine bovine trois fractions iso-enzymatiques ont été identifiées A, B et C dans le but d'assurer une activité coagulante du lait. **(Foltmann, 1992)**.

La présure de jeunes agneaux nourris exclusivement avec du lait ou avec un mélange de lait et pâturages contiennent plus de 80% de chymosine **(Piredda, Addis, 1998; Bustamante et al, 2000 ; Moschopoulou et al, 2009)**. Le même phénomène a été observé pour les caillettes de jeune ruminants **(Rossano et al, 2003; Zhang et al, 2005)**.

Cependant, il y'a peu d'informations sur la purification et la caractérisation de la chymosine de chevreau (**Amourache, Vijayalakshmi, 1984; Moschopoulou et al, 2006**). Bien que, les produits laitiers comme les fromages produits à partir du lait de chèvre ont de bon goût et de bonne valeur nutritive, il est utile de tester l'utilisation de la chymosine caprine comme substitut de présure appropriée pour la préparation de fromage à partir de lait de chèvre.

Lilla, Caira, Ferranti et Addeo (2001) ont caractérisé les variantes de la chymosine dans la présure par spectrométrie de masse. La chymosine A et B ont chacun été trouvé dans trois différentes formes actives du côté N-terminale, l'une étant plus longue de trois résidus et l'autre étant plus courte de deux résidus que la chymosine identifié auparavant, ce qui indique que au moins dans certaines conditions, le site de clivage entre le partie protéique et la chymosine actif peut varier. En outre, deux dégradation de fragments ont été trouvés dans la présure : une correspond à la dégradation de la chymosine A tandis que l'autre semble nouvelle. Cependant, ni la variante génétique chymosine C ni les formes désamidées de chymosine ont été détectés dans cette dernière étude.

(Kumar et al, 2006) ont isolés et caractérisés la chymosine caprine par différentes méthodes de purification, une réduction significative de la récupération de l'enzyme a été observée de l'étape d'extraction à la clarification, l'activité de la chymosine caprine a été observée en 3 grands pics qui indiquent une possibilité d'hétérogénéité. La quantité de protéine retrouvée par chromatographie gel filtration est de 2.17 mg pour la chymosine de chevreau âgé de 15 jours avec une activité spécifique de 9.67 unité/mg et un rendement de 3.14 %. En effet Castillo et al (2002) ont montré que la coagulation du lait de chèvre est plus rapide par présure de chevreau qu'avec des coagulants microbiens. (R.miehei).

3.5.1. Les facteurs physico-chimiques affectant l'activité de la chymosine caprine :

Afin d'évaluer la pertinence de l'application de la chymosine caprine en industrie fromagère, les préparations enzymatiques ont été testées pour l'activité coagulante du lait à divers facteurs physico-chimique, traitement du substrat a différentes valeurs de températures et de pH.

Le dosage de l'activité coagulante a été effectué par incubation de la préparation enzymatique à différentes températures pendant 15 min en prenant la température maximale pour laquelle le substrat enzymatique présente une activité maximale à 100 %, et l'activité protéolytique est effectuée de la même manière sur le même substrat selon **(Kobayashi, Murakami, 1978)**.

La coagulation du lait par la présure combine une première réaction d'hydrolyse et une suite de réactions d'agrégation des enzymes **(Van hooydonk, Walstra, 1987)**, ce phénomène

dépend de plusieurs facteurs : la température, le pH, la concentration en ion Ca^{2+} et la concentration de l'enzyme.

a. Effet de la température :

La coagulation du lait dépend fortement de la température (**Dybowska, Fujio, 1996**), en effet la vitesse de formation du coagulum augmente progressivement de 20 à 42 C°, mais à des températures plus élevées le processus de coagulation est ralenti (**Dybowska, Fujio, 1996**).

Il a été observé que la température du lait affecte le taux d'agrégation des protéines dans une large mesure et que l'augmentation de la température augmente le taux de raffermissement du gel (**ECK, 1990**).

b. Effet du pH

L'influence du pH sur le temps de coagulation est très forte, la diminution du pH d'un lait de 7 à 5.2 provoque la diminution du temps de coagulation (**Eck, 1990**). Le pH optimum de l'hydrolyse de la caséine k est de 5.1-5.3 (**Hyldig, 1993; Lopez et al, 1998**).

Les effets les plus importants de l'abaissement du pH d'un lait sont : la solubilisation du phosphate calcique micellaire (**Le gra, Brul, 1993**), la diminution de la charge nette de la molécule de caséine et la dissociation des caséines en micelles (**Gastaldi, Pellegrini, et al., 1994**).

Il a été également rapporté que l'abaissement du pH provoque une augmentation du taux de raffermissement du caillé (**Daviau et al, 2000**). Cependant, la coagulation du lait par présure n'est pas très efficace à un pH inférieur à 5 (**Kowalchuk, Olson, 1977**).

c. Effet de la concentration en ion Ca^{2+}

L'addition au lait de chlorure de calcium provoque une diminution du temps de coagulation (**Balcones et al, 1996**) et accroît la fermeté du gel, mais à hautes concentrations de CaCl_2 (≥ 0.3 M) le temps de coagulation peut augmenter (**Patel, Reuter, 1986**). L'addition de CaCl_2 peut aussi réduire le pH du lait, ce qui entraîne une augmentation du taux d'agrégation des protéines (**Gastaldi, Pellegrini et al, 1994 ; Mehaia, Cheryan, 1983**).

d. Effet de la concentration de l'enzyme

Le temps de coagulation diminue lorsque la concentration de l'enzyme augmente en raison d'un niveau plus élevé de la protéolyse de la caséine k (**Lopez, Lomholt, Qvist, 1998**).

Les relations linéaires entre la concentration d'enzyme et la réciproque du temps de coagulation ou entre la réciproque de l'inverse de la racine carrée de la concentration de l'enzyme et du temps de coagulation ont été rapportées par (**Hyslop et al, 1979**). Cependant, le temps de coagulation du lait par des mélanges d'enzymes n'est pas linéaire avec la réciproque de la concentration en enzyme (**Pico et al, 1995**). Une augmentation du raffermissement du gel a été liée à la concentration de l'enzyme (**Zoon, Van vliet, Walstra, 1988**).

3.5.2. Action de la chymosine sur la caséine k

La caséine k est le substrat primaire de la chymosine bovine, qui coupe cette protéine au niveau de la liaison (Phe105-Met106), (**Kumar et al, 2006**) ont constaté que la chymosine caprine purifiée possède une spécificité identique envers cette liaison, en effet le clivage de cette liaison provoque la libération d'un glycopeptide hydrophile qui passe dans le lactosérum, la CN-k devient chargé positivement à pH neutre, et provoque la diminution de la force électrique répulsive entre les autres caséines et les micelles, (**Green, 1975**). L'hydrolyse des autres caséines du lait tel que la Caséine α_{S1} , α_{S2} et lactalbumine par la chymosine a été rapportée avec un niveau plus lent de protéolyse (**Carles, Dumas, 1985; Miranda et al, 1989**).

Dans un premier temps, la stabilité de la micelle est détruite par l'addition de la chymosine. Ceci est suivi par une phase secondaire non enzymatique dans laquelle l'agrégation de la CN-k et d'autres composants de la caséine se produit par l'association avec des ions Ca^{2+} ce qui conduit éventuellement à la formation d'ungel (MERIN et al, 1989). Les phases primaires et secondaires de la coagulation du lait comme l'agrégation des micelles commence avant que le processus enzymatique ne soit terminé. (**Brown, Collinge, 1986; Bringe, Kinsella, 1986**).

3.6. La pepsine

Theodor Schwann est le premier à avoir enquêté sur la composition chimique de la digestion gastrique, il découvrit la pepsine en 1829 ainsi que son action fermentaire. (**Florkin, 1957**). **Schwann** avait dénommé pepsine la protéase qu'il avait obtenue à partir de l'estomac de porc, chez le porc la pepsine A est la protéase gastrique la prédominante, avec la présence d'une

quantité minime de la pepsine B et gastriscine (**Ryle, 1970 ;Tang, 1970 ; Foltmann, 1993 ; Foltmann, 1980**).

L'activité protéolytique de la pepsine est assez voisine de la chymosine mais son action est fortement dépendante du pH du milieu (**Ramet,1979**),elle peut être un outil intéressant pour la cartographie des protéines (**Ahn et al , 2013**), elle est également utilisée pour l'extraction du collagène (**Nalinanon et al ,2007**) et en tant que substitut de présure (**Aehle, 2007**), en effet la présure de bonne qualité nécessite non seulement une activité coagulante élevée, mais aussi un ratio élevé de la chymosine et pepsine (**De koning, 1992**).

Les pepsines caprines sont au nombre de deux (A et C), elles sont actifs à de faibles valeurs de pH de façon similaire à celles des autres sources animales, le pH optimal étant d'environ 2.0 pour la pepsine A et 3.0 pour la pepsine C. Le niveau de pepsinogène chez la chèvre étant le plus bas de tous les estomacs mammifères examiné à ce jour est peut être dû à la double fonction de la caillette, étant donné que le ruminant synthétise, en plus du pepsinogène, une grande quantité de lysozyme pour digérer les microorganismes soulevée dans le rumen. (**Dobson et al ,1983**).

La pepsine caprine a été séparé et isolé par (**Zhang, Chen, Yang ,2005**), ces auteurs ont pu montrés l'effet de l'âge et l'alimentation sur les extraits enzymatiques sur l'activité de la chymosine et la pepsine des caillettes de chevreaux et fournir une base théorique sur l'utilisation de la présure de jeune chevreaux. Les résultats ont montrés que l'activité de la pepsine a tendance à augmenter avec l'âge des animaux, l'activité de la pepsine du groupe des animaux sevrés arrive en premier, le groupe des animaux à allaitement aléatoire en deuxième et le groupe des animaux allaitant en dernier.

3.6. Généralités sur les présures issues de jeunes ruminants

Le pH d'un extrait de présure dépend de la nature et des conditions de stockage des caillettes utilisées, le pH est au allors tours de 5.5 comme le cas de la présure liquide commercial de veau. La couleur de la présure des jeunes ruminants est en fonction principalement de l'alimentation de l'animal par conséquent elle varie de blanchâtre, transparente à jaunâtre ou vert, les présures fabriqués à partir d'animaux nourris au lait possèdent une couleur blanchâtre tandis que la présure provenant d'animaux nourris avec de l'herbe à la couleur verte (**Piredda, Addis, 1998 ; Aloï, Calandrelli, 1999 ; Moscholpoulou et al, 2009**). La viscosité de la présure liquide dépend du procédé de préparation, ainsi les présures liquides sont

généralement visqueuse (**Foltmann, 1993**), pour le cas de notre procédé la présure obtenue est clair après clarification.

Les présures de chevreaux ou d'agneaux sont utilisés pour produire des fromages durs dans certaines parties de l'Italie, la présure est produite sous forme de pâte qui est essentiel pour le développement de la saveur de fromage (**Irigoyen et al , 2002**) et pour conférer une forte saveur au fromage (**Bustamante et al 2000; Bustamante et al, 2003**), la présure de chevreau contient diverses lipases qui libèrent des acides gras libres pendant l'affinage du fromage, ces acides influencent directement ou indirectement le goût et l'arôme du fromage (**Bustamante et al 2003 ; Addis et al , 2005**). Il a été également rapporté que la présure hydrolyse complètement les caséines d'un lait provenant de la même espèce ainsi le degré de protéolyse est plus élevée dans un camembert caprin fait avec de la présure caprine qu'un fromage fait avec de la présure bovine (**O'sullivan et al, 2005**).

4. Protéase d'origine microbienne

4.1. Production d'une enzyme industrielle d'origine microbienne

Dès que le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les micro-organismes, la production industrielle d'enzymes s'est orientée vers les processus fermentaires.

Les principaux avantages des enzymes de fermentation par rapport aux enzymes d'extraction sont les suivants :

- Une production indépendante des contraintes saisonnière et géographiques.
- Une possibilité d'utilisation de matière première bon marché.
- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de fermentation (**Bouix et Leveau 1993**)

Tableau 4: Quelques substrats utilisés pour la production des protéases

Substrat	Microorganisme	Enzyme	Références
Son de blé + déchets d'huile de noix de coco	<i>A. oryzae</i> NRRL 2217	Protéase neutre	(Sumantha et al., 2006)
Son de riz	<i>A. niger</i> MTCC 281	Protéase neutre	(Paranthaman et al., 2009)
Son de blé+saccharose	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protéase alcaline «Clarizyme»	(Xiaoling et al.,2011)
Son de blé + épiluchures de lentille	<i>Bacillus</i> sp.	Protéase alcaline	(Uyar et Baysal, 2004)
Son de riz + son de blé	<i>A. oryzae</i> Ozykat-1	Protéase alcaline	(Chutmanop et al., 2008)
Son de blé + farine de déchets de poissons	<i>Streptomyces</i> sp. CN902	Protéase alcaline	(Lazim et al., 2009)
Marc de café	<i>A. oryzae</i> CFR305	Protéase alcaline	(Murthy et Naidu, 2010)
Déchets de pomme de terre douce	<i>A. niger</i>	Protéase acide	(Pandey et al., 1999)
Son de blé	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protéase acide	(Zhongyang et al 2012)

Le groupe I : ce groupe est constitué des bacilles à Gram positif, présentant une spore centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde, ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé en 2 sous-groupes : le groupe IA constitué des bacilles d'un diamètre supérieur à 1 µm et contenant des inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*) ; et le groupe IB rassemblant des bacilles d'un diamètre inférieur à 1 µm et dépourvus d'inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (*Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*...).

Le groupe II : ce groupe est constitué des espèces à Gram variable, présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante (*Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus* ...).

Le groupe III : ce groupe est caractérisé par des bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou sub-terminale (*Bacillus globisporus*, *Bacillus insolitus*, ...).

4.2. Intérêt industriel

Le développement considérable qu'a connu le genre *Bacillus* dans le domaine de la production d'enzymes industrielles revient aux caractéristiques intéressantes que présente ce groupe. D'une part, ces micro-organismes se cultivent facilement et d'autres parts ils excrètent à l'intérieur des cellules une quantité importante de leurs protéines enzymatiques.

Il présente des enzymes exocellulaires qui appartiennent à la famille des hydrolases. Cette famille a connu le plus large développement pour les applications industrielles (amylases, protéases) (**Schiff, 1992**).

4.3. Les protéases de *Bacillus*

Les protéases de *Bacillus* sont des enzymes sécrétées dans le milieu extra-cellulaire. Parfois leurs productions sont réprimées par l'adjonction en milieu de culture d'un hydrolysats de protéines au de mélange d'acides aminés (**Arnaud et Guiraud, 1993**).

Elles sont parmi les enzymes les plus anciennement connues et sécrétées par la plupart des espèces de *Bacillus* telles que : *Bacillus mégatérium* et *Bacillus subtilis* (**Sastry et Mathur, 1979**)

5. Mécanisme d'action des protéases

5.1. Sérylprotéases

Le polypeptide s'insère dans la protéase à sérine de telle manière que le groupement carbonyle soit proche de la sérine. Le groupement OH de la sérine attaque le groupement carbonyle et l'azote de l'histidine accepte le OH de la sérine. Une association enzyme-substrat intermédiaire tétraédrique se forme. Puis, l'enzyme est acylée et le premier produit d'hydrolyse est libéré. Dans une réaction finale l'enzyme est déacylée et l'extrémité C- terminale est libérée (**Lopez, 2008**).

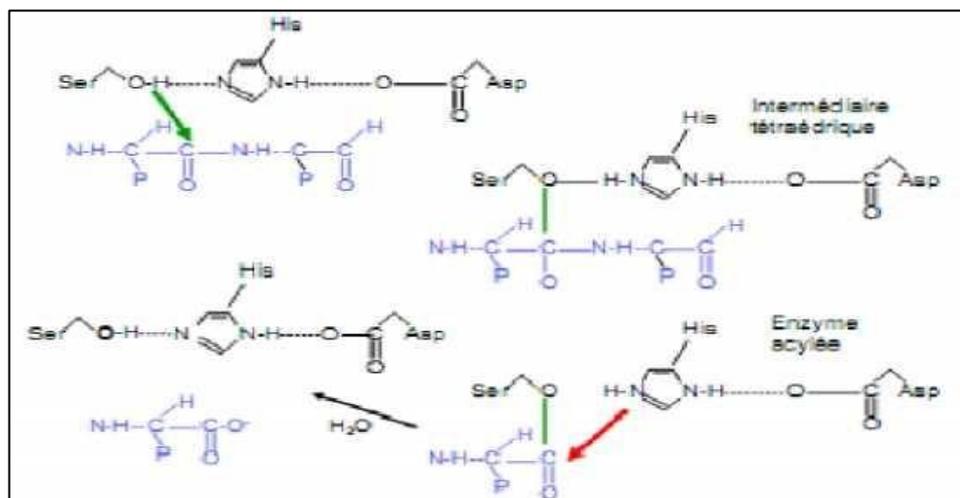


Figure 4: Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine (**Lopez, 2008**).

5.2. Cystéylprotéases

Le premier pas du mécanisme catalytique des cystéylprotéases est la déprotonation d'un groupement thiol dans le site actif de l'enzyme, réalisé par un acide aminé adjacent possédant une chaîne latérale basique (souvent c'est une histidine). Le deuxième pas consiste en une attaque nucléophile du soufre anionique de la cystéine sur le groupe carbonyle du substrat. Dans cette étape, un fragment du substrat est libéré (figure 5). L'histidine dans la protéase est restaurée sous sa forme deprotonisée et un intermédiaire thioesther lie l'extrémité carboxy-terminale du substrat à la cystéine. La liaison thioesther est hydrolysée pour générer un acide carboxy-terminal et l'enzyme est restaurée (**Lopez, 2008**).

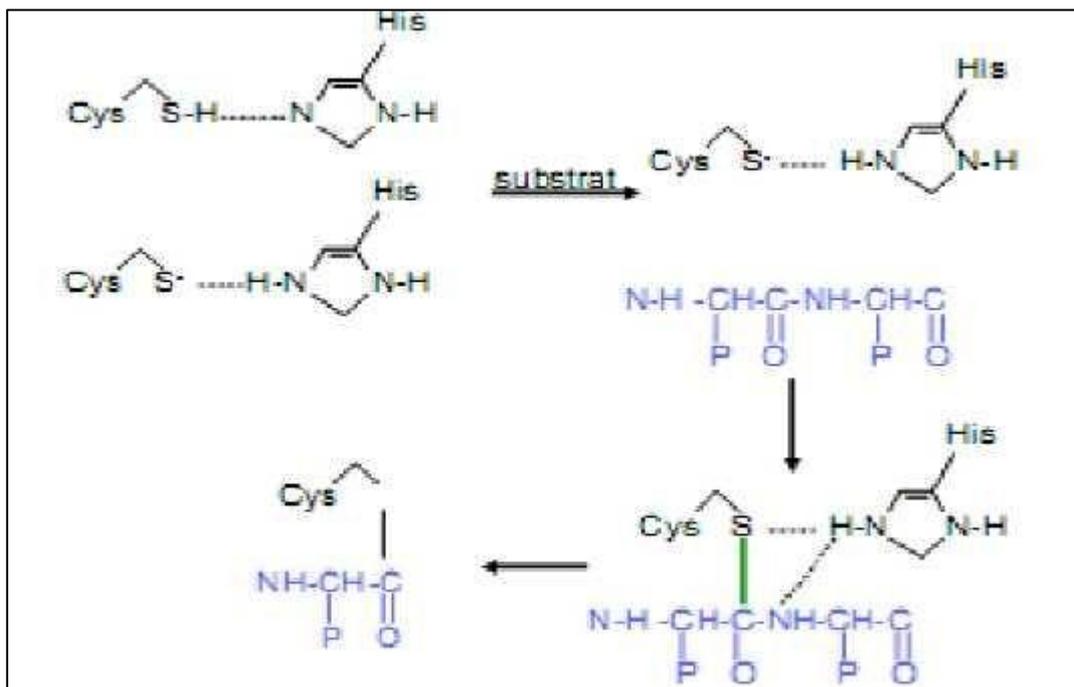


Figure 5: Mécanisme réactionnel des peptidases à cystéine (**Lopez, 2008**).

5.3. Métalloprotéases

Le mécanisme d'action des métalloprotéases se fait en trois étapes :

- L'histidine est rendu plus basique grâce à l'acide aspartique (protéase à sérine)
- L'histidine Active une molécule d'eau. La molécule d'eau attaque la liaison peptidique.

- Le zinc stabilise l'état intermédiaire SP³ et négatif (stabilisation de l'oxyanion). La partie C terminale se dissocie et le proton de l'histidine est transféré vers l'azote de la liaison peptidique.

-L'azote N-terminale est basique, le groupe carboxylique C-terminale est acide. Comme la réaction est rapide, il y a échange de protons entre ses deux groupes (**figure 6**).

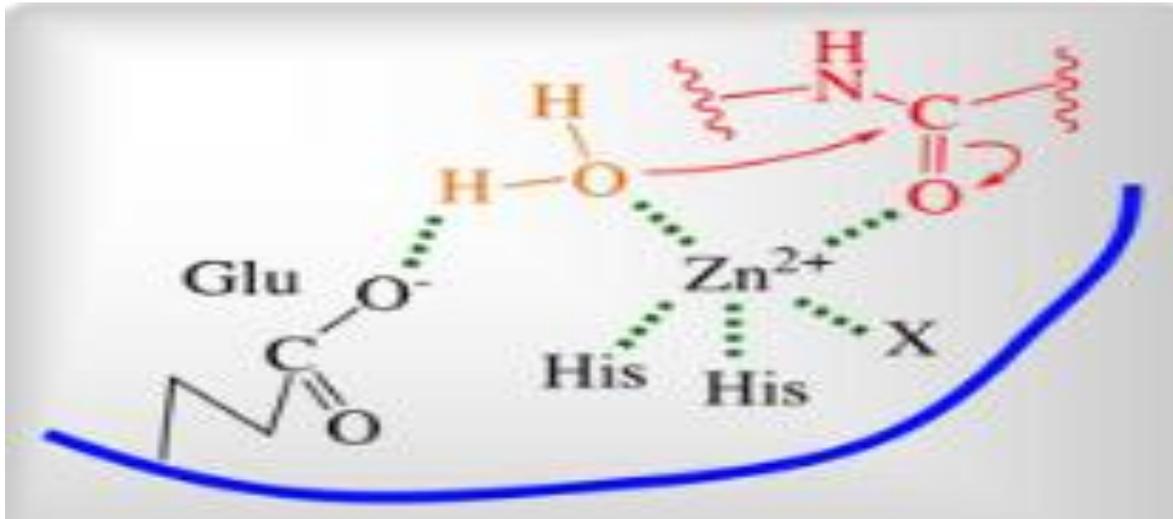


Figure 6: Mécanisme réactionnel des métalloprotéases (**Chabrière 2010**)

5.4. Aspartylprotéases

Le mécanisme d'action des aspartylprotéases est généralement de type acide-base, basé sur la coordination d'une molécule d'eau entre les deux aspartates du site actif (figure 7). Un aspartate active la molécule d'eau par soustraction d'un proton. Cette activation de la molécule d'eau permet une modification du carbone carbonyle du substrat dans la liaison à cliver générant un oxyanion intermédiaire. C'est le réarrangement de cet oxyanion qui permet le clivage (**Lopez, 2008**).



Figure 7: Mécanisme réactionnel des protéases acides (Chabrière 2010)

6. Applications technologiques des protéases

Marché mondial des protéases

De toutes les enzymes industrielles, les protéases sont de loin le groupe le plus important. En effet, les protéases représentent à elles seules entre 60% du total des ventes d'enzymes. La dominance des protéases dans le marché des enzymes industrielles devrait s'accroître. Les ventes industrielles des protéases sont estimées à ~ 3 milliards de dollars US (García-Gómez et al., 2009).

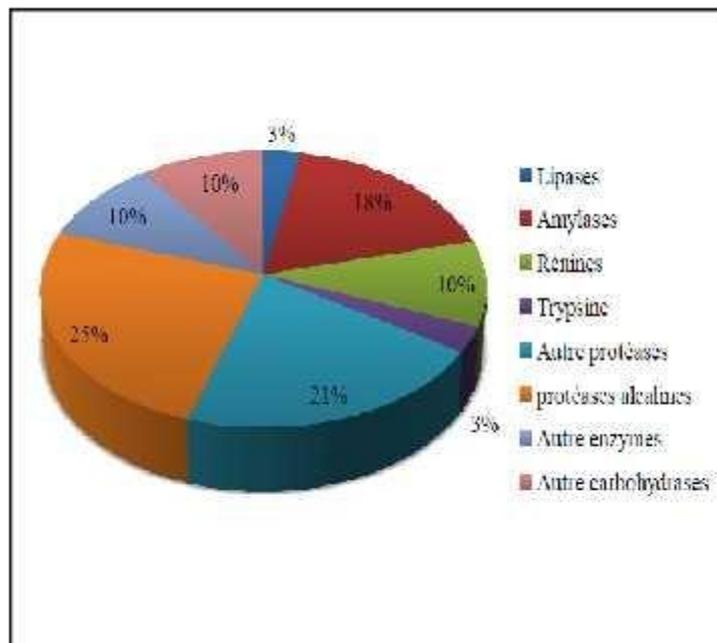


Figure 8: Distribution des ventes des enzymes (Chutmanop et al. 2008)

Les protéases jouent un rôle important dans les détergents (**Gupta et al., 2002**), les industries alimentaires (**Sullivan et Calkins, 2010**) et plus récemment dans le traitement du cuir et comme agents thérapeutiques (**Walsh, 2002; Otsuki et al., 2010**)

Références bibliographiques

- **Addis M. Papoff C.M., Mauriello R., Pirici A., Piredda G. and Chianese L. (2005).** Proteolytic activity of animal rennet on ovine casein. *Milchwissenschaft*, 59, p.p. 414-417.
- Aehle W. (2007).** Enzymes in Industry; Production and Applications; *WILEY-VCH*, Weinheim.
- Ahn S., Milner A.J., Futterer K., Konopka M., Ilias M. and Young T.W.(2013)** The “Open: and “Closed” structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*. *J Mol Biol* ;313:797.
- **Alais C. (1975).** Sciences du lait. Principes et techniques laitières, *Masson*. Paris. P. 108-645
- **Aloi V. and Calandrelli M.(1999).** Il caglio aziendale toh chi si rivede ; *Caseus* 6, 52–55.
- **Amourache L. and Vijayalakshmi M.A.(1984).** Affinity chromatography of kid chymosin on histidyl-sepharose, *J. Chromatogr.* 303, 285–290.
- **Andren A. (1992).** Production of prochymosin, pepsinogen and progastricsin and their cellular and intracellular localization in bovine abomasal mucosa. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 54 (Suppl. 210), p.p. 59–64.
- Andren A. and Bjorck L. (1986).** Milk-feeding maintains the prochymosin production in cells of bovine abomasal mucosa. *Acta Physiol. Scand.* 126, p.p. 419–427.
- **Arnaud A. and Guiraud S. P. (1993).** Le métabolisme microbien. IN : *Biotechnologie. Cood. Scriban, R. 4^{eme}èd.* 95.
- **Balcones E., Olano A. and Calvo M.M. (1996).** Factors affecting the rennet clotting properties of ewe’s milk.*J. of Agricult. And Food Chem.*, 44, 1993–1996.
- Barrett A. J. (1994).** Classification of Peptidases, *Methods in Enzymology*, 244, 1–15.
- Baudys M., Erdene T.G. , Kostka V, Pavlik M. and Foltmann B. (1988).** Comparison between prochymosin and pepsinogen from lamb and calf.*Comp, Biochem. Physiol. B* 89, 385–391.
- **Bergere J.L and Lenoir J. (1997).** Les accidents de fromagerie et les défauts des fromages. *In : Eck A, Gillis JC, eds. Le fromage. Troisième édition.* Paris : Tec & Doc-Lavoisier.
- Bouix M. and Leveau J. Y. (1993).** Production d’enzyme d’origine microbienne. IN : *Biotechnologies. Cood. Scriban, R. 4^{eme}èd.* 356-364.
- **Brown R. J. and Collinge S. K. (1986)** .Actual milk coagulation time and inverse of chymosin activity; *J. Dairy Res.* 69, 956-958.

- **Bustamante M., Chavarri F., Santisteban A., Ceballos G., Hernandez I., Miguelez M.J., Aranburu I., Barron L.J.R., Virto M. and De renobales M. (2000).** Coagulating and lipolytic activities of artisanal lamb rennet paste, *J. Dairy Res.* 67, 393–402.

- Bustamante M.A., Virto M., Chaivarri F., Barron L.J.R., Aranburu M., Vicente M.S., Peñerez-Elortondo F.J., Albisu M. and De Renobales M. (2003).** Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and flavour; *Int. Dairy J.* 13, 391–399.

- **Cabine, N., Pedrosa, M.M., Pobredo, L.M. and Knudsen, K.E.B., (1999).**Chemical composition, digestibility and protein quality of 12 sunflower (*Helianthus annuus* L) cultivars, *J.of Sc. of Food and Agricult.*, 79: 1775-1782.

- **Chabriere E. (2010).** Protéases. *Architecture et fonction des macromolécules.*

- Campbell E. J. (1983).** Sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60 (2): 339A

- Carles C. and Dumas B.R. (1985)** .Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide bond of bovine s1 casein.*Febs Lett.* 185, 282-286.

- Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y. and Srinophakun P., (2008).** Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates; *J. of Chem. Tech. and Biotech.*, 83: 1012–1018

- **Daviau C, Famelart M.H, Pierre A, Goude Dranche H and Maubois J.L. (2000).** Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Lait*, 80, 397–415.

- **De Koning P. J., Van den Berg G., Escher J.T.M. and Bovenhuis H. (1992).** Genetic polymorphism of κ -casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. *Nether. Milk and Dairy J.*, vol. 46, p.145-168.

- Deymié B., Multon J.L. and Simon. D. (1981).** Technique d’analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, *APRIA*. Paris. 238-241.

- **Dybowska E. and Fujio Y. (1996).** Effect of temperature and gluconod- lactone (GDL) concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method.*Milchwissenschaft*, 51, 557– 560.

- **Dobson M.J., Mellor J., Roberts N.A., Tuite M.F., Emtage J.S., White S., Lowe P.A., Patel T. And Kingsman A.J., (1983).** Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 24, 1-14.

- Domsalla A. and Melzig M.F. (2008).** Occurrence and properties of proteases in Plant lattices, *Planta Med*, 74:699–711.

- **Dubey V.K., Pande M., Singh B.K. and Jagannadham MV. (2007).** Papain-like proteases: Applications of their inhibitors, *African. J. of Biotech.*, 6:1077- 1086.
- **Eck A. (1990).** Le fromage, Ed .*Tech. et Doc.* Lavoisier (2^{ème} édition).539 p. vie
- **Egito AS., Girardet JM., Laguna LE., Poirson C., Molle D. and Miclo L. (2007).** Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein, *Inter.Dairy J.*, **17**: 816–825.
- Florkin M. (1957).** Discovery of pepsin by Theodor Schwann. *Revue Médicale de Liège*, 12(5), 139–144
- **Foltmann B. (1980).**Essays biochem.17, 52-84.
- Foltmann B. (1992).** Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 52, 65–79.
- Foltmann B. (1993).** General and molecular aspects of rennets. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese Chem., Physics. and Microbio.*, vol. 1. , 2nd ed. Chapman & Hall, London, pp. 37–68.
- Flower D.R. (1996).**The lipocalin protein family: structure and function, *Biochem J* 318:1–14.
- García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O. and Prado-Barragán L.A., (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, **112**: 604–608.
- Garnot P. and Martin, P. (1980).** Présure, composition, activité, son rôle en fromagerie, *Tech. Laitière*, 930, 27-30.
- Garnot P., Toullec R., Thapon J.L., Hoang M. T., Marthieu C.M. and Ribadeau-Dumas B. (1977).** Influence of age, dietary protein and weaning on calf abomasal enzymic section, *J. Dairy Res.*, **44**, 9-23
- **Gastaldi E., Pellegrini O., Lagaude A. and Tarodo De la fuente B.(1994).** Functions of added calcium in acid milk coagulation. *J. of Food Sc.*, **59**, 310–320.
- **Green M.L. and Stackpoole A. (1975).** The preparation and assessment of a suitable *MucorpuccillusLindt* proteinase – swine Pepsin mixture for cheddar cheese – making. *J.of dairy Res.*, vol. p.P. 297 – 312.
- Guilloteau P., Corring T., Garnot P., Martin P., Toullec R. and Durand G. (1983).** Effects of age and weaning on enzyme activities of abomasum and pancreas of the lamb. *J. Dairy Sc.* **66**, 2373–2385.
- Guilloteau P., Corring T., Toullec R. and Robelin J. (1984).** Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf : I. effect of age in the preruminant. *Reprod. Nutr. Dev.*, **24**, 315-325.
- Guilloteau P., Corring T., Toullec R. and Guilhermet R., (1985).** Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf: II. effects of weaning and feeding a liquid supplement to ruminant animals. *Reprod. Nutr.Dev*, **25**, 481-493.

- **Hartsuck, J. A., Marciniszyn, J., Jr., Huang, J. S., and Tang, J. (1977).** In Acid Proteases, Structure, Function, and Biology; *Plenum Press* (Tang, J., editor), pp. 85–102., New York.
- **Hyldig G. (1993).** Rennet coagulation. Effect of technological parameters on the enzymatic reaction and gel formation in milk and UF concentrates, *PhD thesis, Copenhagen: Royal Veterinary and Agricultural University.*
- **Hyslop D.B., Swanson A.M. and Lund D.B. (1979).** *J. Dairy Sci.* ,62, 1227.
- **IDF, (1997).** Calf Rennet and Adult Bovine Rennet: Determination of Chymosin and Bovine Pepsin Contents (Chromatographic Method), *Inter. Dairy Feder., Brussels*, Standard 110B.
- **Irigoyen A., Izco J.M., Ibáñez F.C. and Torre P. (2002)** .Influence of calf of lamb rennet on the physico chemical, proteolytic and sensory characteristics of an ewe's-milk cheese. *Inter. Dairy J.* 12:27–34
- **Kageyama T. (1994).** Asian macaque pepsinogens and pepsins. *J Med Primatol* ;23:375–81.
- **Karleskind A. (1996),** Oils and fats manual Vol. 1, *Lavoisier Tec & Doc*, Paris.
- **Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R. and Bhalla T.C. (2006).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. of Microbio.*, **3(12)**: 661–672.
- **Kobayashi H. and Murakami K. (1978).** Rapid and large scale isolation of chymosin rennin by pepstatin amino hexylagarose, *Agric. And Biol. Chem.* 42, 2227–2231.
- **Kowalchuk A.W and Olson N.F. (1977).** Effects of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet ;*J. of Dairy Sc.*, **60**, 1256–1259.
- **Kuhn N.J, (1983)** .The biosynthesis of lactose. In: TB Mepham (ed) *Biochemistry of Lactation.* Elsevier, Amsterdam.
- **Lee K. L., Albee K. L., Bernasconi R. J. and Edmunds T. (1997).** Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases, *Biochem J.*, **327(1)** : 199–202.
- **Le gra Y. and Brul G. (1993).** Les équilibres minéraux du lait: influence du pH et de la force ionique. *Lait*, **73**, 51–60.
- **Lilla S., Caira S., Ferranti P. and Addeo F. (2001).** Mass spectrometric characterisation of proteins in rennet and in chymosin-based milk-clotting preparations, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15, 1101–1112.
- **Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I. and Limam F. (2009).** Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **36**; 531–537

-**Lopez M.B, Lomholt S.B and Qvist K.B. (1998)** . Rheological properties and cutting time of rennet gels.Effect of pH and enzyme concentration;*Inter. Dairy J.*, **8**, 289–293.

-**Lopez L.K. (2008)**. Détermination du rôle de certaines peptidases bactériennes par inférence a partir de données hétérogènes et incomplètes. *L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)*.

-**Mehaia M.A.and Cheryan M. (1983)**. Coagulation studies of ultra filtration concentrated skimmilk ; *Michwissenschaft*, **38**, 708–710.

- **Miranda G., Hazea G, Scanff P and Pea lissier J.P. (1989)**. Hydrolysis of lactalbumin by chymosin and pepsin: effect of conformation and pH. *Lait* **69**, 451-459.

- **Mitchel R.E.J., Chaiken I.M., and Smith E. (1970)**. The complete amino acid sequence of papain. Additions and corrections, *J. of Biological Chem.*, **245(14)**, 3485–3492.

- **Mohanty A.K., Mukhopadhyay U.K. , Kaushik J.K., Grover S. and Batish V.K. (2003)**. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*), *J. Dairy Res.* **70**, 37–43.

-**Mohanty A.K. , Mukhopadhyay U.K., Aushik J.K.K., Grover S. and Batish V K. (2003)**. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*), *J. Dairy Res.*, **70**: 37-43.

-**Moodie P. (2001)**. Traditional baking enzymes-proteases, *Enz. Develop. Corporation*.212 :736-1580.

-**Moschopoulou E., Kandarakis I., Alichanidis E. and Anifantakis E. (2006)**.Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid; *J. Dairy Res.* **73**, 49–57.

-**Moschopoulou E., Onoufriou E. and Kandarakis I. (2009)**. Effects of diet and abomasums part on enzymic properties of liquid lamb rennet. *Ital. J. Food Sc.* **21**, 73–80.

- **Moschopoulou E. (2011)**. Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production, *Small Ruminant Res.*, **101(1)**, 188–195.

- **Murthy P.S., Naidu M.M. (2010)**. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl. Sci.J.*, **8**; 199-205.

- **Nalinanon S., Benjakul S., Visessanguam W. and Kishimura H. (2007)**. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*); *Food Chem.* ;**104**:593–601.

- **Otsuki N., Dang N.H., Kumagai E., Kondo A., Iwata S. and Morimoto C. (2010)**. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects; *J. of Ethnopharmacol*, **127**:760–7.

- O'Sullivan N.A., Sousa M.J., O'Grady-Walsh D., Uniacke T., Kelly A.L. and McSweeney P.L.H. (2005). Ripening of Camembert-type cheese made from caprine milk using calf rennet or kid rennet as coagulant. *Int. J.Dairy Technol.* **58**, 13–18.
- Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I. and Del Rio L.A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes, *Plant Physio. and Biochem.*, **40**:521–30.
- Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., Nigam P. (1999). Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, **77**; 149–62.
- Paranthaman R., Alagusundaram K. and Indhumathi J. (2009). Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillusniger* in solid state fermentation. *World J. Agric. Sci.*, **5**(3); 308-312.
- Pardo M.F., Lopez M.I., Canals F., Zviles F.X., Natalucci CL. and Caffini N.O. (2000). Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae), *J. Agricult. and Food Chem.*, **48**:3795–800.
- Park H., Kusakabe I., Sakakibara Y. and Kobayashi H. (2001). Autoproteolytic processing of aspartic proteinase from sunflower seeds, *Biosc, Biotech., and Biochem.*, **65**(3), 702– 705.
- Patel R.S. and Reuter H. (1986) .Effect of sodium, calcium and phosphate on properties of rennet coagulated milk. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, **19**, 288–291.
- Penasse L. (1974). Les enzymes: cinétiques et mécanisme d'action, *Masson*. Paris. P. 58-86.
- Pico A., Gaya P., Medina M. and Nunez M. (1995). Kinetics of milk coagulation by mixtures of cyprosin and chymosin. *Milchwissenschaft*, **50**, 393–395.
- Piredda G. and Addis M. (1998). Det influence on enzymatic activities in lamb and rennet paste. *Sci. Tec. Latt. Cas.* **49**, p.p.129-138.
- Ramet J. P. (1997). Les agents de la transformation du lait. p.p. 165 – 174. In : ECK A., Gillis J.C. Le fromage : de la science à l'assurance qualité. Ed. : 3. *Tech. et Doc.* – Lavoisier, Paris, 891 p.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. and Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Molecular Biology Review*, **62** (3): 597- 635.
- Rossano R.D., Ambrosio A., Ferrara V., D' Elia A., Pizzillo M. and Riccio P. (2003). Influence of diet and age of kids on enzymatic activities of kid rennet pastes. *Ital. J. Food Sc.* **15**, 585–591.
- Ryle A.P. (1970). *Methods enzymol* .**19**,316-336.

- **Sastry K. and Mathure B. (1979).** Studies on milk clotting enzyme from *Bacillus mégaterium* K-4. 1. Effect of some nutrients on enzyme production. *J of food Sc. and tech.* 16. 1. 11-15.
- **Schiff H.E. (1992).** Environmental production and safety measures Related to biotechnological production of industrial enzymes at novo nordisk based upon genetically microorganisms. Dechema, sicherheit in biotechnology. IN: *Biotechnologies. Cood. Scriban, R. 4^{eme} èd.* 357-361
- **Scriban R. (1993).** *Biotechnologie, 4eme édition. Tech. Doc.. Lavoisier.* Paris. P. 30-695.
- Scriban R. (1999).** *Biotechnologie, 5eme édition. Tech. Doc.. Lavoisier.* Paris. P. 149-159.
- Sidikou I.D., Remy B., Hornick J.L., Losson B., Duquesnoy N., Yenikoye A. and Beckers J.F. (2005).** Le pepsinogène et la prochymosine des bovins: connaissances actuelles, applications et perspectives dans la stratégie de lutte contre les verminoses gastrointestinales, *Ann. Méd. Vét*, vol. 149, p. 213-228.
- Sullivan G.A., and Calkins C.R. (2010).** Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Sc.* ;27 .
- Sumantha A., Larroche C. and Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, **244**: 211–220.
- Suzuki M., Narita Y., Oda S.I., Moriyama A., Takenaka O. and Kageyama T.(1999).** Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins, *Comparative Biochem. and Physio. Part B: Biochem. and Molecular Biology*, 122(4), 453-460.
- Tang J. (1970).** *Methods enzymol.***19**, 406-421.
- Uyar F.,Porsuk I.,Kizil G. and Yilmaz E.I. (2004)** Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15, *EurAsian J. of Biosci.*,1-9
- Van Hooydonk A.C.M. and Walstra, P. (1987).** Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk. *Nether. Milk Dairy J.*, 41, 1987, pp. 19-47.
- Walsh G. (2002).** *Proteins, Biochemistry and Biotechnology. West Sussex, England: John Wiley and Sons Ltd.*; pp 420.
- Xiaoling H., Fazheng R., Huiyuan G., Weibing Z., Xi S., and Bozhong G., (2011).** Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4. *Korean J. Chem. Eng.*, **28**(1), 203-208.

-Zhang F.X., Chen J.P., Yang F. and Li L.Q. (2005). Effects of age and suckling on chymosin and pepsin activities in abomasums of goat kids, *Inter. J. of Dairy Tech.*, 58(2), 115–118.

-Zoon P. (1988). Rheological properties of rennet-induced skim milk gels [D]. *Wageningen Agricult. Univ*

-Zhongyang D., Shuangping L., Zhenghua G., Liang Z., Kechang Z. and Guiyang S. (2011). Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran. *African J. of Biotech.* Vol. 10(46), pp. 9370-9378,

Partie expérimentale

Chapitre I : Propriétés biochimiques d'une protéase végétale extraite du tourteau dégraissé de tournesol

1. Résumé

Dans l'étude de la biodiversité, on s'efforce d'explorer le mécanisme de production et de caractérisation des enzymes d'intérêt fromager à partir de déchets de produits comestibles sans valeur ajoutée mais non polluant, les sous produits des conserves végétaux et les tourteaux d'oléagineuses riches en protéines (l'artichaut ou le tournesol) et dont les caractères intrinsèques seront confrontés à ceux d'une présure industrielle. Aussi, Les espèces étudiées est un exemple de bioressource qui a servi de base d'exploration des possibilités d'application en fromagerie. En effet, une pléthore d'espèces végétales productrices de protéases a fait toujours l'objet d'études à travers le monde avide de produits biologiques sans contrainte religieuse, pathologique ou environnementale. Ceci est non moins important, que ces sous produits offrent aux consommateurs la meilleure relation Alimentation- santé. Une meilleure connaissance des propriétés des protéases extraites a été établie pour une meilleure future application en fromagerie locale. Ainsi, notre étude nous a permis d'évaluer les principales caractéristiques des enzymes purifiées par gel filtration suivie d'une chromatographie d'échange d'ions. Par ailleurs, la protéase a montré une sensibilité vis à vis de tous les inhibiteurs étudiés et la l'effet inhibiteur total par la pepstatine A classe l'enzyme dans le groupe des protéases à aspartate . La séquence en acides aminés de l'enzyme purifiée a donné un PM de 51,13 KDa. L'enzyme en question a été codée *protéase NT3*

2. Introduction

Actuellement les substituts d'origine fongique dominant le marché mondial des agents coagulant le lait comparés aux présures de remplacement d'origine animale. Certes, le génie génétique a développé le clonage de la Chymosine de veau et constitue aujourd'hui, avec quelques rares restrictions réglementaires une autre voie d'application dont l'emploi en fromagerie est en pleine croissance (**Sidrach et al.,2005**). Qu'en est-il de l'intérêt d'explorer la biodiversité végétale, source bon marché de beaucoup de métabolites naturels que les scientifiques aujourd'hui en font l'éloge aujourd'hui (chardon, latex de figuier, cardon, graines de melon,...).(**Barbosa, 1983; Nadaroglu,2012; Anusha 2014;...**)

L'objectif de notre présente étude, correspond à des essais plus poussés des caractéristiques biochimiques de la protéase isolée des graines de tournesol cultivé localement à titre expérimental.

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériels végétal

3.1.1. Matière première employée

La matière première utilisée dans notre étude est le tourteau de Tournesol issu d'une extraction manuelle des graines après délipidation à l'hexane à froid de l'amande. Les graines de tournesol sont disponibles pendant la saison estivale. A partir des essais réalisés sur les différentes parties de la graine, une forte activité coagulante de l'extrait enzymatique brut est obtenue à partir des tourteaux de l'amande dégraissée

3.1.2. Obtention et prétraitement des graines de Tournesol :

L'amande dégraissée de tournesol est plus intéressante que l'amande entière ce qui se traduit par un temps de prise plus faible comparé aux autres parties de la graine.

Après décorticage des graines, l'amande récupérée est broyée à l'aide d'un broyeur à couteaux suivi d'un mortier. Le broyat est ensuite dégraissés par l'hexane à froid sous agitation pendant 24heures, après l'extraction de l'huile, les tourteaux obtenus sont filtrés et conservés à l'air ambiant pour évaporer l'hexane résiduel. Ce prétraitement permet d'obtenir un tourteau bien dégraissé prêt à la macération.

3.1.3. Méthode d'extraction du système enzymatique

L'extraction que nous avons réalisée, emploie un tampon acétate de sodium à 0,1M, pH 5,2selon le protocole décrit par **Egito *et al.*, (2007)**

Une quantité de 10g de tourteau dégraissé est ajoutée à 40 ml de la solution tampon, qu'on fait agiter pendant 5 heures à température ambiante. Cette opération sert à augmenter la pression osmotique de la solution et permet de favoriser le passage de l'enzyme contenue dans les cellules végétales vers la solution (**Tsouli, 1979**).

Une congélation de la préparation après macération, est effectuée pendant 24h à -18°C, suivie d'une décongélation à température ambiante. Ce refroidissement brusque de notre mélange provoque des cassures dans les membranes des cellules facilitant ainsi la libération de leur contenu (**Laurent, 1974**).

Nous procédons ensuite à la filtration de la préparation à travers une gaze, les déchets solides sont écartés. La solution obtenue est centrifugée à 10.000 tr/mn pendant 15mn et à la température de 4°C dans une centrifugeuse réfrigérée type HERMLE GmbH.

Le surnageant récupéré représente l'extrait enzymatique brut qui est conservé au congélateur pour la suite des expériences.

3.2. Analyse de l'extrait enzymatique brut

3.2.1. Mesure de l'activité coagulante

L'évaluation de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été déterminée par la technique de **Soxhlet (1877)** et repris par **Shieh et al. (2009)**. Cette technique exprime l'activité de l'enzyme ou de l'extrait enzymatique en force coagulante et en unité présure (UP).

Cette force définit le volume de lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique ou d'une enzyme, en 40mn, à 35°C et pH6, 4 du substrat (lait).

Le test d'activité a été réalisé selon la méthode de **Berridge (1952)**. Le substrat est constitué de 12g de lait écrémé en poudre dissout dans 100ml d'une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) 0,01M à pH 6,4. (**Annexe 1**)

Un volume de 10ml de substrat est incubé à 35°C dans le bain marie pendant 30mn, ensuite on l'empresure avec 1ml d'extrait enzymatique. Le temps de prise correspond à la période qui sépare le moment de l'empresurage et l'apparition des premiers flocons de caséine adhérente à la paroi du tube à essai légèrement inclinés. Le temps de coagulation, quant à lui, correspond à la période séparant le moment de l'empresurage et l'instant où le caillé présente une consistance ferme (séparation totale entre le coagulum et le lactosérum).

3.2.2. Dosage des protéines

La concentration en protéines de l'extrait enzymatique a été déterminée selon la méthode classique de **Lowry et al.,(1951)**. Elle est basée sur une technique colorimétrique par référence à une courbe étalon établie à partir d'une solution standard de sérum albumine bovine (**Annexe 2**).

3.2.3. Mesure de l'activité protéolytique

Cette mesure est déterminée selon la méthode décrite par **Murado et al., (1993)**. L'objectif de la mesure de l'activité protéolytique est l'évaluation du taux de dégradation de la caséine (substrat) par l'extrait enzymatique. L'activité protéolytique est mesurée en utilisant comme

substrat une solution de caséine (sigma) à 1% dans NaOH 0,02M. Elle est réalisée afin d'évaluer le rapport Activité coagulante/Activité protéolytique (AC/AP).

L'addition du TCA dans le milieu réactionnel arrête la réaction et une centrifugation permet de séparer le précipité de caséine (culot) et le produit d'hydrolyse (surnageant) solubilisé dans le TCA. Le dosage de l'hydrolysate dans le surnageant (des peptides) est réalisée selon la méthode préconisée par **Lowry et al., (1951)**.

Les résultats s'expriment en terme de concentration de tyrosine ($\mu\text{g/ml}$) d'extrait enzymatique (**Federici, 1982**) par référence à une courbe étalon établie à partir de concentration croissante en tyrosine varient de 20 à 100 $\mu\text{g/ml}$.

Pour l'étude de l'activité protéolytique, la concentration des extraits coagulants est ajustée de façon à obtenir des temps de coagulation de grandeur comparable compris entre 5 et 10 mn selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante des extraits enzymatiques. (**Annexe 3**)

3.2.4. Détermination de l'indice AC/AP

Selon **Abel-fattah and El-hawwary., (1974)**, le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique (AC/AP) pour les préparations enzymatiques représente un indice d'appréciation de la qualité de ces présures de remplacement par rapport à la présure de référence. Sa mesure permet de déterminer l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait au même titre que la présure. C'est dans cet esprit que nous avons déterminé ce rapport qui correspond à la mesure des deux activités décrites précédemment.

3.3. Méthode de purification

3.3.1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (Pré purification)

Cette technique consiste à ajouter à une solution protéique du sulfate d'ammonium provoquant ainsi une déshydratation et une précipitation des protéines, ce qui établira par voie de conséquence le phénomène de relargage qui permet aux protéines de conserver leur conformation native et peuvent être redissoutes habituellement sans dénaturation.

L'extrait enzymatique brut est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium des taux de saturation de 20 % et 65% (**Egito et al., 2007**), ensuite l'EEB prépurifié sera soumis à une dialyse.

3.3.2. Purification analytique:

- **Purification de l'extrait coagulant par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75:**

Après avoir appliqué une pré purification sur l'extrait enzymatique brut, nous optons pour une purification par gel filtration qui nécessite une préparation de gel pour le remplissage de la colonne analytique type *Spectra Chrom*, de dimension 30 cm× 1cm. Pompe péristaltique STA-Multipurpose model DESAGA. Collecteur de fraction *Spectra Chrom CF*-
La lecture de l'absorbance est réalisée sur spectrophotomètre UV Visible-1800type Shimadzu réglé à 280 nm.

- **Purification de l'extrait coagulant par chromatographie d'échange de cations sur CM-50:**

Nous avons procédé à une purification par chromatographique sur colonne, en utilisant la carboxyméthyl-Sephadex (CM-50), une résine échangeuse de cations.

Le principe consiste à fixer les protéines par l'intermédiaire de leurs charges positives, sur les charges négatives de la CM-50, puis de les décrocher par passage de tampon acétate de sodium à 0,1M, pH 5,2 associé à un gradient linéaire de chlorure de sodium à 1M. La même procédure de purification et dans les mêmes conditions opératoires sont appliquées aux extraits enzymatiques. Une dialyse est appliquée sur les fractions actives

Il est utile de rappeler qu'une chromatographie sur DEAE a été utilisée sans pouvoir donner de fractions actives adsorbées sur le support de purification.

- **Purification de la fraction active de la CM 50 par chromatographie sur gel filtration**

La fraction active obtenue à partir de la chromatographie sur CM-50 était soumise à une chromatographie par gel filtration sur Sephadex G75.

3.4. Etudes des inhibiteurs de l'extrait enzymatique brut

L'effet des inhibiteurs de l'enzyme a été mesuré selon la technique décrite par **Raposo et Domingos (2008)** avec des modifications suggérées par **Kumari et al. (2012)**.

3.4.1. Inhibiteurs chimiques

Pour étudier l'impact de différents inhibiteurs de peptidase sur l'activité protéolytique de la protéase, l'activité résiduelle a été estimée après incubation de l'enzyme brut de tournesol

avec des inhibiteurs à 37°C pendant 30 min à une concentration 1mM. Les inhibiteurs chimiques étudiés sont, la cystéine (iodoacétamide), l'EDTA et pepstatine-A.

3.4.2. Inhibiteurs par quelques métaux

L'effet des divers ions métalliques bivalents ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) sur l'activité enzymatique a été observé en incubant l'extrait brut de tournesol avec l'ion à 37°C pendant 30 mn et à une concentration de 1 mM. L'activité résiduelle exprimée en % est rapportée à l'activité initiale de l'enzyme sans inhibiteur dans conditions standards de mesure de l'activité coagulante.

3.4. Caractérisation de l'extrait coagulant brut

Afin de caractériser l'extrait enzymatique pré purifié, nous avons déterminé les conditions optimales d'activité coagulante en faisant varier les paramètres suivants : température, pH, concentration en CaCl_2 du lait et la concentration en enzyme.

La mesure de l'activité sous ces différents paramètres est déterminée en observant le temps de coagulation du lait en faisant varier les valeurs du paramètre étudié.

Les différents paramètres : concentration en enzyme, pH, température, ainsi que la concentration en CaCl_2 du lait sont fixés selon les conditions modifiées de mesure de l'activité coagulante (température 35°C, pH 5,5, concentration en CaCl_2 0,01 M et concentration en enzyme).

L'activité optimale est exprimée en pourcentage (activité relative) par rapport à la plus forte activité obtenue (temps de coagulation le plus court).

Notons que nous avons comparé notre extrait enzymatique pré purifié à la présure commerciale d'origine bovine utilisée en technologie fromagère à l'unité Laiterie-Fromagerie de Boudouaou. Cette présure titre une force de 100.000 et diluée au 1/100^e lors des différentes mesures témoins.

Pour l'étude de l'effet de la concentration des solutions enzymatiques, cette dernière est ajustée de façon à obtenir un temps de coagulation de grandeur comparable compris entre 5 et 10 mn selon les conditions modifiées de mesure de l'activité coagulante des extraits enzymatiques.

3.5.1. Influence de la température du lait :

La détermination de la température optimale d'action de l'enzyme se fait par observation du temps le plus court de coagulation du lait en variant les températures de 25°C à 65°C par palier de 5°C; les autres paramètres étant fixés selon les conditions standards (pH= 6,4 ; concentration de $\text{CaCl}_2 = 0,01\text{M}$).

3.5.2. Influence de pH du lait :

La détermination du pH optimum d'activité de l'extrait enzymatique se fait en mesurant le temps de coagulation en faisant varier le pH du lait de 5,0 à 7,5 par palier de 0,2 ; les autres paramètres sont toujours fixés selon les conditions standards

3.5.3. Influence de la concentration optimale de CaCl₂ :

La concentration en CaCl₂ favorisant la coagulation est déterminé en observant le temps plus court de coagulation avec une concentration en CaCl₂ allant de 0,01 à 0,05M ; les autres paramètres étant fixés selon les conditions standards (pH= 6,4 ; température 35°C).

3.5.4. Influence de concentration en enzyme :

L'influence de la concentration en extrait coagulant a été déterminée en évaluant le temps de coagulation du lait en fonction de concentrations variables de l'extrait enzymatique (de 25 à 100%). Par les autres paramètres étant fixés selon les conditions standards (pH= 6,4 ; température 35°C ; CaCl₂ 0,01M).

3.6. Stabilité de l'enzyme

La stabilité des extraits enzymatiques de tourteaux de tournesol et de la présure a été étudiée selon le protocole décrit par **SIDRACH et al. (2005)**.

3.6.1. Stabilité au pH

Le pH optimal de stabilité de l'enzyme est déterminé en observant le temps le plus court de coagulation du lait à différents pH de l'extrait de la présure. A 0,8 ml de solution tampon de pH 3, 4, 5, 6, 7, et 7.5 sont additionnés 0.2 ml d'extrait enzymatique.

La solution est incubée à température ambiante pendant 150 mn ensuite l'activité coagulante est mesurée dans les conditions modifiées.

3.6.2. Stabilité à la température

La température optimale de stabilité de l'enzyme est déterminé en observant le temps le plus court de coagulation du lait après incubation des extraits enzymatiques et de la présure à 50, 60, 70 et 80°C pendant 0, 40, 70 et 100 mn.

3.7. Détermination du poids moléculaire

Le poids moléculaire de la protéase de tournesol a été déterminé après purification de la fraction active sur Sephadex G-75 dont la colonne est calibrée avec un mélange de protéines standards de moléculaires connus : Sérum albumine bovine (BSA) :67 K Da ; Trypsine : 23,84 K Da et Lactalbumine : 18 K Da.

3.8. Electrophorèse PAGE-SDS

La fraction active obtenue à partir d'une gel filtration a été congelée et lyophilisée pour une électrophorèse selon **Laemmli (1970)**, afin de vérifier l'homogénéité et la pureté de l'enzyme. Les différents échantillons et marqueurs, sont séparés sur un gel de polyacrylamide formé par un gel de séparation à 12% et un gel de concentration à 5% (**Annexe 4**). La migration électrophorétique est obtenue grâce à un système d'électrophorèse 'Max Fill Bioblock Scientific'. Le kit de protéines marqueurs de poids moléculaire (26-180 kDa) a été utilisé à des fins de comparaison. (Standard : Alpha 2 macroglobuline from equine serum : 180 kDa ; β -galactosidase from E.Coli : 116 kDa ; Lactoferrin from humain milk : 90 kDa ; Pyruvate kinase (rabbit muscle) : 58 kDa ; Fumarase (porcine heart) 48.5 kDa ; Lactic déshydrogénase (rabbit muscle) 36.5 kDa ; Triosephosphate isomérase 26 kDa)

3.9. Détermination de la séquence des acides aminés de la protéase NT3 de tourteaux de tournesol

Le séquençage de la protéase coagulante extraite des tourteaux de tournesol isolée a été réalisé au niveau du laboratoire de biotechnologie alimentaire de l'Université de Moncton (Canada) selon le protocole décrit par **Shevchenko et al (1996)** avec des modifications suggérées par **Havlis et Briefly (2003)** et rapporté par **Nouani (2009)**.

4. Résultats et discussion

4.1. Résultat de l'extraction :

4.1.1. Activité coagulante de l'extrait brut

Tableau 5 : Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de Tournesol.

Paramètres L'extrait	Quantité employée (g)	Vol.de tampon utilisée (ml)	Vol. d'extrait coagulant brut obtenu (ml)	Temps de coagulation (sec)	Force d'extrait coagulant	Unité présure (UP)
Extrait enzymatique brut de tournesol	5	20	16.8	840	28.57	0.13

Par ailleurs, étant donné les faibles activités enzymatiques obtenues, **Tsouli (1979)** avait utilisée d'autres procédés pour arriver à des solutions à forte activité coagulante, en employant l'alcool éthylique. Ces résultats sont en accord avec les anciens travaux sur les presures obtenus par **Christen et Virasoro (1935)**.

Nos résultats ont montré que les graines dégraissées de tournesol à l'état brut possèdent une activité coagulante semblable à celle de l'extrait de fleur de *Calotropis gigantea* (**Anusha et al. 2014**), plus faible par rapport à l'activité de *Scorzonera hispanica L.* (**Nadaruglu et al. 2012**) et supérieure à celle rapporté par **Egito et al. 2007** ($5,8 \cdot 10^{-3}$ et $39 \cdot 10^{-3}$ U mg⁻¹),. Aussi, **Park et al. (2000)** ont rapporté que La protéase aspartique purifiée de *H. annuus*, variété IS-3311, a montré une activité coagulante presque négligeable ($20 \sim 10^{-3}$ U mg⁻¹, déterminée à 35°C et pH 6,0). Il est évident que ces protéases coagulant le lait ont été obtenues selon différents protocoles d'extraction peuvent présenter des résultats contradictoires, Par ailleurs, étant donné les faibles activités enzymatiques obtenues.

4.1.2. Concentration en protéines totales et rendement d'extraction

La concentration en protéines totales de l'extrait coagulant brut est de 70,55mg/ml

Ce taux relativement élevé obtenu ne reflète pas avec précision la concentration en protéines recherchée (protéases), mais comporte en plus des protéines coagulantes d'autres types de protéines de nature diverse.

Il faut noter de même que l'activité protéasique n'est proportionnelle à la concentration en protéines totales des extraits bruts et ceci pour la raison évoquer précédemment.

Le rendement d'extraction a été calculé en % à partir du taux de protéines totales de l'extrait brut par rapport à la masse nette de la matière première utilisée

Tableau 6 : Concentration en protéines totales de l'extrait coagulant brut de Tournesol et rendement d'extraction.

Paramètres L'extrait	Concentration en protéines totales (mg/ml)	Rendement d'extraction (%)
Extrait enzymatique brut de Tournesol	70,55	56

4.1.3. Activité protéolytique de l'extrait brut

Dans notre étude, nous avons observé une très forte activité protéolytique de l'extrait brut de tournesol (de l'ordre de **0,66 mg/ml**) en comparaison à celle de la présure commerciale. Ainsi, l'action de rupture de la liaison *Phe₁₀₅-Met₁₀₆* de la caséine κ par les aspartyl protéases comme l'extrait de tournesol est semblable à celle de la chymosine et les autres protéases d'origine fongique et bactériennes (**Sidrach et al., 2005**) et l'effet protéolytique est identique à celui des extrait de *Cynara cardunculus* qui sont largement utilisés dans la fabrication des fromages (**Silva et al., 2002**).

Dans la littérature, des enzymes coagulantes, l'activité protéolytique est importante pour les coagulases d'origine végétale (artichaut, figuier) en comparaison avec la présure commerciale, selon **Barbosa (1983)**, les protéases microbiennes et végétales manifestent une forte activité protéolytique par rapport aux protéases d'origine animale.

4.1.4. Indice AC/AP

La mesure de l'indice permet de confirmer le pouvoir coagulant des succédanés de la présure. Dans nos conditions expérimentales, l'indice AC/AP de l'extrait enzymatique à l'état brut de *la protéase de tournesol* a été estimé à **44,5**. En comparant l'indice observé par rapport à celui donné par la littérature (**Mazorra-Manzano et al., 2013, Nars et al., 2016**), il semblerait que la valeur trouvée est appréciable et confirme les aptitudes de cette souche à être employé dans l'industrie fromagère.

4.2. Résultats de Purification

4.2.1. Purification partielle de l'extrait enzymatique brut (Précipitation au sulfate d'ammonium et dialysé)

A ce stade des essais et dans ces conditions de précipitation, l'activité coagulante du L'extrait enzymatique précipité au sulfate d'ammonium à 20-65% de saturation, dialysé puis concentré avec du saccharose est de l'ordre de 0,12UP et la teneur en protéines totales de 40,88 mg/ml, soit 58% des protéines précipitées par rapport au taux global de l'extrait brut. Ainsi, 42% des protéines non enzymatiques ont été éliminées. Aussi une activité de l'ordre de 93,07% par rapport à l'activité initiale et un facteur de purification de l'ordre de 1,6 fois (Tableau 7). Cependant, il semble bien que la saturation à 20% puis à 65% suffisante pour permettre une purification plus importante de l'extrait brut.

4.2.2. Purification analytique de l'EEB prépurifié par chromatographie d'exclusion moléculaire

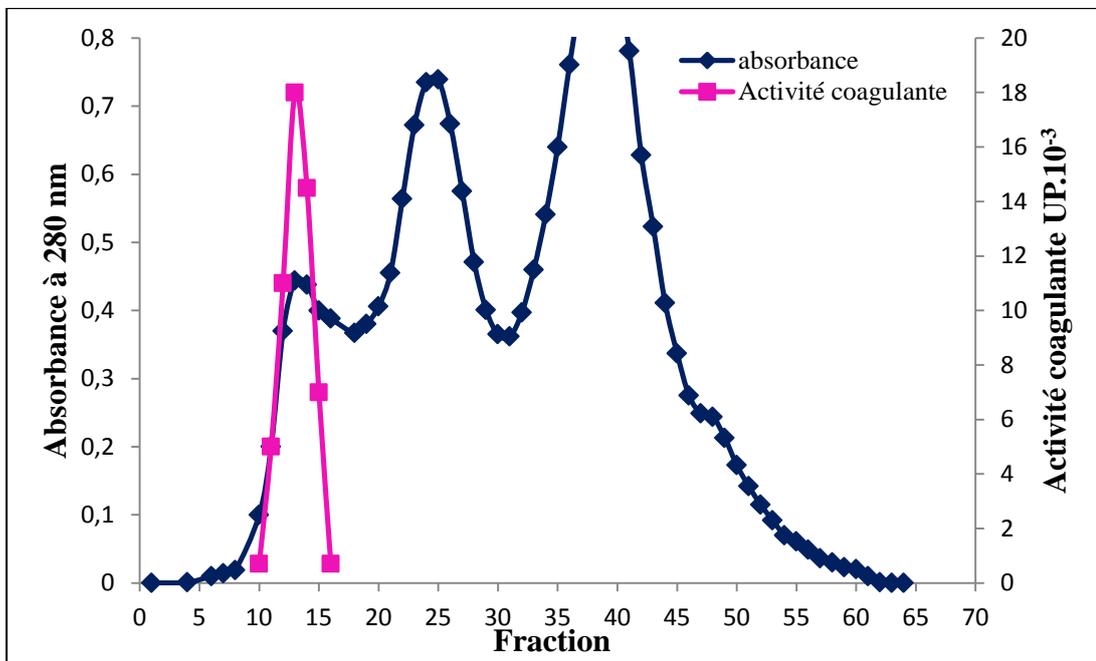


Figure 9: Profil d'élution sur Sephadex G-75 de l'extrait enzymatique brut de Tournesol (*Helianthus annuus*) après précipitation au sulfate d'ammonium à 20% et 65% de saturation, dialysé et concentré. (Colonne *Spectra Chrom* (1 × 30 cm), tampon d'élution acétate (0,1M ; pH 5,2), débit : 18 ml/h, fraction de 1ml)

L'étape de purification sur gel filtration d'extrait enzymatique brut a permis de concentrer l'enzyme d'environ 8 fois avec un rendement de purification de 14 % par rapport à l'extrait initial. ; Ceci est dû à l'élimination totale du sulfate d'ammonium et de la plupart des protéines non enzymatiques.

D'après les résultats illustrés dans le tableau 7, nous pouvons conclure que les résultats obtenus par chromatographie sur gel de filtration G-75 après précipitation au sulfate

d'ammonium à 20-65% de saturation confirment bien l'intérêt de cette technique dans l'étude des enzymes.

Tableau 7 : Bilan de purification de l'extrait coagulant de *Tournesol* par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G75 (après précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium).

Paramètres Etapes	Concentration en protéines (mg/ml)	Rendement en protéines enzymatique (%)	Activité Coagulante (UP)	Force de Coagulation (F)	Activité Spécifique (F/mg Protéines)	Rendement de purification (%)	Facteur de purification
Extrait enzymatique brut	70,55	100	0,13	28,57	0,404	100	1
Précipitation au sulfate d'ammonium à 20% -65%	40,88	57,94	0,121	26,67	0,652	93,07	1,613
Gel filtration sur G-75	1,165	1,65	0,0182	4	3,433	14	8,497

4.2.3. Purification de l'extrait coagulant par chromatographie d'échange de cations sur CM-50

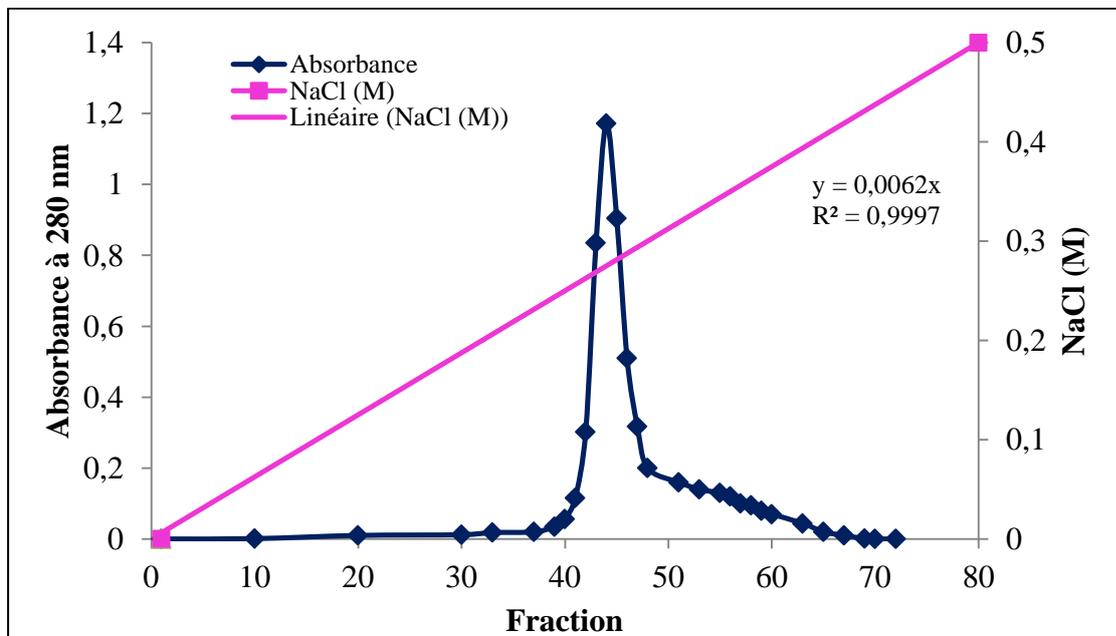


Figure 10 : Profil d'élution sur CM-50 de l'extrait enzymatique brut de Tournesol (*Helianthus annuus*) après précipitation au sulfate d'ammonium à 20% et 65% de saturation, dialysé et concentré. (Colonne analytique *Spectra Chrom* (1 × 30 cm). Tampon d'élution (tampon acétate (0,1M ; pH 5,2)

Le profil montre un seul pic doué d'activité coagulante, soit un volume récupéré de 44 ml avec une activité enzymatique de l'ordre de 0,046 UP.

L'enzyme est éluée avec le gradient NaCl à une concentration de 0,27 M. Ceci suggère que notre coagulase est de nature cationique. Au cours de cette étape, nous avons enregistré une augmentation du facteur de purification de l'ordre de 17,12. Cependant, le rendement en activité chute à 35,15 %.

Tableau 8: Rendement et facteur de purification (CM50)

Paramètres Etapes	Concentration en protéines (mg/ml)	Rendement en protéines enzymatique (%)	Activité Coagulante (UP)	Force de Coagulation (F)	Activité Spécifique (F/mg Protéines)	Rendement de purification (%)	Facteur de Purification
EEB	70,55	100	0,13	28,57	0,404	100	1
Précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20% -65%	40,88	57,94	0,121	26,67	0,652	93,07	1,613
Echange de cation sur CM50	1,445	2,05	0,046	10	6,920	35,15	17,128

4.2.4. . Purification de la fraction active par gel filtration sur G75

Le passage de la fraction active issue de la chromatographie d'échange de cations CM-50 sur colonne de G75 a montré deux pics dont le 1^{er} est doué d'activité coagulante (**Figure 11**). Ce pic est élué vers la 27^{ème} fraction soit un volume d'élution de 27ml. L'activité coagulante de l'ordre 0,0012 UP.

Bien que l'échange cationique réalisé sur nos extraits a permis d'éliminer une masse non négligeable de protéines contaminants, il demeure cependant que la purification par gel filtration a élué une fraction protéique associée à la fraction active (**Figure 11**). Cet état de fait observé confirme l'intérêt d'une purification plus poussée telle que l'affinité ou l'électrophorèse afin d'estimer l'homogénéité de notre protéase.

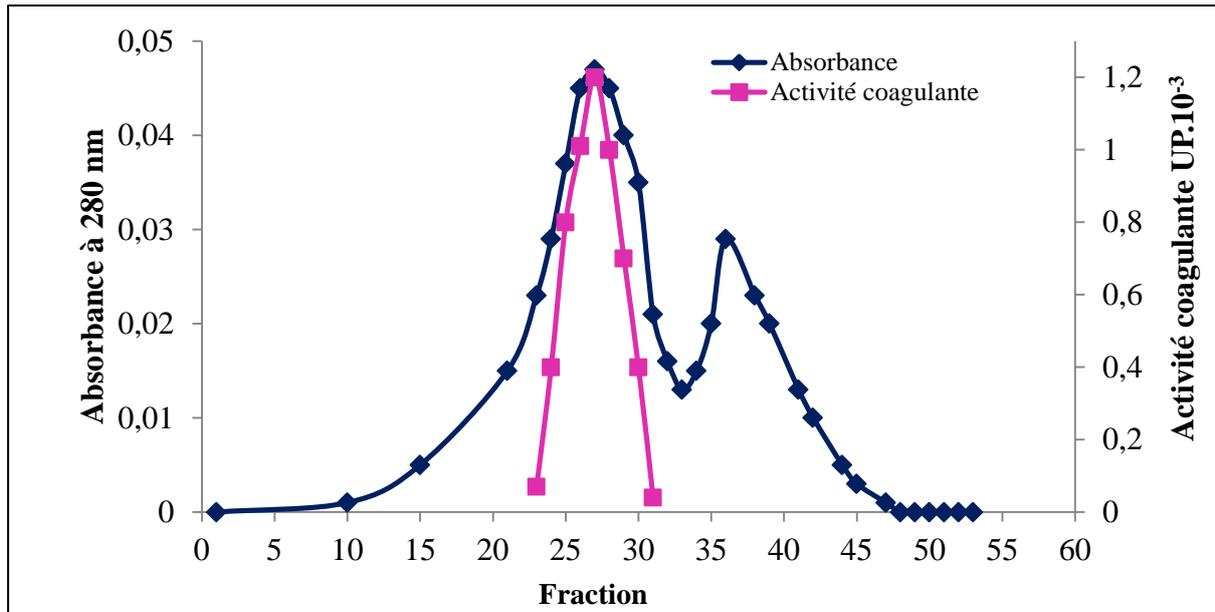


Figure 11 : Profil d'élution sur gel de filtration Sephadex G-75 de fraction active de chromatographie d'échange cations. (Colonne analytique *Spectra Chrom* (1 × 30 cm), tampon d'élution acétate (0,1M ; pH 5,2), débit : 18 ml/h, fraction de 1ml).

4.3. Etudes des inhibiteurs de l'extrait enzymatique brut NT3

4.3.1. Inhibiteurs chimiques

Tableau 9 : L'effet des inhibiteurs **chimiques** sur l'activité l'extrait enzymatique brut de tournesol

Paramètres Substances	Activité coagulante (UP)	Activité relative Résiduelle (%)	Activité relative Inhibée (%)
EEB	0.20	100	0
Cystéine	0.091	45.5	54.5
EDTA	0.076	38	62
Pepstatine-A	/	0	100

Il est connu que les inhibiteurs du site actif des protéases ont été utilisés pour identifier le groupe auquel notre enzyme appartient et donnent principalement un aperçu de sa nature et de la nature du son site actif. Parmi les inhibiteurs testés, le tableau 9 montre que l'extrait enzymatique brut a retenu environ 54% de l'activité de coagulant le lait en présence de la cystéine, tandis que l'EDTA a réussi à supprimer jusqu'à 62% de l'activité enzymatique. Cependant, la Pepstatine A à 0.01 mM a montré un effet apparent dans l'activité enzymatique et inhibait significativement l' AC provoquant 100% d'inhibition. Ces résultats suggèrent la

présence d'une Aspartylprotéase dans l'extrait enzymatique. Des résultats similaires ont été rapportés chez la même espèce par **Nasr et al., (2016)**.

4.3.2. Inhibiteurs métalliques

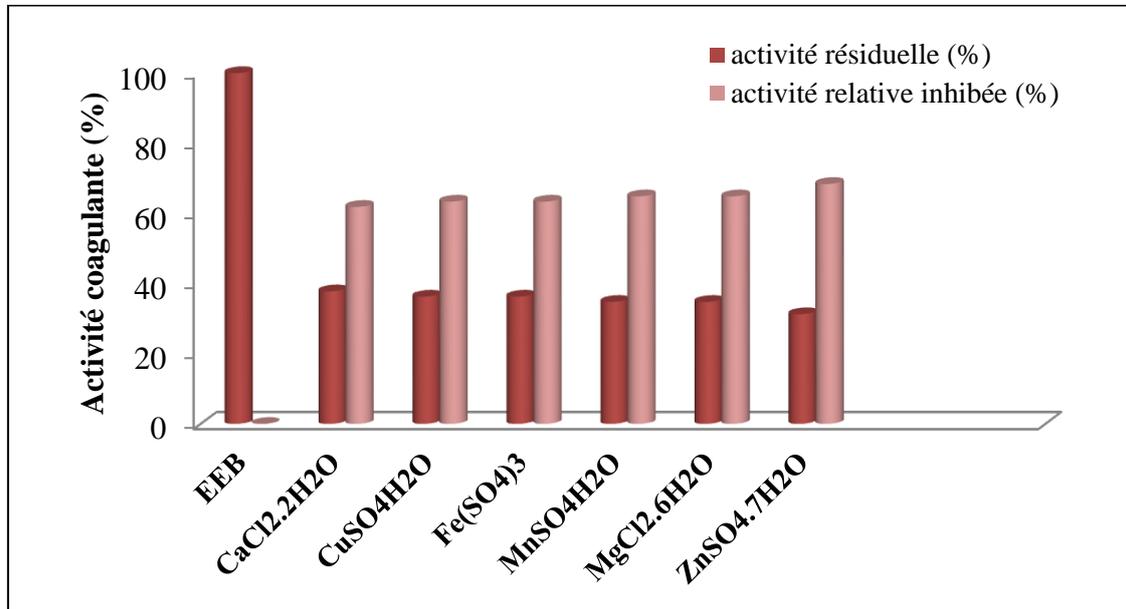


Figure 12 : L'effet des inhibiteurs par métaux sur l'activité de l'EEB de tournesol

Les données présentées dans la **figure 12** indiquent que les résultats enregistrés avec les différents inhibiteurs métalliques sur l'activité coagulante ont montré une inhibition significative dans un intervalle compris entre 62 (CaCl₂.2H₂O) et 68,5% (ZnSO₄.7H₂O).

4.4. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

4.4.1. Influence de la température du lait

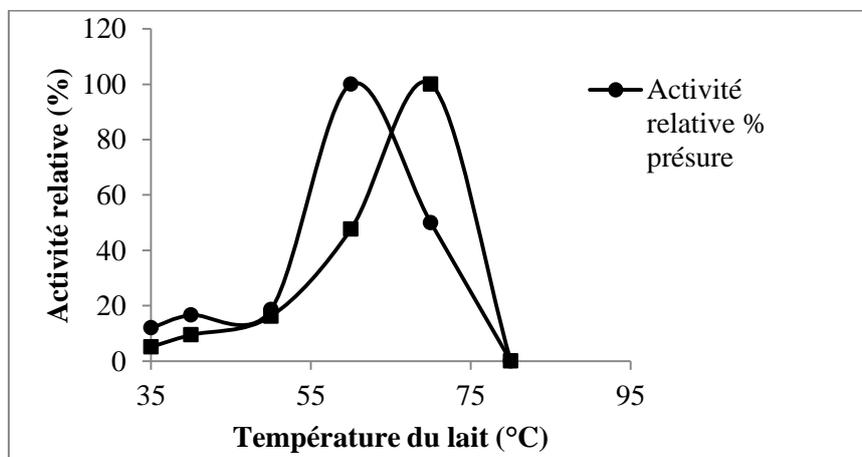


Figure 13 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante

D'une façon générale, les enzymes d'origine végétale se caractérisent par des températures optimales d'activité et des températures létales bien supérieures à celles que l'on observe dans le cas des enzymes d'origine animale et de la présure en particulier. Plusieurs travaux antérieurs (**Barboasa et al., 1976 ; Gupta et Eskin, 1977 ; Walde et al. , 1984 ; Bruno et al. , 2002 ; Lo piero et al. , 2002 ;**) ont confirmé ces observations.

En effet, les enzymes d'origine végétale sont largement plus thermophiles que celles d'origine animale et microbienne. Et les résultats observés dans notre travail confirment cette approche. En effet, l'extrait coagulant de tournesol, se montre très actif à 70°C à pH 5,5. Ce n'est qu'à partir de cette température que l'activité de Tournesol commence à diminuer pour s'annuler à 80°C. En revanche et dans nos conditions expérimentales modifiées, la présure commerciale a montré une activité optimale vers 60°C.

Cette thermoactivité est due probablement au pH du lait qui dans nos conditions de mesure de l'activité coagulante présentait une acidité élevée (pH 5,5) comparativement aux conditions standards de mesure (pH 6,3-6,4). Les raisons de modification des conditions standards ont été décrites dans Matériel et Méthodes.

Selon **Garnot et Martin (1980)**, la présure présente une activité coagulante optimale à une température voisine de 40°C. Dans un autre volet, Le caractère thermophile de la protéase végétale a été rapportée différemment par **Chazzara et al., (2007) et Sidrach et al., (2005)** sur la cynarse (70°C), **Raposo et Domingos (2008)** sur la protéase de *Centaurea calcitrapa* (52°C), **Lo piero et al., (2002)** sur la lactucine de *lactuca sativa* (50°C).

4.4.2. Influence du pH du lait

Les enzymes quelles soient d'origine animale ou d'origine végétale ont des pH d'activité se situant dans l'intervalle des pH acides (**Garnot et Martin 1980**). En effet les résultats obtenus avec le Tournesol révèle un optimum d'activité à pH 5,2 (**Figure 14**).

Llorente et al. (2004), rapportent que l'activité optimale de la coagulase extraite à partir de l'artichaut se situe entre pH 4,5 et 5,5. Selon **Garnot et Martin (1979)**, l'optimum d'activité de la présure en fonction du pH est de 5,8 et à pH 6,6 cette coagulase est inactivée. Le comportement de l'extrait de Tournesol vis-à-vis du paramètre pH est relativement proche de celui de la présure, car selon les résultats obtenus dans notre étude ces deux coagulases révèlent un optimum d'activité à pH 5,2 puis marquent une diminution de l'activité qui est inversement proportionnelle aux valeurs du pH et sont inactivées à pH neutre à légèrement basique (**figure 14**). Les mêmes observations sont rapportées par **Nouani et al. (2009)** sur les extraits purifiés de *Mucor pusillus*.

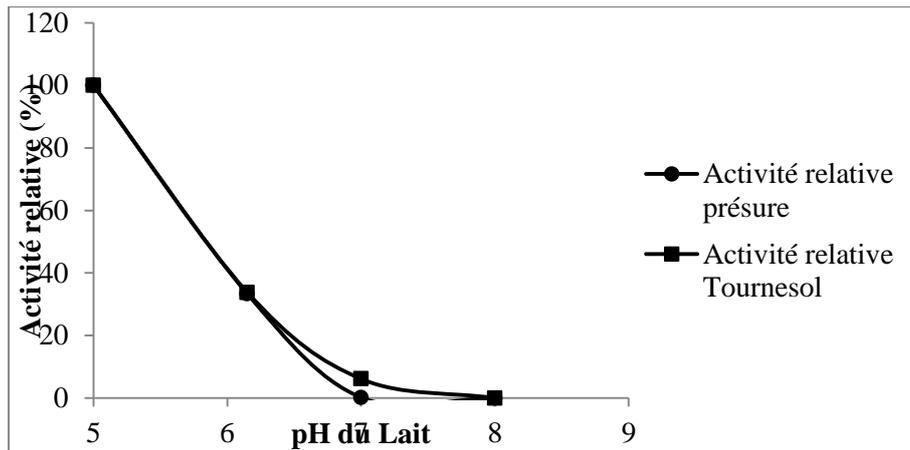


Figure 14 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante

Cependant les enzymes d'origine végétale supportent mieux les pH élevés par rapport à celles d'origine animale, ceci concorde avec les résultats évoqués précédemment, puisque la présure est inactivée à pH 7,0 et le Tournesol ne l'est qu'à pH 8,0. Ces résultats similaires ont été observés par Chazzara et al., (2007) et Heimgartner et al., (1990) sur la protéase de *Cynara cardunculus*. Les fromages traditionnels frais et à pâte molle comme les *Djeben* à base de laits de petits ruminants supportent mieux la coagulation à ces pH ou la manipulation traditionnelle accélère le processus d'acidification des laits.

4.4.3. Influence de la concentration en CaCl_2 du lait :

L'addition au lait de chlorure de calcium, pratique courante en fromagerie, a pour effet de réduire le temps de coagulation et d'accroître la fermeté du coagulum, cette influence n'est pas seulement liée à l'augmentation du pH, réduisant ainsi la stabilité micellaire (ECK,1990).

Ainsi une concentration optimale est disponible pour favoriser l'action des protéases.

Le calcium est généralement ajouté au lait sous forme de CaCl_2 . Un intervalle de concentration en CaCl_2 compris entre 0,005 à 0,05 M est ajouté au lait pour évaluer l'influence sur l'activité coagulante.

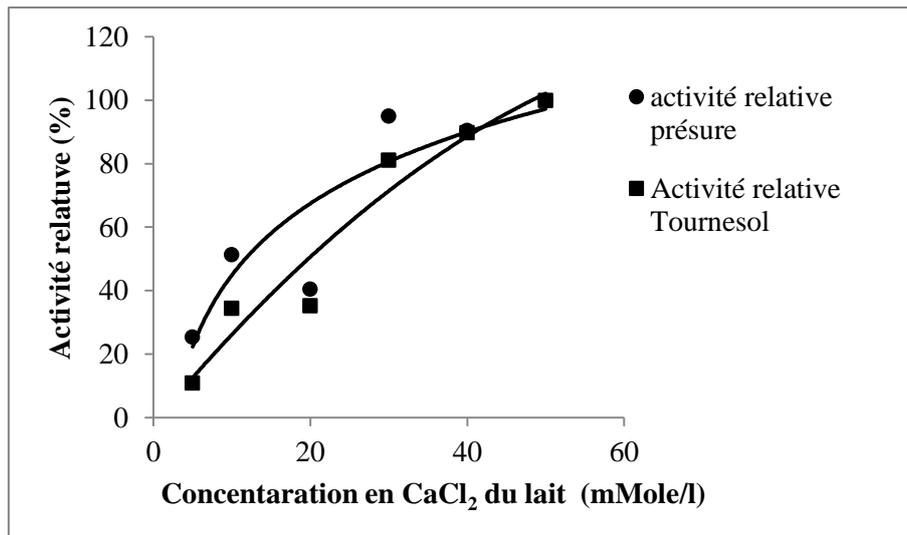


Figure 15 : Effet de la en CaCl₂ du lait sur l'activité coagulante

En effet, des études ont rapporté que les fortes concentrations en Calcium peuvent être un facteur inhibiteur de la coagulation pour certaines enzymes très sensibles à ce facteur (**Iwasaki et al., 1970**). A 50 Mm/l de Calcium par litre de lait, les deux enzymes présentent encore une activité coagulante optimale (**Figure 15**). Les travaux de **Isam et al. (2010)** ont montré qu'une forte activité coagulante de l'extrait de *Solanum dubium* est obtenue à des concentrations élevées en CaCl₂ soit 0,6 à 0.8 mM/l pour chuter avec une concentration de 3 mM/l. En effet, L'addition du calcium soluble entraîne une augmentation de la teneur en phosphate de calcium colloïdal lequel semble être le facteur déterminant de l'aptitude du lait à la coagulation par la présure (**Brule et Lenoir, 1997**). En effet, Cette addition provoque, selon **Najera et al. (2003)**, une diminution du temps de coagulation. Ainsi, Nos résultats concordent avec ceux obtenus par plusieurs auteurs qui ont mis en évidence l'effet des ions Ca⁺⁺ dans le processus de coagulation enzymatique des laits (**Chazarra et al., 2007; Bencini, 2002; Lagaude et al., 2004**) contrairement à **Lo piero et al. (2002)** qui rapporte que l'addition du CaCl₂ n'affecte pas l'activité catalytique de la *lettucine* sur la caséine entière.

4.4.4. Influence de la concentration en extrait enzymatique

L'effet de la concentration en extrait enzymatique sur l'activité coagulante est défini en faisant varier la concentration et la quantité d'extrait. Les activités des enzymes coagulantes d'origine végétale et animale se comportent différemment en fonction de leur concentration en solution. Cette différence de comportement concerne aussi l'origine microbienne. Selon **Garnot et Martin (1979)**, l'activité de la présure croît linéairement en fonction de sa concentration lorsque celle-ci est faible, ce qui correspond aux doses employées en

fromagerie. Pour des concentrations plus élevées, la vitesse d'action de la présure tend vers une limite.

Ainsi et en générale selon **Granday (1978)** dans une étude de détermination de l'activité enzymatique d'extraits coagulants d'origine animale a montré que la concentration en enzyme est inversement proportionnelle au temps de coagulation.

Tenant compte de toute nos observations et dans nos conditions expérimentales, les allures des courbes d'activité obtenues avec l'extrait de tournesol et la présure sont identiques (**Figure 16**). Dans l'intervalle des concentrations choisies, on n'a pas noté de pallier de saturation en enzyme. **Bruno et al. (2010)** a montre sur des extraits de *Bromelia hieronymi* que l'activité coagulante croît linéairement avec la concentration en enzymes et est fonction de la température du lait, faible à 25°C et élevée à 45 °C.

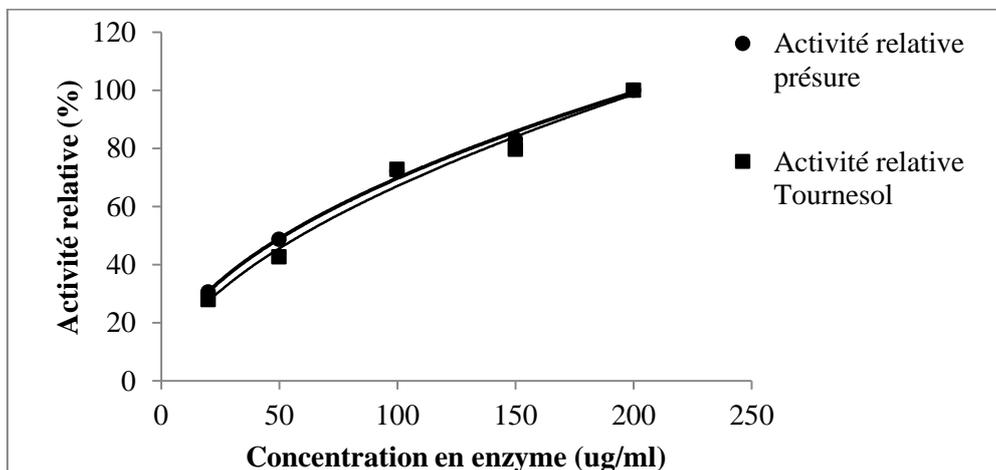


Figure 16 : Effet de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante

Parallèlement à ces observations et dans les conditions standards de la coagulation du lait, les faibles activités spécifiques de l'enzyme nécessite l'emploi de grandes concentrations pour atteindre la formation du gel. Tenant compte de ces observations, Il est clair que l'extrait de *Tournesol* nécessite des doses importantes en fromagerie et à faibles doses le temps de coagulation serait trop lent.

4.5. Etude de la stabilité

4.5.1. Stabilité à la température

L'étude de la stabilité thermique montre que toutes les enzymes étudiées sont sensibles aux températures élevées, elles perdent leurs activités en fonction du temps d'incubation et de la température du milieu réactionnel (**Figure 17**). A partir de 40°C et après 40 mn

d'incubation, la perte d'activité est rapide. Cependant, la cinétique de dénaturation des deux protéines est différente, lente chez la protéase de tournesol et rapide pour les pepsines (présure). Le caractère thermophile de l'enzyme végétale est reconnu chez beaucoup d'espèces végétales et la thermostabilité semble exprimer un caractère variétal. Ainsi, des résultats similaires sont rapportés par **Sidrach et al., (2005)**, **Lo piero et al., (2002)** et **Llorente et al., (2004)** sur des protéases incubées pendant 1 à 4 heures entre 40 et 50°C, par contre la protéase de *Centaurea calcitrapa* conserve 100% de son activité initiale à 70°C après 6 heures d'incubation (**Raposo et Domingos, 2008**).

Par ailleurs, les conditions du milieu réactionnel qu'est le lait semble modifier le comportement de l'enzyme. En effet, la température du lait associé à un pH de 5,5 du substrat influencent non seulement l'activité coagulante mais diminue aussi sa stabilité. Par ailleurs, le temps de prise du lait est diminué à des pH proches de la limite de la zone de dénaturation des caséines et à pH 5,5 le lait coagule instantanément à 80°C.

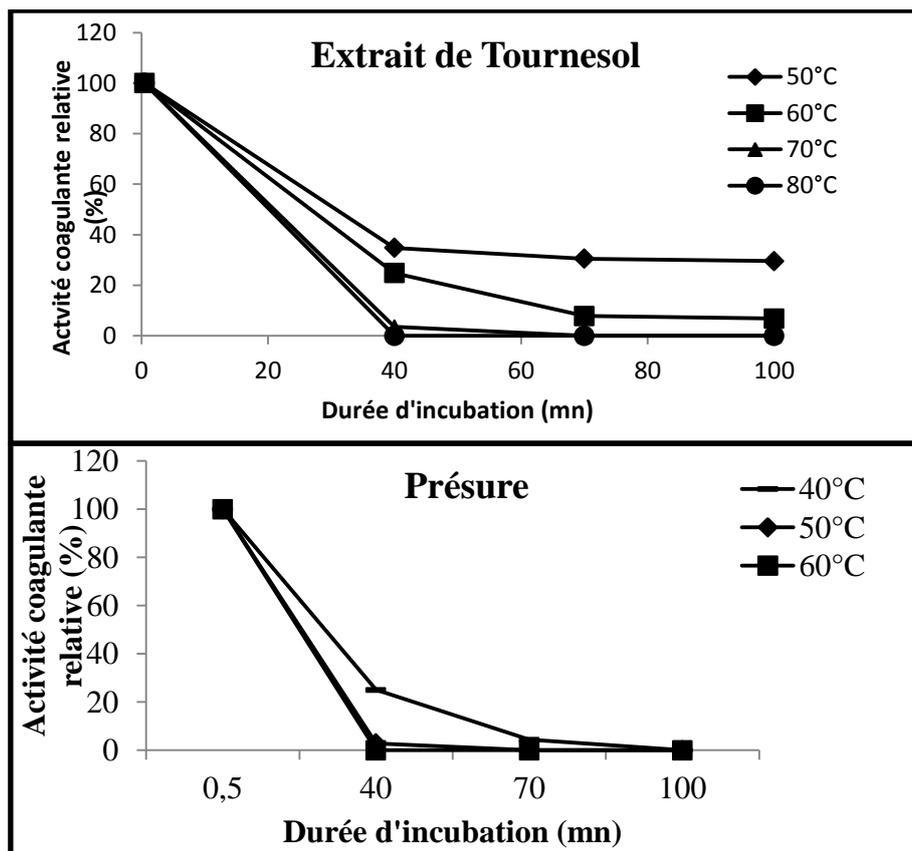


Figure 17 : Stabilité thermique de la présure et de l'extrait de Tournesol

4.5.2. Stabilité au pH

D'après la **Figure 18**, la stabilité des extraits est maximale aux pH acides. A pH 3, les extraits de tournesol comme la présure conservent toute leur activité soit 100%. Ces résultats concorde avec ceux obtenus par **Park et al (2000)** sur des graines de tournesol. En effet, ces auteurs ont montré une forte stabilité de l'enzyme séquencée à pH 3. Cependant, l'allure décroissante des courbes de pH est prononcée chez la protéase de tournesol dont l'activité résiduelle est très faible à partir des pH 5 pour atteindre environ 20% de son activité contrairement a la présure animale qui semble plus stable même en se rapprochant des pH neutres. **Sidrach et al.(2005)** rapporte une activité maximale de la *Cynarase* à pH 5 et a 70°C pendant 60h d'incubation.

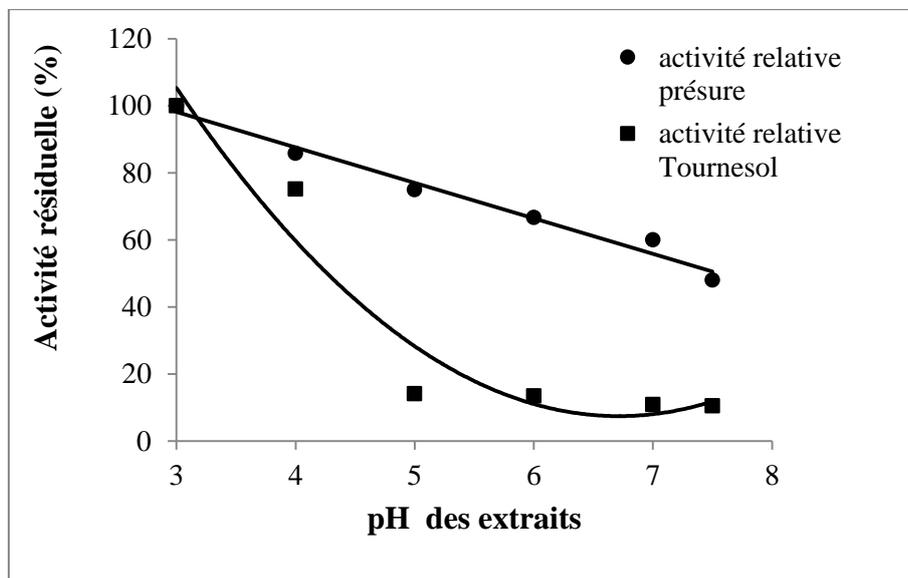


Figure 18 : Stabilité au pH de l'extrait de Tournesol et de la présure.

4.6. Détermination du poids moléculaire

Comme il a été souligné précédemment, le profil d'élution des extraits de tournesol obtenu par chromatographie d'exclusion moléculaire sur G-75 a montré profil caractérisé par une protéase de 2 pics dont le premier est doué d'une forte activité enzymatique soit 83% de l'activité totale. Ainsi, la détermination du poids moléculaire dans les extraits concernera cette fraction. La mesure a été réalisée partir d'une élution de trois protéines standards dans les mêmes conditions que l'échantillon avec des protéines marqueurs de poids moléculaire connus à savoir la BSA, la Trypsine et le Lactalbumine. L'élution est réalisée avec une solution tampon acétate de sodium de 0,1M et pH 5,2 et le profil d'élution des protéines standards obtenu par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75 est réalisé avec un dépôt de 0,7 ml (**Figure 19**).

D'après la courbe d'étalonnage $\text{Log PM} = f(\text{volume d'élution})$ obtenu avec les protéines marqueurs (**Annexe5**), le poids moléculaire du notre protéase est de 48 K Da (**Tableau 10**).

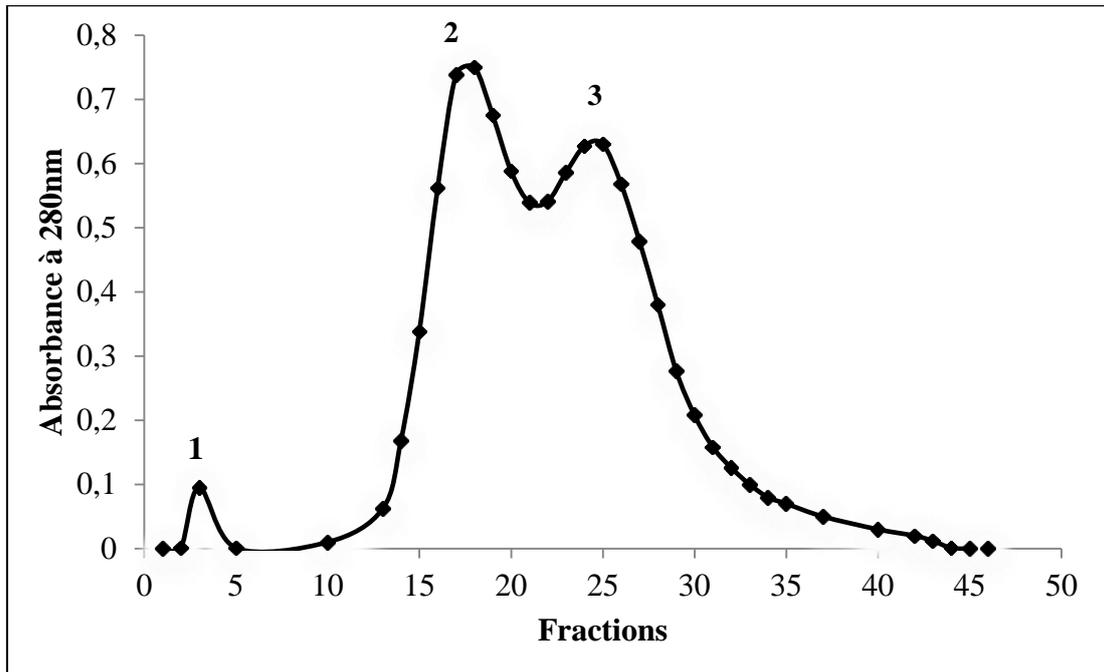


Figure 19 : Profil d'élution sur Sephadex G-75 des protéines standards. (Colonne analytique *Spectra Chrom* (1 × 30 cm), tampon d'élution acétate (0,1M ; pH 5,2), débit : 18ml/h, fraction de 1ml). (1 : BSA, 2: Tyrosine, 3: Lactalbumine)

Tableau 10: Détermination du poids moléculaire de la fraction active (**Protéase de Tournesol**)

Protéines	Volume d'élution (ml)	Log PM	Poids moléculaire (K Da)
BSA	3	4,82	67
Trypsine	18	4,37	23.8
Lactalbumine	25	4,25	18
Protéase NT3 de tournesol	6.81	4,68	48

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par littérature ou les protéases d'origine végétales sont caractérisées par des PM élevés. (Lopiero et al. 2011. Beka, 2014. Nasr, 2016).

4.7. Electrophorèse SDS-PAGE

La fraction active récupérée après purification sur gel filtration a été soumise à une Electrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE), les résultats sont indiqués dans la **figure**

20

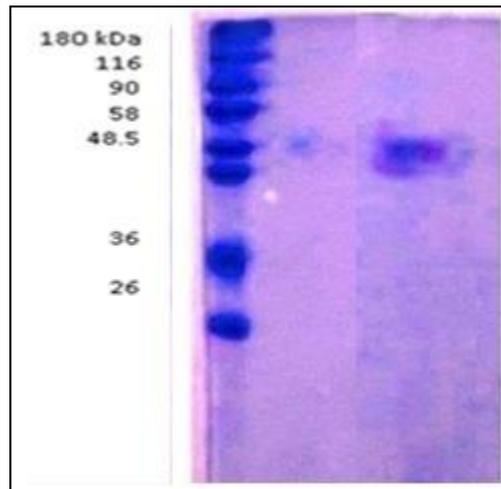


Figure 20 : Profil électrophorétique de la fraction active de l'enzyme végétale récupérée d'une gel filtration ;Marqueur utilisés : (Alpha 2 macroglobuline from equine serum : 180 kDa ; β -galactosidase from E.Coli : 116 kDa ; Lactoferrin from humain milk : 90 kDa ; Pyruvate kinase (rabbit muscle) : 58 kDa ; Fumarase (porcine heart) 48.5 kDa ; Lactic déhydrogénase (rabbit muscle) 36.5 kDa ; Triosephosphate isomérase 26 kDa)

L'analyse électrophorétique a montré une bande protéiques de 48.28 Kda,un PM très proche des résultats apportés par **Nars et al 2016** qui abordent la protéase de la même espèce étudiée (*Helianthus annuus*). Généralement les agents coagulant d'origine végétale ont généralement des PM supérieurs a 45 kDa (**Beka , 2011**) était bien confirmé par nos résultats sur l'extrait de tournesol.

4.8. La séquence des acides aminés de la protéase NT3 de tourteaux de tournesol

L'étude de la séquence en acides de la protéase de tournesol (**Figure 21**) dénommée par le logiciel Scaffold 2.0 et l'analyse des similitudes des protéines avec une probabilité d'identification supérieure à 95%, fait apparaitre un poids moléculaire de 51 k Da pour une séquence de 476 acides aminés (**Tableau 11**).

Le poids moléculaire des protéases d'origine végétale est à l'origine plus important que celui des succédanés d'origine animale ou fongique.

T I D T G T N F F I A P S S F A E K V V K A A L P D A T E S Q Q G Y T V P C S K Y Q D S K T T F S L
A A Y P D N T A M E A E Y G D T Y N T V Q Q G Y T V P C S K Y Q D S K T T F S L Q Q T L A Y V D N V
L L F D T G S S D T W V P H K G C D N S E G C V G K R F F D P S S S S T F K E T D Y N L N I T Y G T
G G A N G I Y F R D S I T V G G A T V K Q Q T L A Y V D N V S G P T A E Q S P D S E L F L D G M F G
A A Y P D N T A M E A E Y G D T Y N T V H V N L Y K Q G L I S S P V F S V Y M N T N D G G G Q V V F
G G A N N T L L G G D I Q Y T D V L K S R G G Y F F W D A P V T G V K I D G A D A V S F D G A Q A F
T I D T G T N F F I A P S S F A E K V V K A A L P D A T E S H V N L Y K Q G L I S S P V F S V Y M N
V L Q K S G S S S D T I D V S V P I S K M L L P V D K S G E T C M F I V L P D G G N Q F I V G N L F
L R F F V N V Y D F G K N R I G F A P L A S G Y E N N L Y D G L Y E E Y A I P V S I G T P G Q D F Y
K H G Q Q A A E K L G G I K A F A E G D G S V D T P

Figure 21 : La séquence en acides aminés de la protéase NT3 extraite de tourteau de tournesol

Tableau 11: La séquence en acides aminés de la protéase coagulante purifiée de Tourteau de tournesol et pourcentage de résidus d'acides aminés et le poids moléculaire.

Acides aminés	Nombre de résidus	Résidus A.A (%)	Masse mono-isotopique (Da)
<i>Alanine</i>	36	7.5630	2557,33632
<i>Valine</i>	38	7.9831	3764,59996
<i>Leucine</i>	28	5.8823	3166,35396
<i>Isoleucine</i>	19	3.9915	2148,59733
<i>Proline</i>	22	4.6218	2135,16094
<i>Méthionine</i>	7	1.4705	917,28343
<i>Phénylalanine</i>	31	6.5126	4559,12102
<i>Tryptophane</i>	2	0.4201	372,15864
<i>Glycine</i>	49	10.2941	2794,05203
<i>Serine</i>	40	8.4033	3481,2812
<i>Thréonine</i>	40	8.4033	4041,9072
<i>Cystéine</i>	5	1.0504	515,04595
<i>Tyrosine</i>	27	5.6722	4402,70991
<i>Asparagine</i>	25	5.2521	2851,07325
<i>Glutamine</i>	21	4.4117	2689,23018
<i>Ac. aspartique</i>	36	7.5630	4140,9702
<i>Ac. glutamique</i>	18	3.7815	2322,7668
<i>Lysine</i>	23	4.8331	2946,18431
<i>Arginine</i>	5	1.0504	780,5056
<i>Histidine</i>	4	0.8403	548,23564
Total	476	100	51134,57387

Conclusion

L'objectif de notre étude est de contribuer à une meilleure connaissance d'une protéase coagulant le lait, issue de tourteau de Tournesol. Quatre volets principaux ont été examinés, l'extraction de l'enzyme brut de tourteaux de tournesol, sa purification et sa caractérisation, l'étude de l'effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique et en fin détermination de poids moléculaires et séquençage des acides aminés. La purification de la protéase produite a été réalisée par précipitation par le sulfate d'ammonium à 20 puis à 65 % de saturation suivie d'une dialyse contre de l'eau distillée. La purification de l'extrait enzymatique pré purifié par la colonne échangeuse de cations (la CM-50) a permis d'éluer une fraction active à une concentration de 0,27M en chlorure de sodium dans le tampon d'élution. Au cours de cette étape, nous avons enregistré un meilleur facteur de purification de l'ordre de 17,12 par rapport à la technique d'exclusion moléculaire (8,49), avec un rendement en activité de 35,15 %. Par ailleurs, la chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75 de la fraction active issue de la chromatographie d'échange de cations a permis de révéler deux pics dont le 1^{er} est doué d'une forte activité coagulante de l'ordre 0.0012 UP.

En outre, le troisième volet principal est l'étude de l'effet des inhibiteurs sur l'activité de coagulation du lait. La protéase a montré la sensibilité de l'enzyme à un inhibiteur de protéase à cystéine (iodoacétamide), un inhibiteur métalloprotéase (EDTA) et les inhibiteurs métalliques (Ca, Fe, Zn, Cu, et Mg).cette sensibilité était plus prononcée envers la Pepstatine-A qui a réussi à supprimer la quasi-totalité de la l'activité coagulante de l'enzyme prononçant ainsi, une présence d'une Aspartyl protéase dans notre agent coagulant.

La masse moléculaire obtenue a partir de la séquence en acides aminés de la protéase NT3 obtenue est d'environ 51 kDa et diffère très peu de celui obtenu avec le gel filtration soit 48 kDa soit une différence de 3 kDa.

Références bibliographiques

- Abd el-fattah A.F. and El-hawwary N.M. (1974)**. Studies on the production of milk clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi, *J. Gen. Microbiol.* 84, 327–331.
- Ahmed I. A. M., Morishima, I., Babiker, E. E. and Mori N. (2009)**. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds, *Food Chem.*, 116, 395–400.
- Anusha R., Singh M. K. and Bindhu O. S. (2014)**. Characterization of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein, *Eur. Food Res. Technol.* 238: 997–1006.
- Barbosa M. (1983)**. Cardo (*Cynara cardunculus*) as vegetable rennet. Report of the departement of technologie for the food industry (D.T.I.A).5. comunicacões E conferencias-45. Lab. of Engineeri. and Indus, *Tech.(LNETI)*, Lisbon, Portugal. 16p.
- Beka R.G. (2011)**. Une alternative végétale en fromagerie :Préparation d'un extrait coagulant à partir des fruits de *Balanites aegyptiaca*; Etude biochimique et application technologique. Lab. des Procédés Bio. , *Génie Enzym.et Microb.*,Lille,France.35p.
- Beka R.G, Krier F., Magali B. , Valentin D. Guiama B, Pauline D. ,David G., Carl M., Krasimir A., Slomianny M.C. Guillochon D., and Dominique V.M.(2014)**. Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. *Inter. Dairy J.*, 34, 25-31
- **Bencini R. (2002)**. Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *J. of the Sc. of Food and Agricult.*, 82, 705–719.
- Berridge N. J. (1952)**. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin, *J. of Dairy Res.*, 9, 328–329.
- **Brule G.,Lenoir J. and Remeuf F. (1997)**. La micelle de caséine et la coagulation du lait, *In Le Fromage*, (Eck A., Gillis J.C. (Eds.), Lavoisier *Tec & Doc*, Paris, pp. 7-41.
- Bruno M. A., Pardo M. F., Caffini N. O. and Lopez L M.I. (2002)**. Purification of a New Endopeptidase Isolated from Fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21 (1): 51-6.
- Bruno M. A., Lazza C.M., Errasti M.E., Lopez L.M.I., Caffini N.O. and Pardo M.F. (2010)**. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT- Food Sc. and Tech.*, 43: 695-701.
- Chazarra S., Sidrach I., Lopez-Molina D. and Rodriguez-Lopez J.N.(2007)**. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *Inter. Dairy J.l*, (17) 1393–1400.
- **Christen C. and Virasoro E. (1935)**. Présures végétales, extraction et propriétés, *Le lait*, vol. 15, p.p. 355-358.

- **Eck A. (1990)**. Le fromage, Ed *Tech. et Doc.* Lavoisier (2ème édition).539 p. vie
- Egito A.S, Girardet J.M, Laguna L.E, Poirson C, Molle D, Miclo L, Humbert G. and Gaillard J.L. (2007)**. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein, *Inter. Dairy J.* 17, 816–825.
- **Federici F. (1982)**. Comparative study of some properties of a new milk coagulating enzyme and two commercial rennets. In: *Utilisation enzym. en techno. Alim. Ed., P. Dupuy, Tech. doc. Lavoisier* p. 281-286.p.555.
- Garnot P., and Martin P. (1980)**. La présure, composition, activité, son rôle en fromagerie. La tech. laitière, vol.930, n.3, p.p.27-30.
- **Heimgartner U., Pietrzak M., Geertsen R., Brodelius P., Figueiredo A.C. and Pais M.S.S. (1990)**. Purification and partial characterization of milk-clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochem.*, **29**:1405–10.
- Isam A., Elfadil Babiker E. and Nobuhiro M. (2010)**. pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *Food Sc. and Tech.*, **43**, 759-764.
- **Iwasaki S., Arima K., Yu J.(1970)**. Milk clotting enzymes from *Mucor pusillus* va.Lindt. In: Perlmann G, Lorand L, editors. *Meth. in Enzymo.*, vol.19. New York: Academic Press; 1970.p.446-59.
- Granday P.,Foras T. (1978)**.Deretmination of enzymatic activity of clotting enzyme of animal origin;Studies of different technics,*Tech. of milk*,395-8949
- Gupta C. B. and Eskin A. M. (1977)**. Potential use of vegetable rennet in the production of cheese. *Food Tech.-Chicago*, **5**, 62-65.
- Kumari M., Sharma A. and Jagannadham M.V. (2012)**. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chem.*, **131**: 1295–1303.
- **Laemmlli U.K. (1970)**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-5.
- **Lagaude A., Fernandez L, Cuq J.L. and Marchesseau S. (2004)**. Characterization of curd formation during the rennet coagulation of milk by an optical microscopic method. *Inter. Dairy J.*, **14**, 1033–1039.
- **Laurent J. (1974)**. Conservation des produits d'origine animale en pays chauds, *Presses universitaires de France*. 154p.
- Llorente B.E., Brutti C.B., and Caffini N.O.(2004)** Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52 (26): 8182-8189.

- **Lo piero A.R., Petrone G. and Puglisi I. (2002).**Characterization of « lettucine », a serine_ like prottease from *lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk-clotting, *J. Agri.and Food Chemi.*, vol. 50, n. 8, 2439-2443.
- **Lowry O.M., Rosebrough N.J., Farr, A.L. and Randall R.J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. of Biol. Chem.*. 193, 265-275.
- Mazorra-Manzano Miguel A., Teresa C. Perea G. , María E., Lugo S., Merheb C. W., Hamilton C., Eleni G. and Da-silva R. (2013).**Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein, *Food Chem.* 104, 127–131.
- Murado Ma, Siso Mi, Gonzalez Mp, Pintado Dj. (1993).** Characterization of microbial biomasses and amyolytic preparations obtained from mussel processing waste treatment, *Bioresour. Tech.* **43**:117-125
- Nadaroglu H. and Nazan D. (2012).** Purification and characterization of a novel protease compositain from compositae (*Scorzonera hispanica L.*), *Eur. Food Res. Tech.***234**:945-953
- **Najera A.I., Renobales M., and Barron L. J. R. (2003).** Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: A multifactorial study, *Food Chem.*, **80**: 345–352.
- **Nasr A.M., Isam A. Mohamed A. and Omer I. A. (2016).** Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds , *Food sc. and nutri. By Wiley Periodicals, Inc.*
- **Nouani A (2009).** Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait. Thèse de doctorat en sciences agronomiques, ENSA (El harrach, Alger).
- **Nouani A., Belhamiche N., Slamani R., Belbraouet S.,Bellal M.M. (2009).**Extracellular protéase from *mucor pusillus* : purification and characterization,*Inter. of Dairy tech.*, Vol. 62, p 1112-1117.
- **Park H., Yamanaka N., Mikkonen A., Kusakabe I. and Kobayashi H. (2000).** Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds, *Biosc. Biotech.*
- **Raposo S.A. and Domingos A. (2008).** Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures, *Process Biochem.***43**, 139–144.
- Shieh C.J., Phan Thi L.A. and Shih I.L.(2009).**Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis natto*, *Biochem. Engineering J.* **43**, 85
- Sidrach L., Garcia-Canovas F., Tudela J. and Neptuno Rodriguez-Lopez J. (2005).** Purification of Cynarase from artichoke (*Cynara scolymus*) enzymatic properties of Cynarase A, *Photochemistry*, vol. 66, p.p. 41-49.
- Silva S.V. and Malcata F.X. (2002).**Comparative catalytic action of two microbiological proteinases upon caprine caseins in solution, *Food Chem.*, Vol. 71, p.p. 207-214.

-**Soxhlet F. (1877)**. Die Darstellung haltbarer Labflussigkeiten. Milch-Ztg 6, 497–501.
Stadhouders (J.) Et Veringa (H. A.), *Netherl. Milk Dairy J.* 21, 1967, 192.

-**Tsouli, J. (1979)**. Etude d'une protéase coagulante extraite de *Cynara scolymus* et de *Cynara cardunculu*, adaptation à la méthode conductimétrique pour la détermination du temps de coagulation du lait et le contrôle des fabrications, *Thèse de doctorat, C. Bernard*. Lyon, 62p.

-**Walde P., Luisi P.L. and Palmieros S., (1984)**. Activité protéolytique des graines de tournesol.
J. of agricult. food chem., vol.32, n.2, p.p.322-329.

Chapitre II : Propriétés biochimiques d'une protéase produite par la Souche *Bacillus mojavensis* P47M isolée du sol d'une laiterie

1. Résumé

Une souche P47M qui produit une protéase coagulant le lait isolée du sol d'une laiterie a été identifiée comme *Bacillus mojavensis* en fonction de la morphologie et de la séquence d'entretoise de transcription interne. L'analyse phylogénétique et séquentielle du gène rADN 16S a montré une identité à 100% de la souche testée avec *B. mojavensis* dans la base de données (GenBank KY694978.1).Après avoir optimisé trois paramètres de fermentation(à savoir la température, l'agitation et le milieu de base) selon un plan factoriel complet, cette souche a produit une bonne protéase extracellulaire active qui est purifiée par purification partielle avec fractionnement avec du sulfate d'ammonium (40-80% de saturation) suivie d'une chromatographie d'exclusion moléculaire qui a révélé la présence d'un seul pic actif de 31 kDa et une bande monomère de 29 kDa a été révélée Par SDS-PAGE. L'activité optimale a été observée à pH 6,0, 70 ° C et 0,05 M de CaCl₂. L'enzyme de coagulation s'est avérée être une métalloprotéase par inhibition de l'EDTA. En outre, selon le rapport AC / AP (Activité coagulante / activité protéolytique) de l'ordre de 164 et ses propriétés distinctives, la protéase P47M pourrait être une contribution utile à l'industrie fromagère

2. Introduction

Dans la technologie laitière, différentes enzymes coagulants le lait issues d'animaux, de plantes et de micro-organismes ont été suggérées comme substituts de la présure de veau (Nouani et al., 2009; Guiana et al., 2010;)

De nombreux agents coagulants le lait d'origine microbienne ont été étudiés au cours des dernières années et la sélection de nouveaux micro-organismes pour la production d'enzymes augmente dans le monde entier. Cependant, on sait que la présure de veau est depuis longtemps la source traditionnelle de protéases pour la fabrication du fromage, mais sa production diminue dans le monde entier avec l'augmentation de la consommation de fromage (Cavalcanti et al., 2005, 2009). De plus, des études récentes sur les protéases microbiennes ont été publiées, ce qui témoigne de l'intérêt suscité par les protéases à base de micro-organismes (champignons et bactéries) (He et al., 2011; Silva et al., 2014, Yang et al., 2012, Lemes et al., 2016 ; Kumari Narwal et al. , 2016)

D'autre part, la plupart des travaux de recherche sur la production succédanés de présure se sont concentrés sur la fermentation par des champignons, tels que *Mucor miehei*, *Rhizomucorpusillusvar* et *Aspergillus oryzae* ou des bactéries telles que le genre *Bacillus* (Ayhan et al., 2001), Ding et al. al., 2011). Ainsi, certaines bactéries, comme *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* et *Enterococcus faecalis*, ont été suggérées comme substituts potentiels de la présure (Dutt et al., 2008) et des essais plus poussés de purification et une compréhension plus approfondie des mécanismes biochimiques de ces enzymes sont devenus le centre d'intérêt des chercheurs.

Les microorganismes utilisent divers substrats comme source d'éléments nutritifs pour la croissance et les activités métaboliques. Dans le cas de la fermentation immergée, le microorganisme sécrète les enzymes nécessaires à la dégradation des molécules de substrat disponibles afin de répondre à leurs besoins nutritionnels. Ces procédés sont généralement plus simples et peuvent utiliser des déchets ou des substrats agro-industriels tels que le tourteau de soja dégraissé, le son de blé, le son de riz, les déchets de banane, etc., pour la production d'enzymes (Rajagopalan et Krishnan, 2009).

Il est bien connu que cette méthode a été appliquée avec succès dans de nombreux domaines de la biotechnologie, comme la production d'enzymes de coagulation du lait (Talantikite et al., 2012)

Dans le cas contraire, la méthodologie employant la surface de réponse (MSR) est en fait utilisée pour expliquer les effets combinés de tous les facteurs dans un processus de fermentation.

En considérant les nombreuses applications industrielles de la protéase (Moses et al., 1991), nous rapportons dans la présente étude l'optimisation de la production de protease extracellulaire de la coagulation du lait de *Bacillus mojaensis* P47M en raison des effets interactifs de trois variables (milieu de base, température et agitation) en utilisant la méthodologie de la surface de réponse sous fermentation submergée. Il est bien connu que les composants de milieu de fermentation influencent grandement la production extracellulaire de protéases. Ainsi, le son de blé et les graines de tournesol dégraissées (tourteaux de tournesol) ont été utilisés comme une base de substrat. Auparavant, nous avons étudié la méthode d'isolement et d'identification des souches de *Bacillus* en utilisant la séquence d'ADNr 16S.

3. Matériel et méthodes

3.1. Microorganisme, conditions de culture et méthode d'isolement :

Cinquante grammes d'échantillons de sol ont été recueillis près d'une usine de production laitière dans la région de Boumerdès (au nord de l'Algérie à environ 50 km à l'est d'Alger avec des coordonnées de 36 ° 45'37.23 "N 3 ° 28'20.52" E). Une petite quantité de sol a été homogénéisée sous agitation magnétique pendant 20 min avec 90 ml d'eau physiologique stérile de pour une dilution initiale (10^{-1}). Nous avons effectué des dilutions en série pour chaque échantillon et 0,1 ml de la dilution appropriée à 10^{-9} a été étalé sur un milieu d'agar de comptage de plaques (PCA) contenant 2% (p / v) d'agent antifongique d'actidione pour prévenir la croissance fongique et 12% (p / v) de lait écrémé stérile en poudre (**Annexe 6**). Les plaques ont été incubées à 30°C pendant 48 h pour l'énumération de la protéase coagulant le lait produisant une souche caséolytique par la présence d'un halogène clair autour de la colonie. Les colonies ayant des différences de morphologies distinctes telles que la couleur (technique de Gram), la forme et la taille ont été sélectionnées et purifiées par rayures en utilisant le même milieu. Le pouvoir coagulant de Tous les isolats a été vérifié et examiné au microscope avant les préparations du stock. Les isolats bactériens Gram positifs identifiés comme Bacillus ont été purifiés et les souches sélectionnées montrant une activité coagulante ont été maintenues par conservation sur gélose.

3.2. Identification de la souche P47M :

La procédure d'identification des souches a été développée dans nos travaux antérieurs. En bref, la macroscopie et la microscopie ont été réalisées sur des boîtes de Petri avec des plaques de l'agar de comptage (PCA) sur des colonies de 24h. Pour l'analyse de séquençage, l'ADN génomique a été extrait de la souche par la méthode standard d'alcool isoamylique au chloroforme en utilisant un kit de réactif PrepMan ultra-échantillon (Applied Biosystems, Thermo Fischer scientific, France) et purifié sur des plaques NucleoFast (Macherey Nagel). L'amplification de l'ADNr 16S a été réalisée par une technique de PCR, en utilisant de l'ADN polymérase Taq, l'ADN génomique en tant que modèle et 3 amorces universelles avant et 5 inverse. Les séquences de ces amorces utilisées sont les suivantes: F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), R1 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), F2 (5'-CTCCTACGGGAGGCAG-3') et R2 (5'-GACACGAGCTGACGACA-3'). Les produits de PCR ont été séquencés par la technique de Sanger dans les conditions optimisées par Geno-screen (Geno-screen Campus de l'Institut Pasteur de Lille 1, rue du Professeur Calmette - 59000 Lille - France. Après, en recevant les résultats du séquençage, la séquence de nucléotides du 16S rDNA (Séquence de 915 pb) de la souche ont été déposés dans GenBank

et alignés sur les séquences d'ADNr 16S disponibles dans les bases de données publiques du Centre National d'Information sur la Biotechnologie (NCBI) (Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), et la base de données LeBibi (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>) en utilisant le logiciel BLAST (Basic alignment search tool).

3.3. Production de protéase par fermentation en fiole, composition du milieu de culture et inoculum :

Selon **Rao et Mathur (1979)**, le milieu de base (pH 6,8) utilisé pour la production de protéase coagulant le lait, contient (g.l-1): son de blé (50), extrait de levure (3), glucose (4), caséine (2) et Na₂HPO₄ (3). Ce milieu (50 ml) est placé dans un Erlenmeyer de 250 ml et inoculé avec 10⁷ à 5.10⁸ bactéries par millilitre (Mac Farland 3) et incubé à 32 ° C sur un agitateur rotatif avec agitation (180 tr / min) pendant 24 h dans un Réchauffeur de commande IKA® KS 4000i. Après incubation, le bouillon de culture a été filtré puis centrifugé (Jouan GR 422) à 13 000 g, 4 ° C pendant 20 min. Le rendement total en protéase et l'activité coagulante ont été déterminés dans le surnageant. La souche qui présentait l'activité de coagulation la plus élevée et l'activité protéolytique la plus faible a été sélectionnée et identifiée en utilisant le séquençage de l'ADNr 16S. La souche sélectionnée s'appelle P47M.

3.4.Optimisation des paramètres de fermentation de *Bacillus mojavensis*

Procédures analytiques :

A fin d'avoir une meilleure activité coagulante de l'extrait enzymatique de la bactérie, nous avons procédé a une optimisation de son milieu de culture (**Cf. sous chapitre Optimisation des paramètres de fermentation par la méthode de surface des réponses**)

3.5. Procédures analytiques

3.5.1. Activité coagulante :

L'activité coagulante(MCA) a été mesurée selon le protocole décrit par **Shieh et al. (2009)** Avec de légères modifications. La poudre de lait écrémé a été reconstituée en dissolvant 12,5 g dans 100 ml de 0,5 g / l de solution de CaCl₂ (pH 6,5) (substrat de Berridge).

L'analyse de coagulation a été effectuée en mélangeant 10 ml de substrat a 1 ml d'extrait enzymatique. Elle est basée sur l'évaluation visuelle de l'apparition des premiers flocons.L'activité coagulante est exprimée en terme d'unité de Soxhlet (SU). 1SU est défini comme étant la quantité d'enzyme coagulant 1 ml d'une solution contenant 0.12g de poudre de lait écrémé et 0.11g CaCl₂ en 40 minutes à 35 ° C. L'activité coagulante a été calculée en

utilisant la formule suivante: $SU = 2400 \times 10 \times D / T$; T = temps (s) de coagulation ; D=dilution de l'extrait brut.

3.5.2. Activité protéolytique :

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode rapportée par **Silva et al (2014)** et **Shieh et al (2009)**. Le mélange réactionnel est composé de 0,4 ml de caséine à 0,5% (Sigma) (p / v) dans de l'eau distillée, 0,4 ml de tampon acétate 0,2 mol / L à pH 5,5 et 0,2 ml de l'enzyme brute. La réaction s'est produite dans un bain à 35 ° C et, au bout de 30 min, la réaction a été arrêtée en ajoutant 1 ml d'acide trichloracétique à 10% (TCA). 2 ml du filtrat ont été ajoutés à 5 ml de solution de NaOH (0,28 N) et 1,5 ml de réactif phénolique (solution de Folin-Ciocalteu phénol: eau = 1: 2). Après avoir maintenu le mélange à 35 ° C pendant 15 min, on a mesuré la densité optique (OD) à 660 nm. L'activité protéolytique a été exprimée en unités correspondant à DO de 660nm (Spectrophotomètre UV-Visible, modèle V560, Shimadzu, Japon).Le rapport (R) a été déterminé en divisant l'activité coagulante par l'activité protéolytique, par la Formule : $R = MCA (SU) / PA (POD_{660nm})$.

3.5.3. Dosage des protéines :

La concentration en protéines a été déterminée par la méthode **de Lowry et al. (1951)** en utilisant le Sérum albumine bovine comme standards.

3.6. Purification partielle par fractionnement au sulfate d'ammonium de l'extrait enzymatique brut :

L'enzyme coagulant le lait dans l'extrait brut a été précipitée entre 40-80% de saturation de $(NH_4)_2SO_4$. Le précipité obtenu après centrifugation à 10 000 g à 4 ° C pendant 20 min a été mis en suspension dans du tampon acétate (0,01 M, pH 5,5) et dialysé pendant une nuit contre des changements répétés du même tampon

3.7. Chromatographie d'exclusion moléculaire :

L'extrait concentré a été chargé sur une colonne de Sephadex G-75 (30 cm x 1,5 cm) pré-équilibrée avec du tampon acétate (0,01 M, pH 5,5). Des fractions enzymatiques de 1,5 ml ont été éluées à un débit de 36 ml / h avec le même tampon et ont été analysées pour déterminer l'activité enzymatique et la teneur en protéines. Les fractions enzymatiques actives ont été regroupées et lyophilisées pour des études ultérieures.

3.8. Détermination du poids moléculaire :

Le poids moléculaire de la protéase de *B. mojavensis* a été déterminé après purification de la fraction active sur Sephadex G-75. La colonne a été calibrée avec un mélange de protéines standard de masse moléculaire connue comprenant la γ -globuline (158 kDa), la BSA (67 kDa) et la trypsine (23,8 kDa).

3.9. Electrophorèse PAGE-SDS :

La fraction active obtenue à partir d'une gel filtration a été congelée et lyophilisée pour une électrophorèse selon **Laemmli (1970)** afin de vérifier l'homogénéité et la pureté de l'enzyme. Les différents échantillons et marqueurs, sont séparés sur un gel de polyacrylamide formé par un gel de séparation à 12% et un gel de concentration à 5%. La migration électrophorétique est obtenue grâce à un système d'électrophorèse 'Max Fill Bioblock Scientific'. Le kit de protéines marqueurs de poids moléculaire (26-180 kDa) a été utilisé à des fins de comparaison.

3.10. Effet des inhibiteurs :

Selon les méthodes rapportées par **He et al. (2011)** et **Majumder et al. (2015)**, différents inhibiteurs de protéase, incluant notamment un inhibiteur de la métalloprotéase (acide éthylène-diaminetétracétique (EDTA) à 5 mM, un inhibiteur de protéase aspartique (pepstatine A à 10 μ M et 20 μ M et 2- mercaptoéthanol à 5 mM ont été ajoutés séparément à l'enzyme purifiée. Par la suite, les activités coagulantes résiduelles ont été déterminées en fonction de l'activité enzymatique sans inhibiteurs.

3.11. Propriétés biochimiques de l'enzyme purifiée

3.11.1. pH et température optimales

La température optimale déterminée dans la fraction purifiée obtenue par Chromatographie d'exclusion moléculaire a été étudiée à pH 6,3 de substrat de lait écrémé dans la gamme de 30-80 ° C.

L'effet du pH sur l'enzyme de coagulant le lait exprimé en activité relative (%) a été déterminé en ajoutant 0,75 ml de solutions tampons adéquates au lait écrémé pour rendre le substrat à une fourchette de pH qui va de 5 à 8.

3.11.2. Effet de la concentration de CaCl₂ sur la coagulation du lait

L'effet de la concentration de CaCl_2 sur la coagulation du lait a été déterminé en utilisant des concentrations croissantes de la solution de chlorure de calcium (0.005M, 0.01M, 0.02M, 0.03M, 0.04M et 0.05M).

3.11.3. Effet de la concentration de l'enzyme

La concentration optimale de l'extrait purifié a été déterminée par le temps le plus court d'une observation d'une coagulation du lait avec des concentrations de 0,2 à 0,4-0,6 à 0,8 et 1 mg / ml.

Dans les conditions expérimentales, le temps de prise du lait a été pris comme mesure de l'activité enzymatique (température à 35 ° C, concentration 0,01 M de CaCl_2 et concentration d'extrait enzymatique de 0,1 mg / mL). La présure microbienne commerciale (*Aspergillus niger* var. Awamori, CHR HANSEN-1300 IUMC / g) est utilisée comme référence.

4. Résultats et discussion

4.1. Identification de la souche

L'identification de la souche par le produit de PCR a été examiné par électrophorèse, purifié, puis séquencé par Geno-screen (Campus de l'Institut Pasteur de Lille, France). En plus de l'identification biochimique et morphologique, le gène rADN 16S a été amplifié avec succès à partir de l'ADN génomique de la souche P47M (figure 22). La base de données nucléotidiques a montré une homologie à 100% avec la souche de *B. mojavensis*. Par conséquent, notre souche a été désignée *B. Mojavensis* P47M avec le numéro d'accès (accession number) KY694978 et les bases de données nous ont permis d'élaborer un dendrogramme phylogénétique pour P47M et des souches apparentées (**Figure 22**).

4.2. Production d'enzyme coagulant le lait :

Nos résultats ont montré que le profil des activités enzymatiques produites par la souche de *Bacillus mojavensis* est intéressant dans la fermentation submergée et que le microorganisme a pu être cultivé et sécréter des enzymes coagulants le lait dans un court laps de temps (24 h). Après la fermentation suivie d'une centrifugation à froid, nous récupérons 60 ml d'extrait brut possédant une teneur en protéines de 11,14 mg / ml. Cette valeur est supérieure à celle obtenue pour *Bacillus subtilis* YB-3 sous fermentation submergée (**Li et al. 2012**), mais inférieure à celle observée chez *Bacillus subtilis* MTCC 10422 (**Kumari N et al. 2016**).

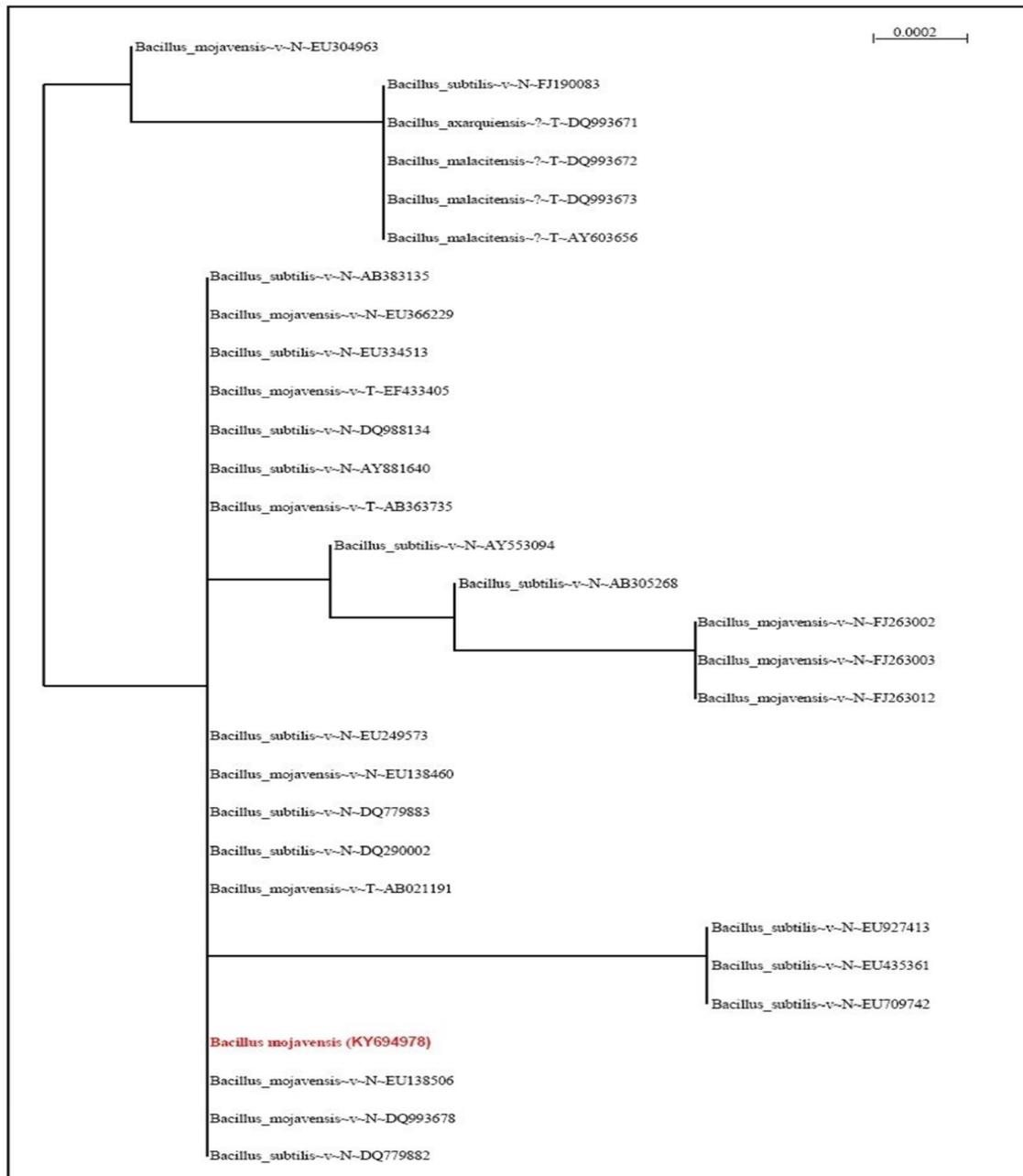


Figure 22: Arbre phylogénétique dérivé de l'analyse de la séquence d'ADNr 16S de la souche P47M et des séquences apparentées obtenues à partir de NCBI. Barre d'échelle. 0,001 substitutions par position nucléotidique. Le numéro d'accèsion de GenBank pour chaque souche suit le nom de l'espèce.

Il est évident que les protéases ont été obtenues selon différents paramètres de fermentation et peuvent présenter des résultats contradictoires. Le rapport de l'activité coagulante à l'activité protéolytique d'une enzyme est son indice d'adéquation pour être un succédané de la présure (Abdel-Fattah, A. et al. 1974). Aussi, l'AC obtenue est de 90 SU et une activité protéolytique de 0,547 soit un rapport AC/AP de 164. Ces résultats sont considérés comme très satisfaisant pour une enzyme à l'état brut et possédant le potentiel de remplacer la présure

traditionnelle dans l'industrie fromagère. **Majumder et al. (2015)** indiquent que les valeurs du rapport AC / AP de de la protéase de *Termitomyces Clypeatus* et celle obtenue à partir d'une préparation commerciale était considérablement similaire et pourrait être considérée comme un remplaçant à la chymosine. En revanche, la combinaison de la caséine avec le son de blé utilisé dans le milieu de culture comme agent améliorant pour l'enzyme coagulant semble efficace dans une courte période de fermentation (24h).

4.3. Purification enzymatique et masse moléculaire

La purification partielle de la protéase (extrait brut) a été effectuée par précipitation fractionnée avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 40 et 80% de solution saturée. Il est connu que cette méthode est un moyen efficace de produire des quantités substantielles de protéases actives (**Rajagopalan, et al. 2009**). En effet, nos résultats montrent que cette fraction récupérée avait une activité coagulante plus élevée, estimée à 88 SU. D'autre part, la teneur totale en protéines de l'extrait préalablement purifié est de 6,58 mg / ml équivalent à 38% des protéines précipitées du taux global de l'extrait brut. Ainsi, une purification partielle de l'enzyme, 59% de récupération a été obtenue par précipitation dans 40 à 80% d'ammonium saturé, et 41% de protéines non enzymatiques ont été éliminés avec un indice de purification de 1,65 fois et une récupération de 48,8% (**tableau 12**)

Tableau 12: Étapes de purification de l'enzyme coagulant le lait de *B. mojavensis* P47M

Etape de purification	Protéines totale (mg/ml)	Activité Totale(SU)	Activité spécifique (SU/MG)	Rendement (%)	Indice de purification
Extrait brut	668	5400	8.08	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40-80%)	197,4	2640	13.37	48.8	1.65
Gel filtration G75	5,94	830	139.8	15.4	17.3

Par ailleurs, une chromatographie d'exclusion moléculaire a été réalisée sur l'enzyme de *B. Mojavensis* P47M prépurifiée par le sulfate d'ammonium saturé à 40-80%. Le profil d'élution **Figure 23 (A)** a enregistré 3pics dont un seul était doué d'une activité coagulante. La fraction active a été élué avec un volume total d'environ 18 ml d'un tampon acétate à pH 5,5 à travers une colonne -Sephadex G-75. L'enzyme était encore purifié de 17,3 fois avec 15,4% de récupération. Les résultats de la procédure de purification sont résumés dans le **tableau 12**.

Un comportement similaire a été rapporté par **Ding et al. (2001)** avec une protéase de *B. amyloliquofaciens* et en accord avec l'enzyme de *B. sphaericus* rapportée par **He et al. (2011)**.

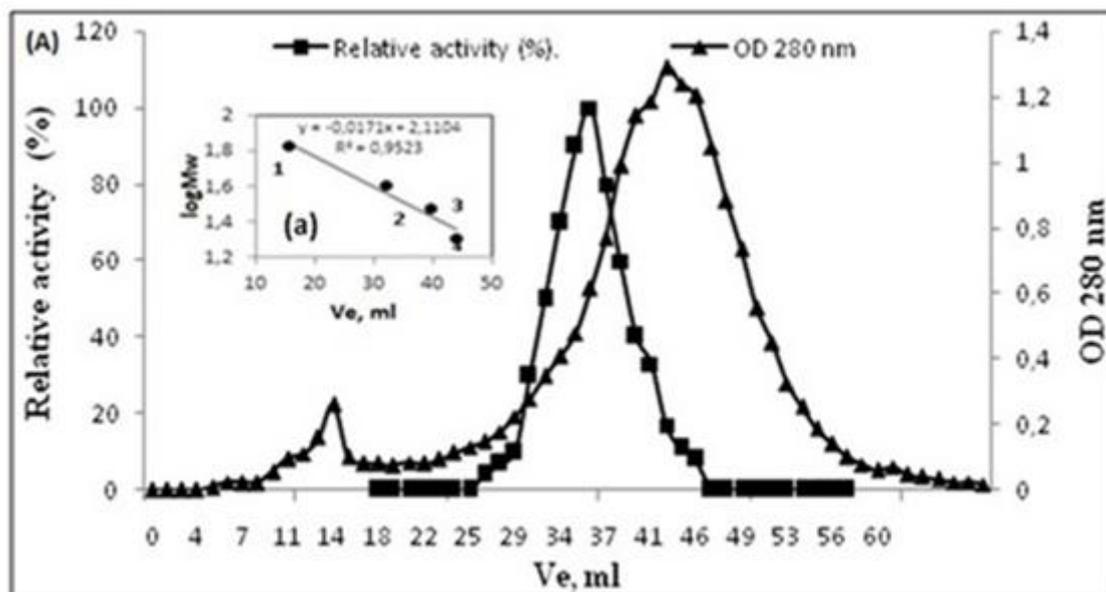


Figure 23 (A): profile d'élution sur Sephadex G-75 de l'extrait enzymatique de *Bacillus mojavensis* partiellement purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium à 40-80% de saturation (QTY 5 (1,5 × 30 cm), tampon d'élution Acétate (0,01 M, pH 5,5), débit : 36 ml/h, fraction de 1,2 ml).

A travers la chromatographie par filtration sur gel, le poids moléculaire de l'enzyme obtenu est d'environ 31 kDa (**Figure 23 (A)**). D'autre part, le profil électrophorétique montre que la fraction active étudiée apparaît comme une bande homogène après élution de la protéase purifiée doué d'activité protéolytique. Cette bande est suivie de deux bandes de masse moléculaire inférieure, mais la bande de 29 kDa s'est révélée la plus importante (**Figure 23 (B)**). Ces résultats confirment ceux obtenus par **Ageitos et al. (2007)** avec la souche de *B. licheniformis* USC13 qui montrent que la fraction active obtenue à partir d'une chromatographie sur gel est de 35 kDa et la SDS-PAGE a marqué une bande de 34 kDa. Avec le même protocole, **Kumari Narwal et al. (2016)** ont rapporté que la masse moléculaire de la fraction active de l'enzyme provenant de *Bacillus subtilis* MTCC 10422, purifiée par gel filtration suivie d'une électrophorèse était de 27 kDa, des résultats similaires de *B. pumilis* ont été rapportés par **Yasuda et al. (1999)** (monomère de 29 kDa). En outre, cette valeur est en accord avec ceux des protéases provenant d'espèces de *Bacillus* dont la gamme de poids moléculaire se situe entre 27-44 kDa (**Peng et al. 2005**). Auparavant, Comparé à d'autres enzymes de coagulant le lait, **Areces et al. (1992)** ont rapporté le poids moléculaire de la chymosine et de la pepsine bovine était de 35,65 et 33,37 kDa, respectivement, alors que des

valeurs entre 32,50 et 34 kDa ont été observées chez les protéases fongiques. En outre, le poids moléculaire de l'ordre de 62 kDa à 67 kDa a été rapporté pour la coagulase d'origine végétale (Liorente et al. 2004 ; Sidrach et al. 2005)

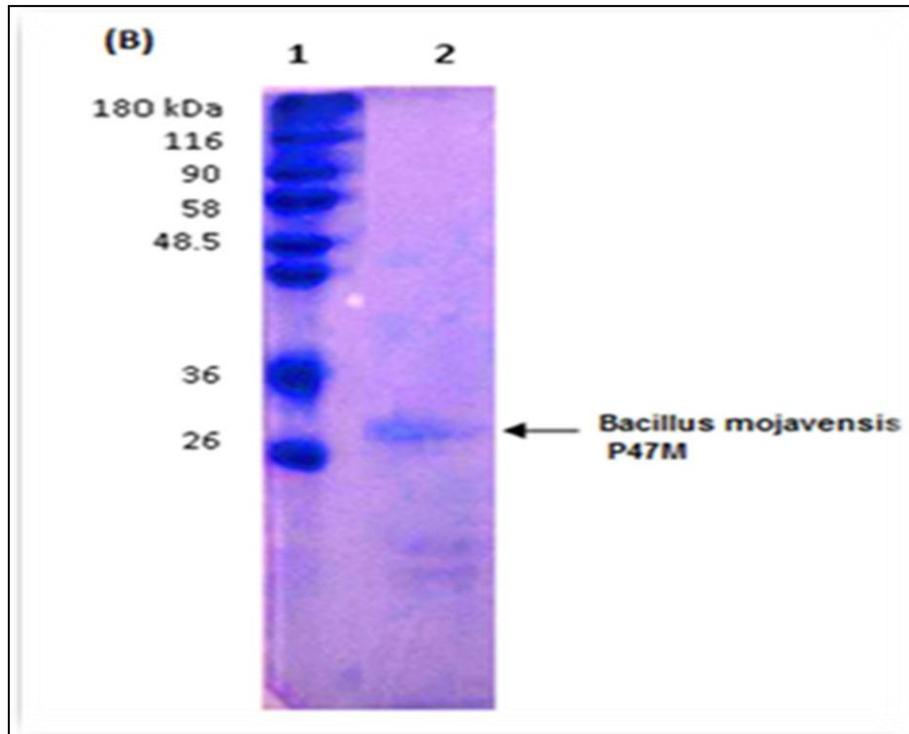


Figure 23(B) : Profil électrophorétique SDS-PAGE de l'enzyme purifiée de *Bacillus mojavensis* P47M

Ligne 1: marqueurs de poids moléculaire standard : 1: albumine de sérum de Bovin (67 kDa), 2: Ovalbumine (40 kDa), 3: anhydrase carbonique (30 kDa), 4: trypsine (23,8k Da)/ligne 2: la fraction active obtenue par purification par filtration sur gel (B).

Cependant, il est judicieux d'utiliser l'enzyme purifiée dans la fabrication du fromage que l'enzyme brute qui peut provoquer une coloration brune et odeur affectant la qualité du produit final et donc l'appréciation par le consommateur. En laboratoire, la production d'extrait brut par *B. mojavensis* P47M a été appliquée avec succès dans la préparation de fromage non affiné et un profil de texture similaire à celui observé avec le contrôle (Figure 24)

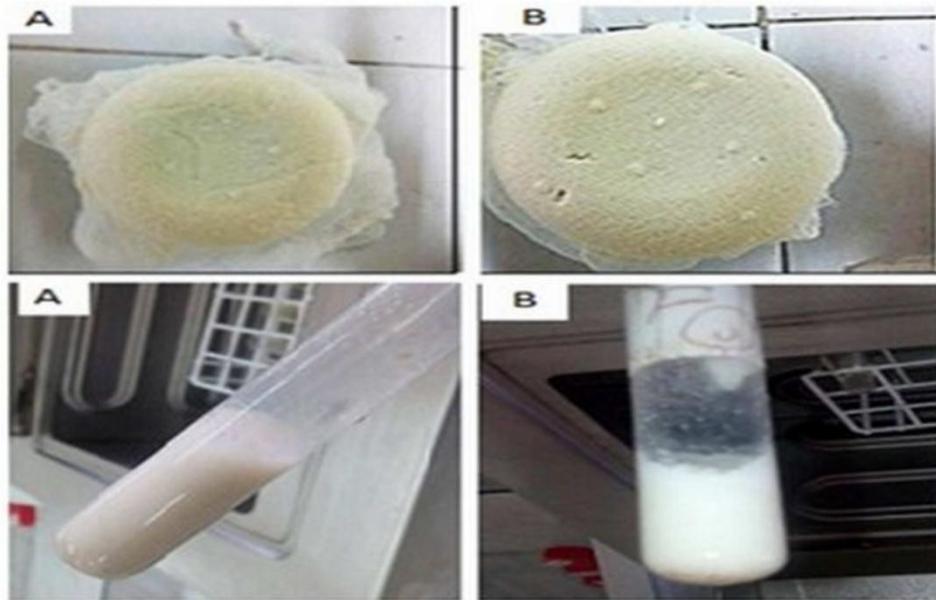


Figure 24: fromage frais et aspect de la coagulation du lait dans les tubes a essai produits par *Bacillus mojavensis* P47M (A) et la présure commerciale *Aspergillus niger* var. *Awamori* (B)

4.4. Effet des inhibiteurs

Le tableau 13 montre que l'extrait enzymatique brut a retenu environ 57% et 53% de l'activité de coagulant le lait en présence de Pepstatine A à 0,01 mM et 0,02 mM respectivement, tandis que le 2- mercaptoéthanol à 5 mM a réussi à supprimer jusqu'à 67% de l'activité enzymatique. Cependant, l'agent complexant EDTA à 5 mM a montré un effet apparent dans l'activité enzymatique et inhibait significativement l' AC en provoquant 100% d'inhibition. Ces résultats suggèrent la présence d'une métalloprotéase dans l'extrait enzymatique. Des résultats similaires ont été rapportés chez *B. amyloliquefaciens* D4 (He et al 2011) et *B. subtilis* YB3 (Li et al 2012) à 5 mM d'EDTA. D'autre part, d'autres études Kumar (2002) et Genckal (2006) ont montré que certaines proteases produites à partir de Bacillus sp. Appartient à la famille des serines protéases.

Tableau 13: Effet des inhibiteurs sur l'activité de la coagulation du lait (MCA) de l'extrait enzymatique de *B. mojavensis* P47M

Inhibiteur	Concentration (mM)	Activité résiduelle (%)
Controle	0	100
2-Mercaptoethanol	5	23
EDTA	5	0
Pepstatin A	0,01	53
Penstatin A	0,02	57

4.5. Propriétés de l'enzyme

4.5.1. Effets de la température et du pH

La figure 25 (A) et (B) a montré que l'augmentation de l'activité apparaît tout le long de la diminution du pH et était presque identique dans le cas de la présure et du *Bacillus mojavensis* P47M. Cependant, l'activité maximale a été observée à pH 5,5 pour la présure et pH 6,0 de *B. mojavensis* P47M, légèrement inférieure au pH du lait écrémé (pH 6,3). L'activité enzymatique a diminué à des valeurs de pH plus élevées et est devenue nulle à pH 7,5. La valeur du pH optimal (5,5 à 6,0) était semblable à celle rapportée pour les enzymes coagulant le lait de *B. subtilis natto* (Li et al. 2012. Schieh et al. 2009), et *B. amyloliquefaciens* D4(He et al. 2011). La cinétique de l'activité relative (%) a également été étudiée en fonction de la température du lait à pH 6,3.

L'AC est examiné dans la gradient de température de 30 à 85 ° C. L'activité optimale de la présure se situe à environ 55 ° C tandis que celle de *B. mojavensis* P47M a 70°C , différente avec la présure de veau active a une température optimale comprise entre 40 et 42 ° C. D'autre part, l'enzyme présente encore une bonne activité (80%) à 65 ° C indiquant une bonne stabilité dans le substrat (lait écrémé). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez les protéases d'origine microbienne qui montraient une température optimale plutôt élevée. En effet, des valeurs similaires ont été rapportées dans des travaux anciens et récents sur d'autres souches de *Bacillus* (Li et al. 2012 ; Ding et al 2001 ; Esawy , 2006)

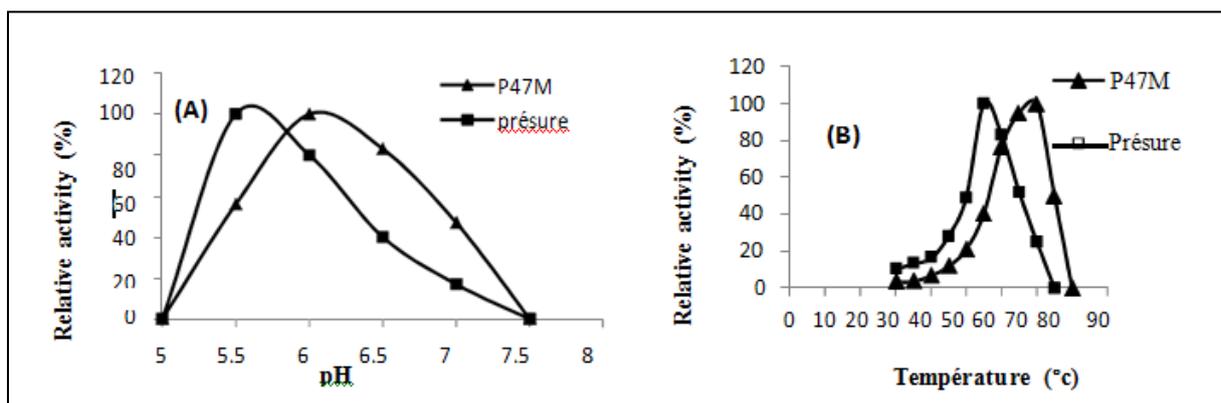


Figure 25(A-B): Effet de pH et de la température sur l'activité coagulante

4.5.2. Effet de la concentration en CaCl_2 sur l'activité de l'enzyme

Selon les travaux antérieurs rapportés dans la littérature, le calcium a une fonction importante sur l'agrégation de caséine au cours de la deuxième étape (non enzymatique) de la coagulation du lait et les concentrations habituellement utilisées dans la technologie de fabrication du

fromage sont comprises entre 0,01 et 0,02 M CaCl_2 . D'autre part, le temps de coagulation lors de l'addition de calcium varie en fonction de l'enzyme coagulant dans le lait écrémé (Kowalchyk et al. 1979)

En effet, la figure 25 (C) a montré que l'addition de calcium avait un effet positif sur l'activité du lait - enzyme. Le taux de coagulation a augmenté avec une concentration de 0,05 M pour les deux enzymes (présure et *B. mojavensis* P47M) et la saturation n'est pas observée dans ce travail. Ding (2001) a observé un phénomène similaire chez *B. subtilis* B1 et a montré que de faibles concentrations (0 à 0,05 M) de CaCl_2 favorisaient l'activité de la coagulation du lait alors que des concentrations élevées (> 0,05 M) de CaCl_2 entravaient l'AC. Certains travaux ont rapporté des résultats similaires de la souche de Bacillus telle que *B. sphaericus* (El-Bendary et al. 2007 et *B. subtilis* K-26 (Genckal et al. 2006 ; Rao et al. 1979).

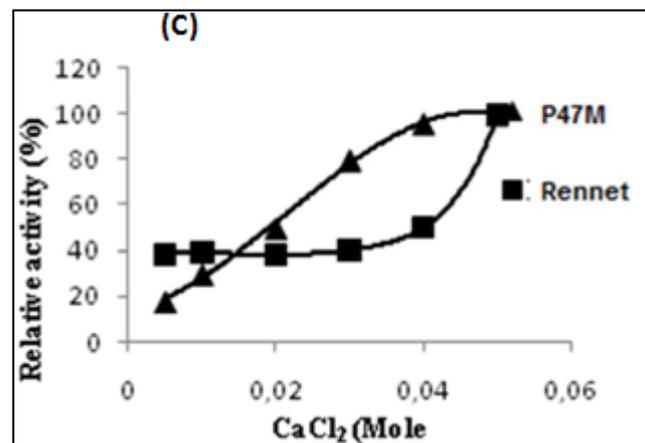


Figure 25-C: Effet de CaCl_2 sur l'activité coagulante

4.5.3. Effet de la concentration en enzyme sur la coagulation du lait

Il est bien connu que l'enzyme coagulant dans la fabrication fromagère a un double rôle, de produire du caillé et de développer une texture et une saveur pendant la maturation du fromage. En outre, selon Foltman (1959), le temps de coagulation est réduit lorsque la concentration de présure est augmentée, causée par une augmentation du taux de protéolyse de la κ -caséine, bien qu'il n'y ait pas de proportionnalité directe entre les valeurs. Cette observation est en accord avec nos résultats (Figure 25-D) pour les deux enzymes, ce qui montre que la concentration enzymatique est proportionnelle à l'activité coagulante relative (%).

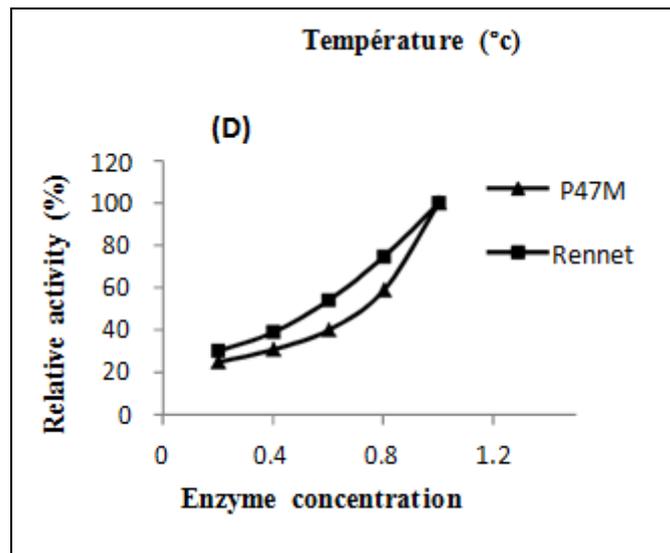


Figure 25-D: Effet de concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante

Conclusion

En conclusion, cette étude nous a permis d'atteindre un objectif principal est de contribuer à une meilleure connaissance de la protéine coagulant le lait en tant que succédané de présure, dérivée de la culture d'une souche bactérienne *B. mojavensis* P47M. Ainsi, l'étude préliminaire d'un extrait de caillé a révélé que ses propriétés physico-chimiques ne différaient pas significativement de celles des caillés préparés avec la présure commerciale. L'extrait enzymatique présente une bonne coagulation du lait et l'essai de fabrication du fromage en laboratoire n'a pas été différent de celui obtenu en utilisant de la présure commerciale. Bien que, la souche P47M puissent donc être considérée comme une source potentielle d'enzyme coagulant le lait avec des applications dans l'industrie fromagère, en particulier en Algérie qui importe de la présure. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir développer la production de la présure microbienne dans notre pays.

Sous chapitre : Optimisation des paramètres de fermentation par la méthode de surface des réponses

1. Introduction

le processus de fermentation dans une large mesure utilise des substrats solides issus des sous produits agro industriels tels que le son de blé, le tourteau de soja, les déchets de bananes, le son de riz (**Rajagopalan and Krishnan, 2009; Ding et al, 2011**).

Une approche statistique a été utilisée dans la présente étude pour laquelle une conception du modèle de plan composite centré (CCD en anglais) est utilisée pour identifier des variables significatives influençant la production de protéase coagulant le lait sous fermentation submergée (SmF ou submerged state fermentation) par une souche isolée et identifiée de *Bacillus mojavensis* P47M. Les niveaux des variables significatives ont été encore optimisés en utilisant la méthodologie de la surface de réponse.

2. Méthodologie

Le processus de fermentation en milieu submergée, la nature du milieu de culture, les paramètres de production de la protéase par la souche isolée et identifiée de *Bacillus mojavensis* P47M et les méthodes analytiques ont été décrits dans la première partie de ce travail.

2.1. Optimisation de la production d'enzyme et conception d'un plan d'expérience

La méthodologie de recherche expérimentale utilisant des plans d'expérience permet d'analyser les effets des différents facteurs ou paramètres et leurs interactions afin d'optimiser d'une part le processus de fermentation dans le cas des microorganismes et d'autre part obtenir une réponse expérimentale optimale.

L'optimisation de la production d'enzyme coagulant le lait à a partir de *Bacillus mojavensis* P47M a été étudié en utilisant un plan factoriel complet (Central design composite, CCD) correspondant a un modèle empirique polynomial de second degré tel que rapporte par certains auteurs (**Thys et al., 2006 ; Dutt et al., 2008**). À cette fin, l'approche de la surface de réponse en utilisant un ensemble de conception expérimentale (conception composite centrale à cinq niveaux codés) a été effectuée pour trois facteurs choisis comme variables indépendantes soit l'interaction d'un plan à 2³ CCD.

Dans le présent travail, la particularité dans la conception du plan factoriel se situe au niveau des variables choisies. En effet, le troisième facteur du plan n'est pas une variable numérique mais une catégorie (texte) soit X_1 : température, X_2 : Agitation (en rpm) et X_3 : son de blé ou tourteau de tournesol, qui est le support du milieu de culture ou milieu de base de la fermentation. Les facteurs du plan (CCD) ont été étudiés à différents niveaux : faible (-1), moyen ou nul (0) et niveau élevé (+1). Pour la 3^e variable, il ne s'agit plus de niveaux mais de chiffres donnés à cette variable pour les différencier. Ainsi, le nombre 1 correspond au son de blé et le nombre 2 à celui du tourteau de tournesol. Dans ce cas le nombre des expériences est de 28, avec deux répétitions et le nombre total est de 56 avec 16 points cubiques ou noyaux, 12 points centraux (ou nuls), 16 points axiaux ou étoiles et 12 points centraux dans l'axe. La distance axiale α devient égale à 1,41 soit $-\alpha(-1,41)$ et $+\alpha(+1,41)$. La réponse expérimentale est représentée par la mesure de l'activité coagulante AC (U/ml) de l'enzyme produite, son activité protéolytique AP (exprimée en DO₆₆₀) et le rapport AC/AP (Cf. *Matériels et méthodes*). Les valeurs centrales (niveau zéro) choisies pour la conception expérimentale sont les valeurs des conditions de fermentation utilisées dans la production de l'enzyme P47M caractérisée dans la première partie de ce travail, **Température : 32°C, agitation : 185 rpm, valeur texte : son de blé ou tourteau de tournesol.**

La gamme et les niveaux des variables expérimentales étudiées utilisés dans le CCD sont présentés dans Le **tableau 14**

Tableau 14: Niveau des variables utilisés dans le CCD

		Niveaux des facteurs (x_i)					Pas des variables
Facteurs (X_i)	Catégorie	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$	ΔX
Température (°C) (X_1)	Numérique	23.51	26	32	38	40.48	6
Agitation (rpm) (X_2)	Numérique	135.50	150	185	220	234.49	35
Milieu de base (X_3)	Texte	–	Son de blé	–	Tourteau de tournesol	–	–

La variable X_3 correspond à une valeur non numérique mais un texte. Les chiffres 1 et 2 sont attribués pour les différencier

En développant l'équation de régression, les facteurs du test sont codés selon l'équation suivante :

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X}$$

x_i : Facteurs en valeur codées (niveau des facteurs).

(X_j) : Facteur en valeur naturelle ou réelle.

X_0 la valeur naturelle de la $i^{\text{ème}}$ variable indépendante au point central

ΔX : Pas d'échange entre les différents niveaux.

Il est utile de rapporter qu'à la lumière de la littérature examinée, le tourteau de tournesol n'a pas à notre avis fait d'étude comme milieu de base de la fermentation bactérienne pour la production de protéases exo cellulaires contrairement au son de blé dont l'utilisation a été rapporté par plusieurs auteurs (**Talantikite et al, 2012 ; Areces et al., 1992 ; Majumder et al., 2015 ; Naveena et al., 2005 ; Park et al., 1996**). Par ailleurs, seule la graine entière de tournesol été employé comme substrat d'isolement de protéase coagulant le lait dans de rares travaux tels que ceux rapportés par **Egito et al (2007) et Nasr et al (2016)** alors que la présente étude traite des graines dégraissées ou tourteaux (*Cf. Chapitre I : Propriétés biochimiques d'une protéase végétale extraite du tourteau dégraissé de tournesol*)

Dans le présent travail, seul le rapport AC/AP est pris en compte dans cette étude, paramètre suffisant pour caractériser les aptitudes d'une protéase coagulant le lait à être employé comme succédané de la présure traditionnelle.

2.2. Analyse Statistique

Le comportement de la surface de réponse a été expliqué par un modèle polynomial complet de second ordre selon le modèle d'équation suivante :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n (\beta_i X_i) + \sum_{i=1}^n (\beta_{ii} X_i^2) + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (\beta_{ij} X_i X_j) + \dots$$

- y représente la fonction de réponse,
- β_0 est la constante polynomiale qui exprime l'effet moyen général,
- β_i , β_{ii} et β_{ij} sont les coefficients des effets linéaires, quadratiques et interaction respectivement,
- X_i et X_j représentent les variables codées indépendantes.

Ce type de modèle permet l'estimation d'une surface de réponse pour étudier les effets linéaires, les effets quadratiques et les effets d'interaction :

Le logiciel **MINITAB ver.17** a été utilisé pour déterminer les coefficients des polynômes pour chaque réponse. La significativité statistique des coefficients de régression a été

déterminé à l'aide du test T de *student* et de la valeur de p et le modèle d'équation du second degré a été déterminé par le tes de *Fisher*. La vérification des modèles ajustés a été réalisée par le coefficient de régression R^2 . Lorsque R^2 présente des valeurs élevées, il indique que le modèle prévoit correctement les nouvelles observations et quand il présente des valeurs faibles ça montre que le modèle ajuste bien les données existantes (**Thys et al., 2006**).

Pour la validation du CCD, seuls les facteurs température et agitation du milieu de fermentation ont été pris en compte, le facteur milieu de base a et fixé (son de blé ou tourteau de tournesol) comme il a été rapporté auparavant.

3. Résultats et discussion

56 expériences ont été réalisées selon le plan composite centré en choisissant des variables Indépendantes considérées comme des facteurs qui influencent une fermentation (Température, agitation et milieu de base ; la matrice des niveaux codés a été identifiée et présentée dans le **Tableau 15**. , Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 16**.

Tableau 15 : Matrice des Niveaux codés (pour 28 expériences dupliquées)

Expérience N°	Variables codées		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	+	+	1
2	-	+	1
3	+	-	1
4	-	-	1
5	+	+	2
6	-	+	2
7	+	-	2
8	-	-	2
9	+ α	0	1
10	- α	0	1
11	+ α	0	2
12	- α	0	2
13	0	+ α	1
14	0	- α	1
15	0	+ α	2
16	0	- α	2
17	0	0	1
18	0	0	1
19	0	0	1
20	0	0	1
21	0	0	1
22	0	0	1
23	0	0	2

24	0	0	2
25	0	0	2
26	0	0	2
27	0	0	2
28	0	0	2

X1 : Température, X2 : Agitation, X3 : Milieu de base (1 : Son de blé, 2 : Tourteau de tournesol)

Tableau 16 : Matrice du plan composite centré (56 expériences)

N° Tube	Température (°c)	Agitation (rpm)	Milieu de Base	Indices AC/AP	AC	AP
1	32	185	Son	124.97	84.48	0.676
2	26	220	Son	36.76	18.78	0.511
3	26	150	Son	28.42	13.87	0.488
4	32	185	Tourteau	10.07	20	1.985
5	32	185	Son	110.6	60.5	0.547
6	32	185	Tourteau	12.52	21.61	1.725
7	26	220	Tourteau	20.23	29.24	1.441
8	32	185	Tourteau	13.9	28.82	1.929
9	26	150	Tourteau	17.23	24.66	1.431
10	38	220	Son	50.81	33.23	0.654
11	26	150	Tourteau	19.47	28	1.438
12	32	185	Son	171.5	89.9	0.524
13	38	220	Tourteau	2.68	6.15	2.295
14	38	150	Tourteau	18.29	45.03	2.461
15	32	185	Son	129.6	72.71	0.561
16	26	150	Son	29.17	11.81	0.405
17	38	220	Tourteau	2.28	5.23	2.290
18	26	220	Tourteau	20.23	29.09	1.438
19	32	185	Tourteau	13.13	25.66	1.954
20	38	150	Son	107.79	61.87	0.574
21	26	220	Son	38.82	19.83	0.511
22	38	150	Son	105.4	78.77	0.747
23	32	185	Tourteau	14.1	28.22	1.996
24	32	185	Son	185.49	97.94	0.528
25	38	150	Tourteau	13.97	32.56	2.336
26	38	220	Son	49.39	32.69	0.662
27	32	185	Tourteau	12.9	22.98	1.781
28	32	185	Son	122.5	73.35	0.652
29	32	185	Tourteau	12,77	24,54	1,89
30	23.5147186	185	Son	10.71	4.52	0.422
31	32	185	Son	131,83	76,18	0,58
32	23.5147186	185	Son	10.3	3.72	0.359
33	32	185	Tourteau	11,32	20,95	1,77
34	32	135.502525	Son	48.83	31.20	0.639
35	40.4852814	185	Tourteau	3.01	6.5	2.158
36	32	185	Tourteau	14,22	28,13	2,00
37	32	234.497475	Son	78.5	57.54	0.733

38	32	135.502525	Son	63,92	31,89	0,499
39	23.5147186	185	Tourteau	2,95	3,98	1,351
40	32	185	Son	108,58	64,75	0,52
41	32	185	Son	155,08	87,61	0,65
42	32	135.502525	Tourteau	15,62	26,83	1,718
43	32	234.497475	Tourteau	32,12	50,88	1,584
44	32	234.497475	Son	80,03	43,29	0,541
45	32	185	Tourteau	13,71	21,53	1,97
46	32	234.497475	Tourteau	29,21	68,08	2,331
47	23.5147186	185	Tourteau	2,95	4,00	1,351
48	40.4852814	185	Son	9,93	7,82	0,788
49	32	185	Son	122,69	73,03	0,54
50	32	185	Son	125,69	73,48	0,55
51	32	185	Tourteau	13,2	20,04	1,95
52	32	135.502525	Tourteau	14,61	21,87	1,497
53	40.4852814	185	Tourteau	3,55	9,2	2,594
54	32	185	Son	129,2	73,38	0,53
55	40.4852814	185	Son	10,76	7,02	0,652
56	32	185	Tourteau	14,22	23,02	1,97

- **Optimisation par le composite centré**

Il s'agit du plan factoriel précédent mais complet (PFC). C'est un modèle quadratique avec une surface de réponse plus large à trois dimensions en ajoutant au plan factoriel précédent les points étoilés (α) et les répétitions dans les points au centre.

A partir des résultats des valeurs expérimentales ou valeurs observées, et en tenant compte des valeurs de l'indice AC/AP de 56 expériences, l'analyse de la variance (**tableau 17**) pour définir la surface réponse AC/AP en fonction du block agitation, température de fermentation et milieu de base (tourteau de tournesol) est :

Tableau 17 : Analyse de la variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Modele	9	107993	11999,2	14,01	0,000
Blocks	1	781	780,8	0,91	0,345
Linéaire	3	72025	24008,2	28,04	0,000
Température (C°)	1	651	651,3	0,76	0,388
Agitation (rpm)	1	1	1,2	0,00	0,970
Milieu de base	1	71372	71372,2	83,35	0,000
Carré :	2	31858	15929,1	18,60	0,000
Température (C°) * Température (C°)	1	29080	29079,5	33,96	0,000
Agitation (rpm) * Agitation (rpm)	1	4313	4313,0	5,04	0,030
2-voie d'interaction	3	3329	1109,8	1,30	0,287
Température (C°) * Agitation (rpm)	1	1715	1714,8	2,00	0,164
Température (C°) * Milieu de base	1	1545	1545,3	1,80	0,186
Agitation (rpm) * Milieu de base	1	69	69,3	0,08	0,777
Erreur	46	39390	856,3		
Lack-of-Fit	10	33507	3350,7	20,51	0,000

Pure Error	36	5883	163,4
Total	55	147383	

Les équations moyennées sur les blocks pour les 2 milieux de base utilisées sont:

➤ **Milieu de base ; Son**

$$\begin{aligned} \text{AC/AP} = & -1465 + 66,8 \text{ Température}(C^\circ) + 5,18 \text{ Agitation (rpm)} - \\ & 0,872 \text{ Température}(C^\circ) * \text{Température}(C^\circ) - 0,00986 \text{ Agitation (rpm)} * \text{Agitation (rpm)} \\ & - 0,0493 \text{ Température}(C^\circ) * \text{Agitation (rpm)} \end{aligned}$$

➤ **Milieu de base : Tourteau de tournesol**

$$\begin{aligned} \text{AC/AP} = & -1477 + 64,5 \text{ Température}(C^\circ) + 5,26 \text{ Agitation (rpm)} - \\ & 0,872 \text{ Température}(C^\circ) * \text{Température}(C^\circ) - 0,00986 \text{ Agitation (rpm)} * \text{Agitation (rpm)} \\ & - 0,0493 \text{ Temperature}(C^\circ) * \text{Agitation (rpm)} \end{aligned}$$

D'après l'analyse de la variance ci dessus, on peut déduire les coefficients adéquat pour le processus, ce sont les coefficients ayant leur seuil de probabilité $p < 0,05$.

On aura alors comme coefficients la température au carré, l'agitation au carré et le milieu de base. Les équations de régression deviennent:

Milieu de base son:

$$\text{AC/AP} = -0,872 \text{ température} * \text{température} - 0,00986 \text{ agitation} * \text{agitation.}$$

Milieu de base tourteau:

$$\text{AC/AP} = -0,872 \text{ température} * \text{température} - 0,00986 \text{ agitation} * \text{agitation}$$

En d'autre terme, si Y_s est la réponse pour le son, Y_t est la réponse pour le tourteau, X_1 est la température et X_2 est la vitesse d'agitation, on a:

$$Y_s = -0,872X_1^2 - 0,00986X_2^2 \quad \text{et} \quad Y_t = -0,872X_1^2 - 0,00986X_2^2$$

Le graphe de l'équation de régression AC/AP est représenté par la surface reponses suivantes pour les 2 milieux de base :

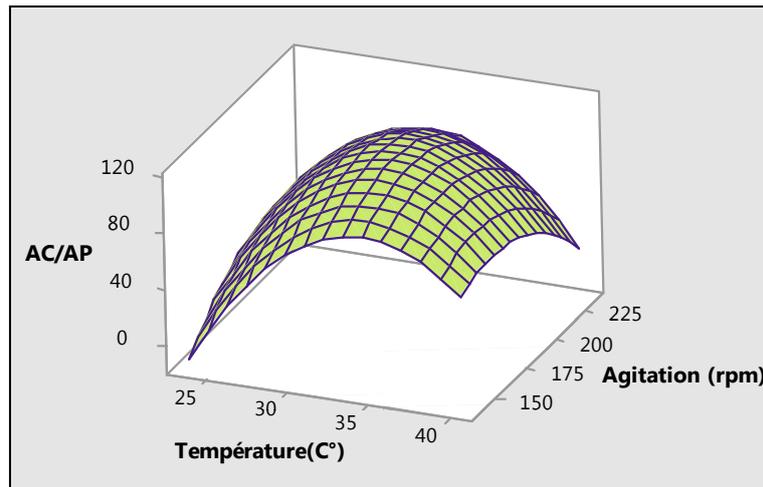


Figure 26 : Surface de réponse montrant l'effet de la température et de l'agitation sur la valeur de l'indice AC/AP pour le son comme milieu de base.

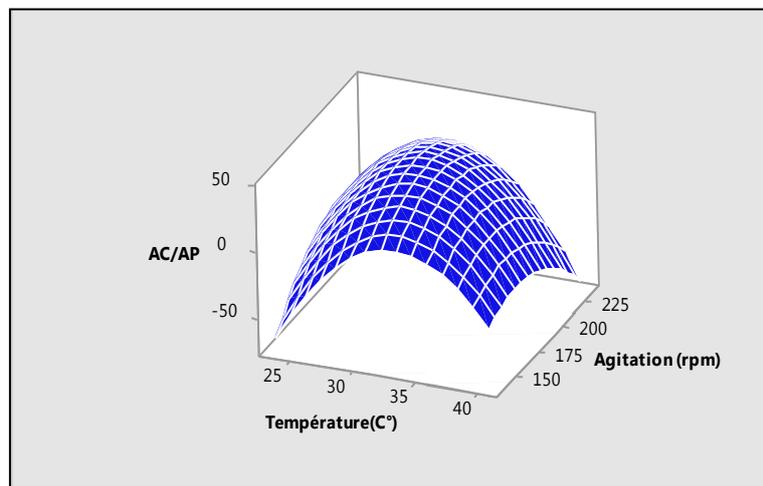


Figure 27 : Surface de réponse montrant l'effet de la température et de l'agitation sur la valeur de l'indice AC/AP pour le tourteau de tournesol comme milieu de base

On constate que pour les 2 milieux de base, la surface de réponse illustre parfaitement l'optimum des facteurs de fermentation qui se situent entre 30 et 35°C pour la température et de 180 à 210 rpm pour l'agitation. Cependant, le son de blé paraît être le milieu le plus performant avec un indice AC/AP supérieur à 120 par rapport au tourteau de tournesol dont la valeur de l'indice avoisine les 50.

Les mêmes observations sont rapportées par la détermination des indices AC et AP (résultats non publiés)

Cependant, et à titre de comparaison nous avons jugé utile de montrer les surface réponses pour les deux paramètres étudiés.

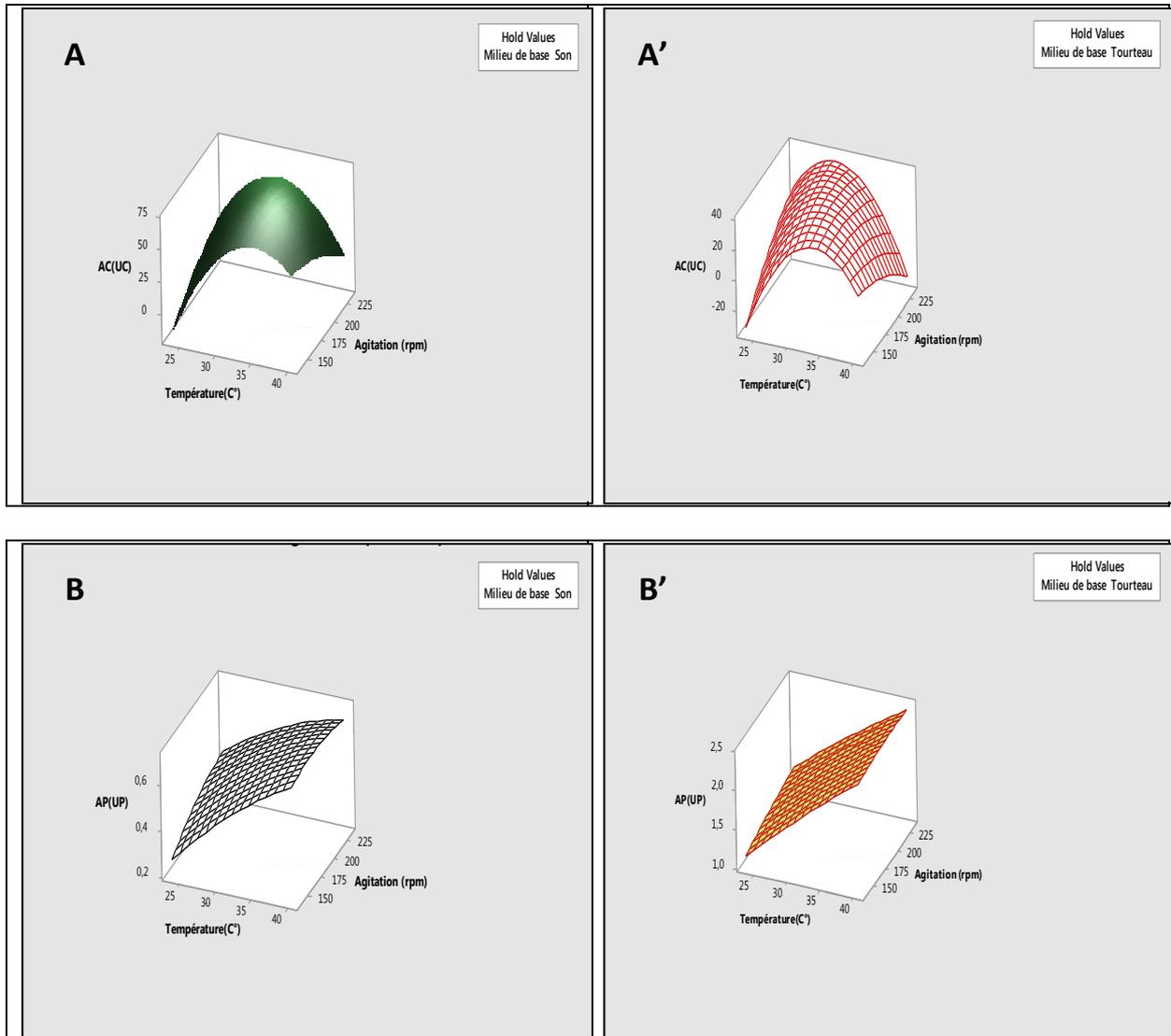


Figure 28: Surface de réponse montrant l'effet de la température et de l'agitation sur la valeur du paramètre AC (Activité coagulante) pour le son de blé (A) et le tourteau de tournesol (A') et sur le paramètre AP (Activité protéolytique) respectivement pour B et B'

Le graphe montre que la droite de régression est de forme parabolique pour l'activité coagulante (avec le son de blé, l'AC est le double par rapport au tourteau de tournesol). Par ailleurs, l'activité protéolytique est linéaire et croît avec l'augmentation de la température, plus prononcée chez le tourteau de tournesol.

Le graphe suivant (**Figure 29**) représente les résultats d'optimisation pour l'indice AC/AP quelque soit le milieu le milieu de base.

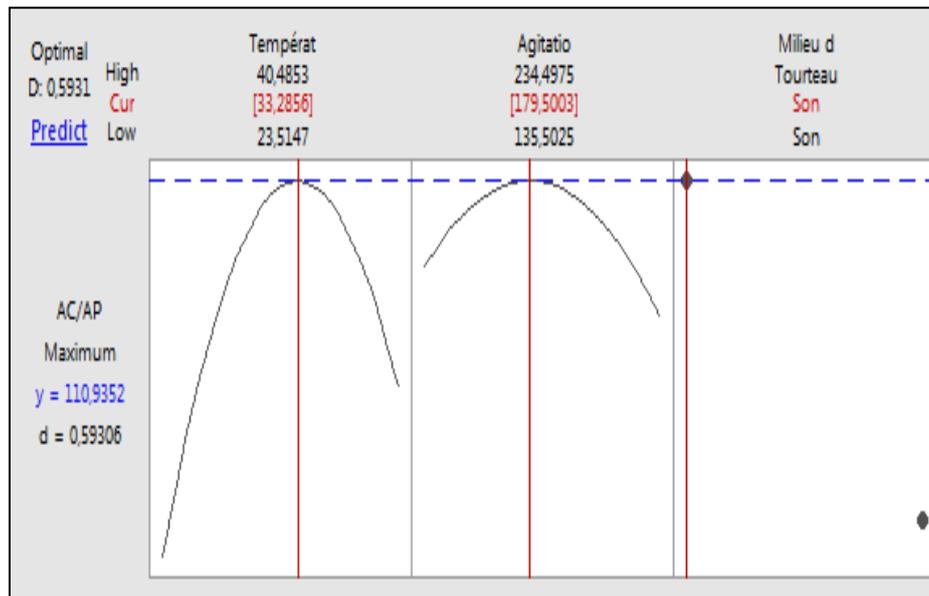


Figure 29 : Résultats d'optimisation pour l'indice AC/AP quelque soit le milieu le milieu de base.

Dans tous les cas de figure, le son demeure la source la plus apte à donner le meilleurs rendement de production des protéases coagulant le lait comparativement au tourteau de tournesol dont probablement sa composition chimique freine le développement de la culture de spores de *Bacillus mojavensis*.

Faut il rappeler que lors des fermentations bactériennes, la formulation d'un milieu de culture est un paramètre important à prendre en considération. Ainsi, à l'échelle industrielle ce milieu est remplacé par des sous-produits ou des déchets de l'agro-industrie en vue de réduire le coût de la production des composés d'intérêt technologique (**Demir and Tari, 2014**). Cette approche permet aussi de valoriser le sous produits de l'agro industrie, tel est le cas du son de blé qui demeure un excellent sous produit de meunerie pour des fermentations en milieu submergé ou solide (**Dos Santos et al., 2018**).

L'analyse par plan d'expérience a montré l'efficacité du son de blé qui d'après **Chee et al. (2005)**, représente une bonne source de protéines et de minéraux tels que le phosphore, le calcium, le magnésium, le fer, le cuivre et le zinc) en plus d'être une source riche en carbohydrates (**Shenoy et Prakash, 2002**) pour la production de divers métabolites intéressants. Il est produits en grandes quantités a travers le monde (**Martel et al., 2010**).

Références bibliographiques

- Abdel-Fattah, A. F., el-Hawwary, N. M., and Amr, A. S. (1974).** Studies on the production of milk-clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi, *J. of general microbio.* **84**, 327
- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Sestelo, A. B., Poza, M., and Villa, T. G. (2007).** Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13, *J. of applied microbio.* **103**, 2205.
- Areces, L. B., Bonino, M. B., Parry, M. A., Fraile, E. R., Fernandez, H. M. and Cascone, O. (1992).** Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*, *Applied biochem. and biotech.* **37**, 283 .
- **Ayhan F., Celebi S.S. and Tanyolac A. (2001).** The effect of fermentation parameters on the production of *Mucormiehei* acid protease in a chemically defined medium, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**: 153- 160
- Cavalcanti, M. T. H., Martinez, C. R., Furtado, V. C., Neto, B. B., Teixeira, M. F., Lima Filho, J. L. and Porto A. L. F. (2005).** Milk-clotting protease production by *Nocardiosis* sp. in an inexpensive medium, *World J. of Microbio. & Biotech.* **21**, 151.
- **Cavalcanti M.T.H., Martinez C.R., Furtado V.C., Neto B.B., Teixeira M.F., Dutt, K., Gupta, P., Saran, S., Misra, S., and Saxena, R. K. (2009).** Production of milk-clotting protease from *Bacillus subtilis*, *Applied biochem. and biotech.* **158**, 761 .
- Chee K.M., Kwang S.C., Bong D.H., Jin H.C., Mahn K.C., Hyung S. Lee In S. and Kwang Y. (2005).** Comparative Feeding Values of Soybean Hulls and Wheat Bran for Growing and Finishing Swine, *Asi.-Austral. J. of Animal Sc.* **18** (6): 861-867.
- Demir, H., Goegüs, N., Tari, C., Heerd, D. and Lahore, M.F (2014).** Optimization of the process parameters for the utilization of Orange peel to produce polygalacturonase by solid-state fermentation from an *Aspergillus sojae* mutant strain, *Turkish J. Biol.* **36**, 394-404.
- Ding, Z., Liu, S., Gu, Z., Zhang, L., Zhang, k., and Shi, G. (2001).** Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran, *African J. of Biotech.* **10**, 9370.
- Ding, Z., Liu, S., Gu, Z., Zhang, L., Zhang, K. and Shi, G. (2011).** Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran, *African J. of Biotech.*, **10**, 9370-9378
- Dos Santos Aguilar J.G., Sato and H.H. (2018).** Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates, *Food Res. Inter.*, **103**, 253–262
- **Dutt K., Meghwanshi G.K., Gupta P. and Saxena R.K. (2008).** Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milkclotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis*, *Lett. Appl. Microbio.* **46**: 51 .

- El-Bendary M.A., Moharam M.E. and Ali T.H. (2007).** Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme Produced by *Bacillus sphaericus*, *J. of Applied Sci. Res.*, **3**, 695.
- Egito, A.S, Girardet J.M, Laguna L.E, Poirson C, Molle D, Miclo L, Humbert G, and Gaillard J.L. (2007).** Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein, *Inter. Dairy J.* **17**, 816–825.
- Esawy M. A. and Combet-Blanc Y. (2006).** Immobilization of *Bacillus licheniformis* 5A1 milk-clotting enzyme and characterization of its enzyme properties, *World J. of Microbio. and Biotech.* **22**, 197.
- Foltmann, B. (1959).** On the enzymatic and coagulation stages of the renneting process. , *J. of Society of Dairy Tech.* **12**, 655.
- Genckal, H. and Tari, C. (2006).** Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats, *Enzyme and Microbial Tech.* **39**, 703.
- Guiama V. D, Libouga D. G., Ngah E., Beka R. G., Ndi K. C., Maloga B., Bindzi J. M., Donn P. and Mbofung C. M. (2010).** Milk-clotting potential of fruit extracts from *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* L. and *Solanum melongena*. *African J. of Biotech.*, **9**, 1797- 1802.
- He, X., Ren, F., Guo, H., Zhang, W., Song, X., and Gan, B. (2011).** Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced By *Bacillus amyloliquefaciens*D4, *Korean J. Chem. Eng.*, **28**(1), 203-208.
- Kowalchyk, A. W. and Olson, N. F. (1979).** Milk Clotting and Curd Firmness as Affected by Type of Milk- Clotting Enzyme, Calcium Chloride Concentration, and Season of Year, *J. of Dairy Sc.* **62**, 1233.
- Kumari Narwal, R., Bhushan, B., Pal, A., Panwar, A. and Malhotra, S. (2016).** Purification, physico-chemico- kinetic characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422, *LWT, Food Sc. and Tech.* **65**, 652.
- Kumar, C. G.,** Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*, *Letters in Applied Microbiology* **34**, 13 (2002).
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680.
- Lemes, A. C., Pavón, Y., Lazzaroni, S., Rozycki, S., Brandelli, A., and Kalil, S. J. (2016).** A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development, *LWT, Food Sc. and Tech.* **66**, 217.
- Li, Y., Liang, S., Zhi, D., Chen, P., Su, F., and Li, H. (2012).** Purification and characterization of *Bacillus subtilis* milk-clotting enzyme from Tibet Plateau and its potential use in yak dairy industry, *European Food Res. and Tech.* **234**, 733.

- Liorente, B. E., Brutti, C. B., and Caffini, N. O. (2004)**. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.), *J. of agricult. and food chem.* **52**, 8182.
- Lowry O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951)**. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. of biological chem.* **193**, 265.
- Majumder R., Banik, S. P. and Khowala, S. (2015)**. Purification and characterisation of kappa-casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091, *Food chem.* **173**, 441.
- Martel, F., Estrine, B., Plantier-Royon, R., Hoffmann, N. and Portella, C. (2010)**. Development of agriculture left-overs: fine organic chemicals from wheat hemicellulose derived pentoses, *Top. Curr. Chem.*, 294, 79–115.
- **Moses V, Cape R.E.(1991)**. Biotechnology: the science and business. Harwood, UK: Academic Publishers.
- **Naveena B.J., Altaf Md., Bhadrappa K., Madhavendra S.S. and Reddy G.(2005)**. Direct fermentation of starch to L (+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate medium optimization using RSM, *Process Biochem.*, 40, 681-690.
- **Nasr A.M., Isam A. Mohamed A. and Omer I. A. (2016)**. Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds, *Food sc. and nutri. By Wiley Periodicals, Inc.*
- **Nouani, A., Belhamiche, N., Slamani, R., Belbraouet, S., Fazouane, F., and Bellal, M. M. (2009)**. Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization, *International Journal of Dairy Technology* **62**, 112.
- Park Y.N., Aikawa J., Nishiyama M., Horinouchi S. and Beppu T. (1996)**. Involvement of a residue at position 75 in the catalytic mechanism of a fungal aspartic proteinase, *Rhizomucor pusillus* pepsin. Replacement of tyrosine 75 on the flap by asparagines enhances catalytic efficiency, *Protein Eng.* 9:869–875
- Peng Y., Yang, X., and Zhang Y. (2005)**. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo, *Applied microbio. and biotech.* **69**, 126 .
- Rajagopalan G. and Krishnan C. (2009)**. Optimization of agro-residual medium for α -amylase production from a hyper-producing *Bacillus subtilis* KCC103 in submerged fermentation, *J. of Chemical Tech. & Biotech.* **84**, 618.
- Rao K. and Mathieu D. (1979)**. Studies on the production of bacterial rennet in pilot plant fermentor, *Biotech. and Bioeng.* **17**, 1349.
- Rao L. K. and Mathur D. K. (1979)**. Purification and properties of milk-clotting enzyme from *Bacillus subtilis* K-26, *Biotech. and Bioeng.* **21**, 535.

- Shenoy H.A. and Prakash J. (2002).** Wheat bran (*Triticum Aestivum*): composition, functionality and incorporation in unleavened bread, *J. of Food Quality* 25:197-211.
- Shieh C.J., Phan Thi L.A. and Shih I.L. (2009).** Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis natto*, *Biochem. Eng. J.* **43**, 85.
- Sidrach L., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., and Rodriguez-Lopez J. N. (2005).** Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A, *Phytochem.* **66**, 41.
- Silva B. L., Geraldés F. M., Murari C. S., Gomes E. and Da-Silva R. (2014).** Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicus* N31, *Applied biochem. and biotech.* **172**, 1999.
- Talantikite-Kellil S., Nouani A., Saunier, M., Gillmann L.B. and Fazouane, F. (2012).** Isolation and identification of bacterial strain I33M producing milk-clotting enzyme: Optimization of culture parameters using response surface, *African J. of Biotech.* **11**, 16594-16606.
- Thys R., Guzzon S., Florencia C. and Brandelli A. (2006).** Optimization of protease production by *Microbacterium* sp in feather meal using response surface methodology, *Process Biochem.* 41:67-73.
- Yang L, Shu L, Dejuan Z, Peng C, Feng S and Hongyu L. (2012).** Purification and characterization of *Bacillus subtilis* milk-clotting enzyme from Tibet Plateau and its potential use in yak dairy industry, *Eur Food Res. Tech.*, 234:733-74.
- Yasuda M., Aoyama, M., Sakaguchi, M., Nakachi, K. and Kobamoto, N. (1999).** Purification and characterization of a soybean-milk-coagulating enzyme from *Bacillus pumilus* TYO-67, *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 474-9

Chapitre III : Propriétés biochimiques des protéases coagulant le lait d'origine caprine (Chevreau)

1. Résumé :

L'objectif de notre travail représente l'étude d'un succédané de la présure traditionnelle d'origine animale issu du système gastrique d'un petit ruminant : le caprin. Il consiste en la purification et la caractérisation de l'extrait brut issu de la caillette de chevreau ainsi que l'étude de la possibilité de leur emploi en industrie fromagère. L'extrait enzymatique partiellement purifié par ultrafiltration présente une activité coagulante de 1,234 et un indice d'AC/AP de 11,42. Des valeurs optimales de l'activité coagulante ont été observées à pH 5, une température de 45°C et une concentration en CaCl₂ de 0,04 mole/litre. La purification sur colonne analytique de gel *Sephadex G-75* a révélé un seul pic actif probablement de la chymosine qui est de 32,5 kDa et une bande monomère de 27 kDa a été révélée Par SDS-PAGE. Une sensibilité de l'extrait était constatée vis-à-vis de la Pepstatine-A confirme que notre enzyme est une aspartyl protéase

2. Introduction :

En Algérie, l'élevage caprin occupe la deuxième place de point de vue effectifs après les ovins est plus concentré, comme dans le reste des pays méditerranéens dans les zones difficiles et les régions défavorisées de l'ensemble du territoire : steppe, région montagneuse et Oasis.

La production de lait de chèvre occupe 13% de la production laitière nationale, cette production est orientée essentiellement vers l'auto-consommation. Sa valorisation sous forme de fromage est le fait des femmes d'éleveurs et concerne de très faibles volumes. Le passage au stade artisanal ou semi-industriel en est encore à sa phase de démarrage

La transformation de lait en fromage est une méthode de conservation de lait très utilisée dans le monde au plan artisanal ou industriel.

La présure, le principal agent coagulant de lait, couvre seulement 20 à 30 % de la demande mondiale en coagulants (**Jacob et al, 2011**).

Par ailleurs, On a su a travers les nombreux travaux menés sur les succédanés depuis les années 80, que l'indisponibilité des présures de veau associée à des problèmes d'éthiques ainsi que l'abattage accéléré des jeunes bovins constituaient une nécessité impérieuse de rechercher d'autres alternatives à la chymosine bovine.les travaux menés sur des mammifères

tels que le buffle, le caprin, l'ovin et le lapin pourraient constituer de bonnes sources de présure. Toutefois, La chymosine bovine (*Bos taurus*) (Foltman, 1970, 1992, 1993), de buffle (*Bubalosbubalis*) (Mohanty et al, 2003), de l'agneau (*Ovisplatyurea*) (Baudys et al, 1988) a été largement étudiée et bien caractérisée. Cependant, très peu d'informations ont été rapportées sur la purification et la caractérisation sur la chymosine du chevreau à l'exception de l'étude réalisée par Kumar et al (2006). Bien que les laitages, particulièrement les fromages à base de lait de chèvre à forte valeur ajoutée, possèdent une très bonne valeur nutritionnelle et des propriétés sensorielles très appréciées par le consommateur, il est digne d'intérêt de s'intéresser aux enzymes gastriques du caprin notamment la chymosine potentiellement utilisée comme substitut de la présure traditionnelle. Tel est l'objectif de notre présent travail.

3. Matériels et méthode:

La partie expérimentale entame le volet biochimique incluant l'extraction de l'enzyme coagulant le lait à partir de la caillette de chevreau l'estimation de son activité coagulante, la Purification, sa caractérisation par l'étude de l'influence de certains paramètres chimiques et aussi l'influence des inhibiteurs, et la détermination de son poids moléculaire.

3.1. Matériel biologique

3.1.1. Caillettes caprines :

La caillette caprine est Le matériel biologique représentant la source enzymatique utilisé dans notre étude provenant des caprins sélectionnés selon leurs âges au niveau d'une ferme située à la commune de REGHAIA wilaya d'Alger, nous avons choisi les caillettes d'un chevreau âgé de 10 jours. Le choix que peut présenter cette matière première tient compte de certains critères, tels que :possibilité de se procurer facilement des quantités suffisantes de ces tissus pour isoler les protéases, Leur emploi comme substituts à la présure constituerait une piste pour la valorisation de ces sous produits d'abattage.

3.1.2. Préparation des caillettes :

Après abattage du caprin sélectionné, la quatrième poche de leurs estomacs sont prélevées.les caillettes alors sont lavées à l'eau de robinet, dégraissées, hachées en petits morceaux, mises dans des boîtes en plastique puis congelées à -18°C

3.2. Extraction et clarification des extraits enzymatiques bruts

L'extraction de notre enzyme se fait selon la méthode de **Kumar et al, (2006)**. L'enzyme est extraite, principalement de 50 g de tissu qui a été rincé avec de l'eau distillée et haché en petits morceaux manuellement puis congelé. Le tissu émincé est lyophilisé sous vide après décongélation. L'enzyme a été extrait avec 600 ml de l'eau distillée dans un homogénéiseur. Après homogénéisation, l'échantillon de tissu avec homogénat a été tendu à travers chiffon de mousseline. L'extrait d'enzyme brute a été récupéré après centrifugation à 6000 tours/min pendant 10 min à 4 ° C. Le tissu a été en outre ré-extraite avec 100 ml d'eau distillée sous une même condition. Les extraits bruts ont été rassemblés à partir de deux extractions successives.

L'extrait brut a été clarifié avec du sulfate d'aluminium 0,33 M sous agitation continue jusqu'à ce que le pH de la solution atteigne 4,0. Le pH a ensuite été immédiatement élevé à 5,8 avec 0,5M d'hydrogène phosphate de disodium. Le précipité gélatineux formé en incluant la plupart des impuretés ont été éliminées par centrifugation à 6000 tours /mn à 4 ° C pendant 10 min.

3.3. Prépuration et concentration des extraits enzymatiques par Ultrafiltration

Dans le but d'améliorer la force coagulante de nos enzymes en augmentant leur concentration et réduire en enzyme les pertes au cours de la manipulation , nous avons appliqué la technique de l'ultrafiltration.

L'ultrafiltration est définie comme un procédé de séparation en phase liquide, par perméation à travers une membrane sélective sous l'effet d'un gradient de pression. La séparation est principalement en fonction de la taille des particules dispersées dans la solution (quelques dizaines à quelques centaines d'angströms) et de leur masse moléculaire (elle se situe entre 500 et 10^6 daltons). L'ultrafiltration concerne donc les colloïdes, les macromolécules synthétiques et naturelles, les virus. La taille des pores des membranes est comprise entre 1 et 100 nm (**Maurel, 1989**).

A la fin du procédé, deux fractions sont obtenues : le perméat et le retentât. Ce dernier est constitué de molécules ayant un poids moléculaire élevé (protéines, lipides) tandis que le perméat contient les molécules de faible poids moléculaires (lactose, sels, vitamines, acides aminés et eau) (**Renner et Abd El-Salam, 1991**).

L'ultrafiltration est réalisée au laboratoire sur une membrane tangentielle, type « oméga » et de seuil de coupure de 100 kDa. L'extrait enzymatique clarifié circule, à partir d'un réservoir de 500ml contenant 200 ml de produit, en utilisant une pompe péristaltique. Le liquide est

homogénéisé à l'aide d'une spatule. Au cours de la circulation de l'extrait enzymatique, le perméat est collecté dans un cylindre gradué tandis que le retentât est retourné vers le réservoir.

Le perméat est ensuite soumis à une deuxième filtration par une membrane de 10 KDa et nous procédons de la même façon ; à la fin de ce procédé de filtration nous récupérons deux retentas que nous mélangeons pour obtenir l'extrait enzymatique clarifié et partiellement purifié.

Légende :

- 1: Réservoir;
- 2: pompe péristaltique;
- 3: manomètre;
- 4: Membrane d'ultrafiltration;
- 5: Cylindre gradué (récupération du perméat),
- 6: valve

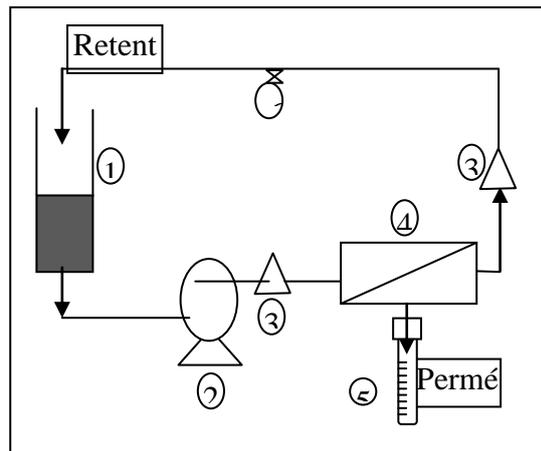


Schéma du dispositif d'ultrafiltration Tangentielle (DTA, FSI, UMBB)

3.4. Purification de l'extrait coagulant par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75 :

La séparation est réalisée dans un ordre décroissant des poids moléculaires sur le gel Sephadex G-75 à l'aide d'une colonne analytique type *SpectraChrom*, de dimension 30 cm × 1cm calibrée par une solution tampon acétate (0.1M à pH= 5).Après équilibrage de la colonne par l'éluant et stabilisation du débit à 0.3ml/min ,l'extrait enzymatique est déposé à raison de 4 ml délicatement à la surface du gel à l'aide d'une pipette graduée, des fractions de 2.5ml sont recueillies dans le collecteur de fraction, l'activité coagulante de chaque fraction est déterminée, aussi leurs teneurs protéiques par une lecture de l'absorbance sur spectrophotomètre à 280 nm.

3.5. Electrophorèse PAGE-SDS :

La fraction active récupérée par gel filtration a été lyophilisée pour une électrophorèse selon la technique rapporta par **Laemmli (1970)** afin de vérifier l'homogénéité et la pureté de

l'enzyme. Les différents échantillons et marqueurs, sont séparés sur un gel de polyacrylamide formé par un gel de séparation à 12% et un gel de concentration à 5% (**Annexe 4**). La migration électrophorétique est obtenue grâce à un système d'électrophorèse 'Max Fill Bioblock Scientific'. Le kit de protéines marqueurs de poids moléculaire (26-180 kDa) a été utilisé à des fins de comparaison. (*Cf. Chapitre I*)

3.6. Méthode analytique :

Sur l'extrait brut, nous réalisons des analyses physicochimiques suivantes :

3.6.1. Dosage des protéines:

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est réalisé selon la méthode de **Lowry et al. (1951)**. Cette concentration est déterminée à l'aide d'une courbe étalon (**Annexe 2**) établie en utilisant le sérum d'albumine bovin (B.S.A. à 200 µg /ml).

3.6.2. Mesures l'activité coagulante :

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut (EEB) est déterminée selon la méthode **Soxhlet (1877)** cité par **Schiel (2013)** Cette activité exprimée en force coagulante correspond au volume du lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique, en 40 minutes, à 35°C et à pH 6,4.

La formule de calcul de la force coagulante est la suivante :

Où :

$$F = \frac{2400 \cdot V}{T \cdot v}$$

F : force coagulante ;

V : volume du lait à coaguler (10ml) ;

T : temps de coagulation du lait en secondes ;

v : volume de l'extrait enzymatique (1ml) ;

Le nombre '2400' représente le temps standard du test (40 minutes) en secondes.

Remarque : le lait utilisé pour déterminer la force coagulante correspond au substrat de **Berridge (1952)**. (**Annexe1**)

3.6.3. Mesure l'activité protéolytique :

L'activité protéolytique est déterminée selon la méthode décrite par **Kumar et al, (2006)**, utilisant la caséine du lait comme substrat. Son principe consiste à mesurer l'accroissement des produits d'hydrolyse obtenus par action enzymatique sur la caséine solubilisée ensuite le

dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode de **Lowry et al, (1951)**. A partir de la solution mère de la tyrosine 100 µg/ml une série de dilution est réalisée afin d'établir le courbe étalon ((**Annexe 8**)).

3.6.4. L'activité spécifique (AS) :

C'est le rapport de l'activité coagulante avec les protéines totales.

$$\text{AS (UP/mg)} = \text{AC (UP)} / \text{CP (mg)}$$

Où:

CP: concentration totale en protéine (mg).

AC : activité coagulante (UP).

3.6.5. Purification relative (Facteur de purification) :

Il donne le nombre de fois que l'extrait enzymatique précipité a été purifié. C'est le rapport de l'activité spécifique de l'extrait enzymatique brut avec l'activité spécifique de l'extrait enzymatique purifié.

$$\text{F} = \text{AS}_2 / \text{AS}_1$$

Où :

AS₁ : activité spécifique de l'extrait enzymatique brut.

AS₂ : activité spécifique de l'extrait enzymatique purifié.

3.6.6. Détermination de l'indice AC/AP (Méthode Cf. chapitres précédents)

3.7. Effet des inhibiteurs (Méthode Cf. chapitres précédents)

3.8. Caractérisations de l'extrait coagulant ultrafiltré :

La caractérisation de l'extrait enzymatique passe par la détermination des conditions optimales de l'activité coagulante, cette dernière est susceptible d'être modifiée par plusieurs facteurs en particulier le pH, la concentration en CaCl₂ et la température.

3.8.1. Influence du pH , température, concentration en CaCl₂ et concentration en enzyme (cf. chapitre I)

3.8.2. Activité protéolytique (cinétique) :

L'activité protéolytique est déterminée selon la méthode de **Green et Stackpool (1975)** qui permet d'évaluer le taux de dégradation du substrat (caséine) pendant la réaction primaire. Elle est déterminée par la mesure de la concentration en produits d'hydrolyse de la caséine, soluble dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12%.

Une centrifugation permet de séparer le précipité de caséine et le produit d'hydrolyse. Le dosage des peptides est effectué sur le surnageant selon la méthode de **Lowry et al. (1951)**.

Les résultats s'expriment en termes de concentration de tyrosine ($\mu\text{g/ml}$) d'extrait enzymatique, par référence à un courbe étalon établie à partir de concentration croissante en tyrosine variant de 10 à $100\mu\text{g/ml}$ (**Annexe 9**)

4. Résultats et discussion

4.1. Extraction et clarification des extraits enzymatiques

A partir de 50 g de caillette lyophilisée macérée avec 700 ml d'eau distillé et clarifiée par une solution de sulfate d'aluminium à 0,33 M, on récupère un volume de 650ml d'extrait enzymatique brut. Les caractéristiques de l'extrait clarifié de chevreau étudié, sont illustrées dans le tableau 18

Tableau 18:Caractéristiques physiques et biochimiques de l'extrait enzymatique clarifié de chevreau

Caractéristiques	Extrait de chevreau clarifié
Couleur/Turbidité	Limpide
Aspect/Viscosité	Non visqueux
Taux de protéine mg/ml	6,95
Temps de coagulation (sec)	575
Activité coagulante UP/ml	0,174
Activité spécifique UP/mg de protéine	0,025

D'après le tableau 18, il semble que la valeur du temps de coagulation est important ce qui signifie une faible activité coagulante de l'extrait enzymatique. Cependant, et vu le

volume d'extrait clarifié récupéré, il est vraisemblable que la protéase active (chymosine) issue de caillettes de chevreau est très diluée dans le milieu avec des activités coagulantes spécifiques très proches (0,02 UP/ mg de protéine). Contrairement à la méthode d'extraction rapportée par **Kumar et al, (2006)** sur le caprin et appliquée dans cette étude, la méthode traditionnelle pour la préparation des extraits coagulants à partir de caillettes d'animaux comporte initialement l'extraction de pro-enzymes suivi d'une activation en milieu acide ensuite une concentration (**Green, 1972 ; O'Leary et Fox, 1973**). Par ailleurs, selon **Valles et Furet (1977)**, l'extraction et l'activation des pro-enzymes se fait simultanément par une macération des caillettes dans une solution diluée d'acide chlorhydrique.

Il est utile de rappeler que les résultats observés dans nos conditions expérimentales en matière d'activité des enzymes coagulantes à savoir la chymosine et la pepsine peuvent être très différentes de ceux obtenus par des auteurs ayant travaillé sur le caprin. En effet, les paramètres zootechniques ainsi que les facteurs génétiques influencent grandement la production d'enzymes gastriques. Ainsi, selon **Garnot et al (1977)** et **Andern et Bjorck (1986)** la production de prochymosine est sensiblement liée à la consommation de lait tandis que **Sidikou et al (2005)** rapporte que la consommation de nourriture solide fait diminuer la sécrétion de prochymosine et augmente celle du pepsinogène

4.2. Purification partielle des extraits enzymatiques par ultrafiltration

La purification d'une protéine et plus particulièrement les enzymes subissent à l'amont de l'extraction une purification partielle par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium à saturation (**Kamoun, 1991**). Aussi, plusieurs travaux menés sur les enzymes coagulant le lait ont mis en évidence l'emploi de la technique de relargage au sulfate d'ammonium (**Lo Piero et al, 2011 ; Beka et al, 2014 ; Majumder, 2015**) pour prepurifier les extraits bruts. En revanche, plusieurs auteurs pensent que la précipitation fractionnée engendre des pertes en enzymes lors du relargage et estiment que le passage vers l'emploi d'une purification par échangeuse d'ions ou par exclusion moléculaire de l'extrait brut élimine sans contrainte les protéines contaminants contenus dans les extraits enzymatiques (**Puglisi, 2014 ; Leite Júnior et al, 2014 ; Shamtsyan et al, 2014**). Par ailleurs, de rares travaux ont montré l'intérêt de l'utilisation de la technique de l'ultrafiltration dans la séparation des protéines inactives et la concentration des extraits (**Kumar et al, 2006**).

Les résultats rapportés dans le présent travail ont montré que l'ultrafiltration des extraits bruts du chevreau par passage sur une membrane semi perméable de 100kDa suivi d'une filtration du perméat sur une membrane de 10kDa, a provoqué une concentration des extraits d'un

facteur de 5 (200ml contre 41 ml). Par ailleurs, le taux de protéines passe de 6,95 à 15,83 mg/ml (**Tableau 19**). Les extraits accusent un aspect jaunâtre légèrement visqueux.

Tableau 19 : Caractéristiques des extraits ultrafiltrés

Caractéristiques	Extrait de chevreau
Aspect	Jaunâtre
Volume d'extrait initial (ml)	200
Volume d'extrait final(ml)	41
Facteur de concentration	5
Taux de protéine (mg/ml)	15,83

Dans un autre volet relatif aux paramètres biochimiques de l'ultrafiltration, l'emploi de cette technique nous a permis d'améliorer le rendement de purification, l'activité coagulante spécifique et le facteur de purification pour l'extrait étudié. Le **tableau 20** rapporte les résultats de l'indice de purification de notre extrait enzymatique.

Tableau 20: Indice de purification des extraits enzymatiques ultrafiltrés du chevreau

Etapes de purification	Volume (ml)	AC (U/ml)	Unité totale	Proteine (mg/ml)	Taux de proteine total (mg)	Activite spécifique (U/mg)	Purification relative (fois)	Rendment (%)
Extraction/clarification	200	0,174	34,8	6,95	1390	0,025	1	100
Ultrafiltration	41	1,234	51	15,83	649	0,077	3,08	46,69

Il ressort des résultats qu'un taux élevé en protéines et un rendement important sont observés bien que l'indice de purification demeure faible. Ce constat confirme le principe que l'ultrafiltration est aussi une technique de concentration. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par **Kumar et al (2006)**, un des rares auteurs qui a travaillé sur l'ultrafiltration des extraits de chymosine de jeune caprin.

4.3. Indice AC /AP

L'analyse effectuée donne une activité protéolytique de 0,108 mg/ml pour l'extrait de chevreau. La détermination du rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique (AC/AP) permet d'apprécier l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait. Toutefois, la mesure de l'indice permet de confirmer le pouvoir coagulant des succédanés de la présure. Dans nos conditions expérimentales, l'indice AC/AP de l'extrait enzymatique à l'état brut de l'extrait de chevreau est de 11,42. Cet indice observé chez le chevreau lui confère de bonnes aptitudes à coaguler le lait et par conséquent à être employé en fromagerie. Cependant, En l'absence de références récentes sur l'indice AC/AP chez les extraits d'origine animale et à titre de comparaison, **Mazorra-Manzano et al, (2013)** rapporte que le rapport enregistré dans les extraits de *Cynara cardunculus* connu pour être une excellente source de protéases employé dans la fabrication des fromages PAO (Produit d'Appellation d'Origine) est de 5,19.

4.4. Effet des inhibiteurs :

Tableau 21: Effet la Pepstatine A sur l'activité de la coagulation du lait (MCA) de l'extrait enzymatique du chevreau

Inhibiteur	Concentration (mM)	Activité résiduelle (%)	Activité Inhibée (%)
Controle	0	100	0
Pepstatin A	0,02	4.8	95.2
	0,1	3.2	96.8

Le tableau 21 montre que la Pepstatine A à 0.02 mM à éliminer jusqu'à 95% de l'activité enzymatique Et 96% à 0.1mM. Cette inhibition significative suggère la présence d'une Aspartylprotéase dans l'extrait enzymatique. Des résultats similaires ont été rapportés chez la même espèce

4.5. Caractérisations de l'extrait coagulant ultrafiltré

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

La mesure de l'activité coagulante est déterminée en mesurant le temps de coagulation selon la méthode de Berridge (1952).

4.5.1. Détermination de la température optimale d'activité

L'effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique du chevreau est déterminé aux valeurs de l'intervalle de 25 à 65 °C avec un pas de 5°C

Au-dessus de 25 °C, l'activité coagulante des extraits augmente progressivement jusqu'à 45 °C pour laquelle l'activité est maximale. La température optimale pour la coagulation du lait par la présure à pH 6,6 est d'environ 45 °C (**Lucey, 2002**).

A température de 60°C, on observe une instabilité de l'enzyme de chevreau suivi d'une faible activité et devient inactive à 65°C. L'optimum d'activité se situe vers 45°. Pour **kumar et al (2006)**, cet optimum est observé à 30°C pour la chymosine caprine mais rejoint nos résultats quant à l'inhibition totale de l'enzyme vers 65°C. Chez les petits ruminants, la chymosine de caprin est plus stable que celle du bovin (**Elagalamy, 2000**). Par ailleurs le chauffage du lait, substrat des enzymes protéolytiques, influence significativement l'activité coagulante ; En effet, un maximum d'activité est observé à 65°C à pH 5,5 et à 75°C l'inactivation est totale (**Kumar, 2006**). Il faut rappeler que cette température a un effet pasteurisateur du lait. En revanche, le maximum d'activité se situe à une température du lait de 45°C et pH 6,5 pour la chymosine recombinante (**Walsh and Li, 2000**) et pour la chymosine bovine native (**Fox, 1969**).

En définitif, il faut signaler que nos résultats se rapprochent de ceux de la présure commerciale bien que cette dernière est également un succédané de la présure traditionnelle *Aspergillus niger var. awamori* produisant de la chymosine clonée. En effet, selon **Garnot et Martin, 1980 ; Mahaut et al, 2003**, la présure est caractérisée par une activité coagulante optimale au voisinage de 42 °C et devient nulle à 65 °C.

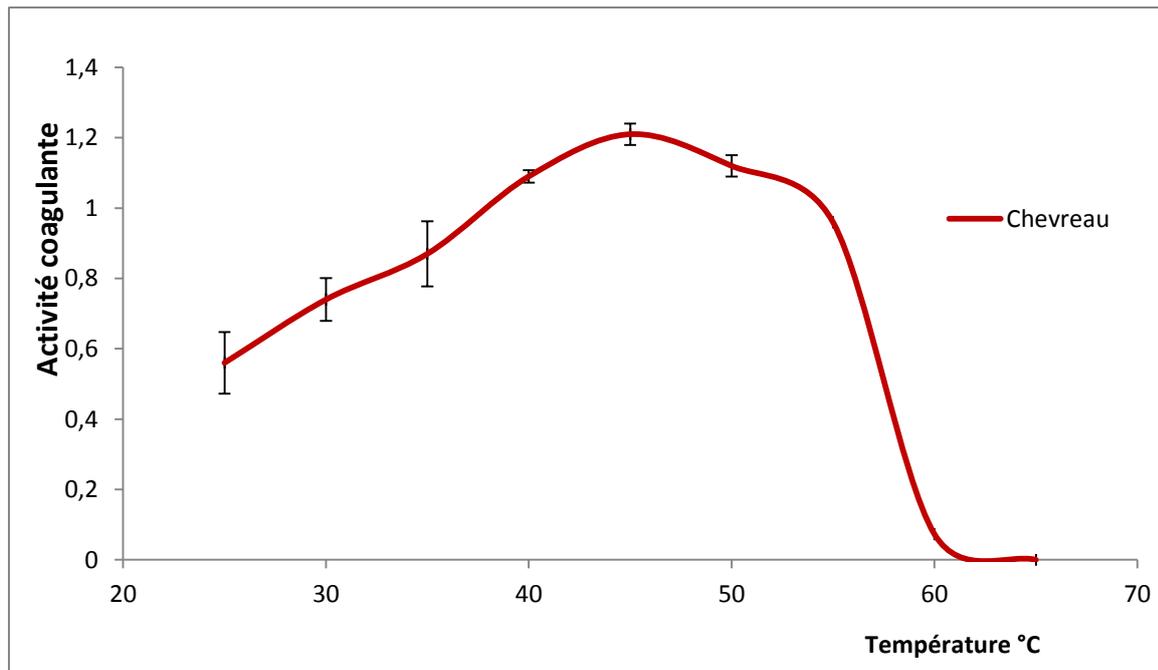


Figure 30: Influence de température de lait sur l'activité coagulante

Toutefois, il faut noter que l'effet de la température résulte de la conjugaison de deux effets, l'un sur la réaction enzymatique, l'autre sur la phase secondaire de la coagulation et qui correspond à l'étape d'agrégation. En effet, la coagulation du lait ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures ou égales à 18 °C. Cela est due à l'importance des interactions hydrophobes dans l'agrégation des micelles hydrolysées (**Brinkhuis et Payens, 1984, Lucey, 2002**).

4.5.2. Influence de pH du lait

L'effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de chevreau et de l'adulte a été étudié en ajustant le pH du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 5,0 à 7,0 avec un pas de 0,5.

La figure 31 montre l'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de chevreau.

A pH 5 il y a apparition des floccules avant d'ajouter l'enzyme, nous sommes dans le cas d'une coagulation acide ($\text{pH} \approx \text{pH}_i$ de la caséine).

Les résultats indiquent une activité coagulante optimale au pH 5,5 notre extrait, et à pH 7 on observe une instabilité de l'enzyme de chevreau suivi d'une faible activité et devient inactive à pH 7,5.

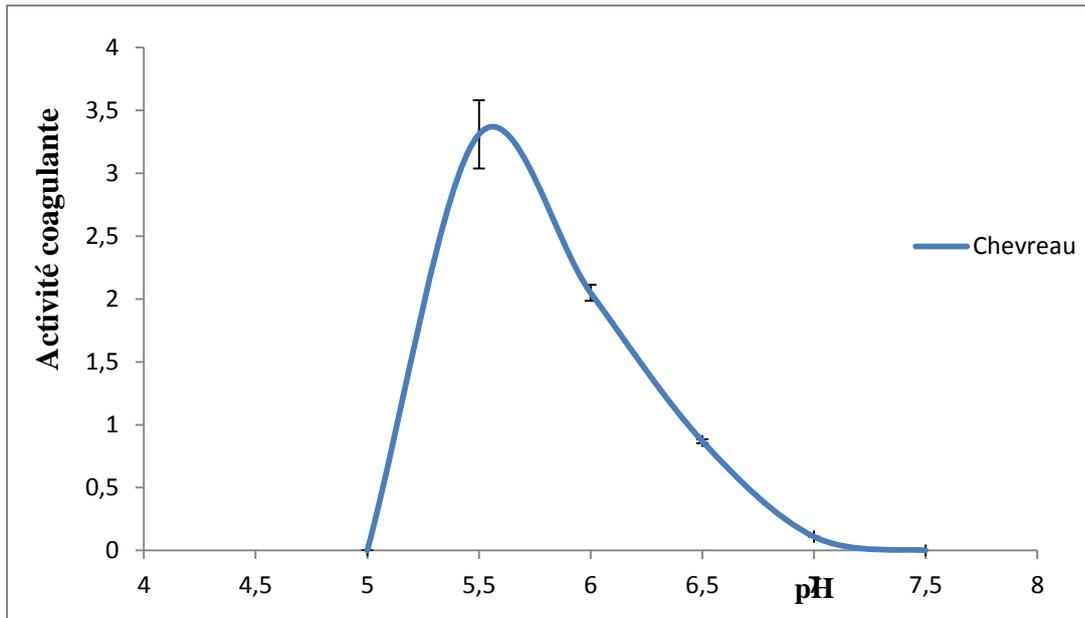


Figure 31: Influence de PH de lait sur l'activité coagulante.

Selon **Ramet et Weber (1980)** et **Cheesman (1981)** ce phénomène constitue la conséquence de l'influence de pH à la fois sur l'activité de la présure, maximale à pH 5,5 et sur la stabilité des micelles qui décroît avec le pH, par neutralisation des charges négatives (précipitation des caséines à PH 4,65) et libération d'ions Ca^{++} , qui migrent vers la solution (lactosérum). En revanche, à pH élevé (supérieur à 7), il y'a plus de coagulation l'enzyme étant inactivée rapidement

4.5.3. Influence de CaCl_2

L'addition du chlorure de calcium au lait, pratique courante en fromagerie, a pour effet de réduire le temps de coagulation et accroître la fermeté de coagulum (**Eck, 1990**). La figure 32 montre l'influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de l'extrait de chevreau.

Cette figure montre que l'activité coagulante relative augmente avec la concentration en CaCl_2 . L'activité optimale pour l'extrait de chevreau est obtenue pour une concentration de **0,04 M**. Pour les concentrations supérieures, l'activité baisse par un effet inhibiteur de l'ion calcium. L'inhibition est expliquée en partie par la précipitation d'une partie de caséine du lait (**Cheftel 1977**).

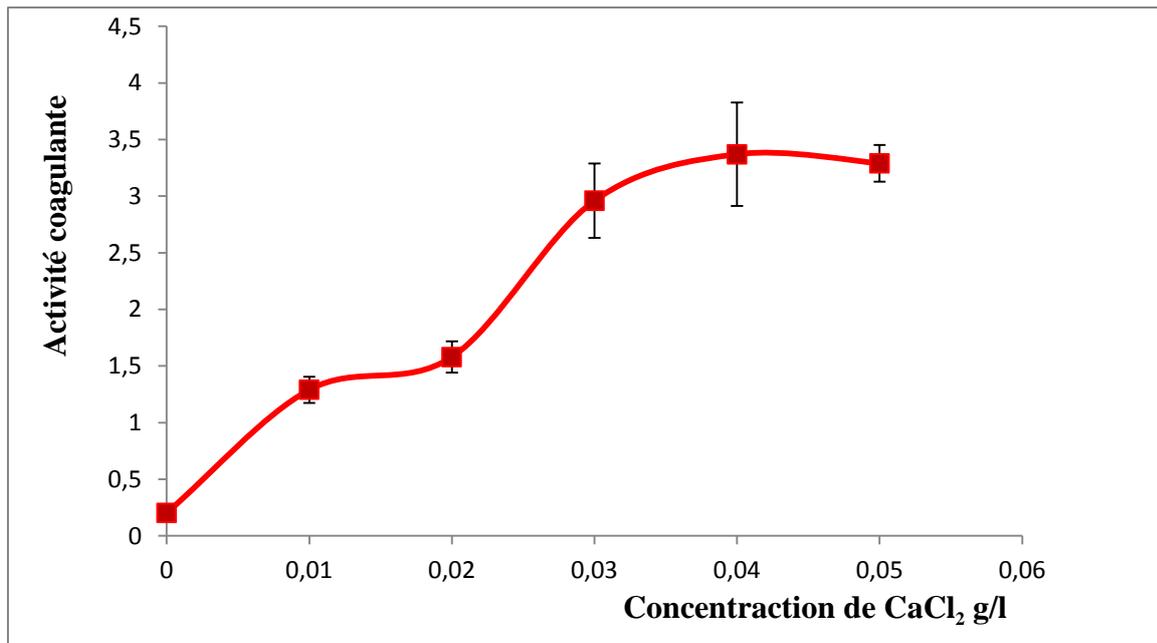


Figure 32: Influence de CaCl₂ sur l'activité coagulante

La présence de calcium ionisé est indispensable à l'accomplissement de la phase secondaire de la coagulation qui conduit, après protéolyse spécifique de la caséine Kappa par l'enzyme coagulant, à l'agrégation des micelles pour former un réseau constituant le coagulum (**Ramet, 1985 ; Ramet, 1994**).

Un lait pauvre en calcium coagule difficilement et conduit à un gel mou qui se tient mal. La teneur en calcium a en effet un impact important sur le temps de coagulation et sur la consistance de gel obtenu (**Ramet, 1991**).

En fromagerie, l'addition au lait de chlorure de calcium est une pratique courante à certaines saisons et/ou dans certaines régions pour corriger les insuffisances que peuvent présenter les aptitudes coagulantes des laits frais.

4.5.4. Influence de la concentration en extrait enzymatique

L'influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante a été déterminée en variant la teneur en protéine d'extrait en 25% à 100%.

La figure 33 indique que l'activité coagulante relative augmente avec l'augmentation de la quantité d'extrait enzymatique de chevreau.

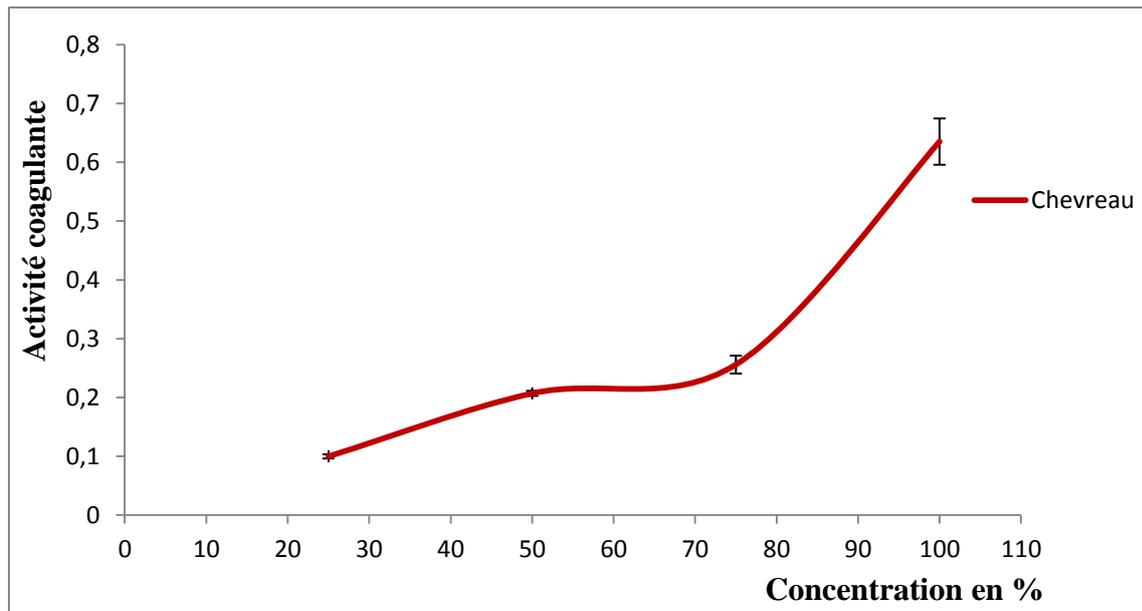


Figure 33 : Influence de concentration d'enzyme sur l'activité coagulante.

D'une manière générale, nos résultats concordent bien avec les travaux de (**Garnot et Martin, 1980**) qui ont montré que l'activité coagulante relative de la présure croit linéairement en fonction de sa concentration lorsque celle-ci est faible, ce qui correspond aux doses employées en fromagerie.

4.6. Cinétique de l'activité protéolytique

Toutes les coagulases qu'elles soient animales, végétales ou microbiennes, sont capables d'hydrolyser la caséine κ , provoquant ainsi la coagulation du lait. Toutefois cette condition est suffisante pour l'utilisation de ces enzymes en industrie fromagère (**Alais, 1984**). Cependant, pour assurer un bon rendement fromager et pour éviter certains défauts de goût et de texture qui peuvent apparaître sur les fromages. Ces coagulases doivent présenter une protéolyse générale faible.

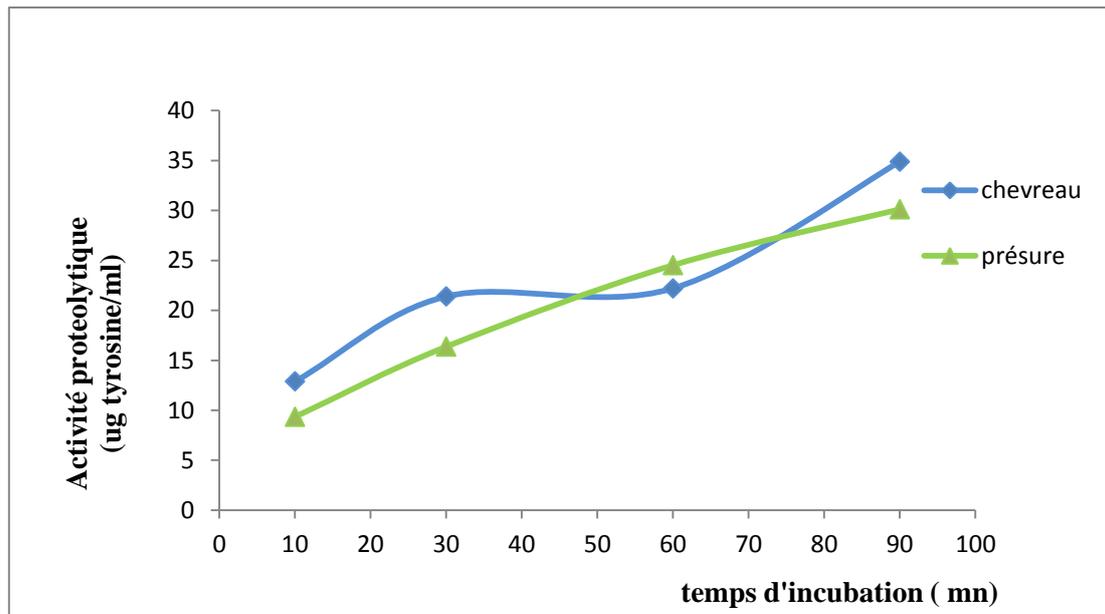


Figure 34 : Cinétique de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique de chevreau et de présure commerciale.

La chymosine en général est la présure qui hydrolyse d'une manière spécifique les liaisons Phet –Met des caséines du lait. En revanche, la pepsine ne possède pas cette spécificité et hydrolyse les liaisons peptidiques impliquant les acides aminés aromatiques Phe, Tyr et Trp (**Moschopoulou, 2011**). D'après la cinétique de protéolyse de la **figure 34**, l'activité protéolytique observée dans l'extrait enzymatique et de la présure commerciale suit une allure identique mais avec une protéolyse plus faible chez la présure commerciale. Elle se caractérise par une évolution lente puis tendance vers une stabilisation de l'effet de protéolyse des enzymes. Cependant, l'extrait de chevreau ne semble pas suivre cette tendance dans nos conditions expérimentales. En effet, on observe une libération plus importante de peptides (environ 35 µg /ml exprimé en tyrosine contre 30µg /ml pour l'extrait adulte) après 90 mn d'incubation. Il faut bien souligner que d'après **Goursaud (1992)**, la chymosine possède une vitesse de protéolyse supérieure à pH 6,8.

4.7. Purification de l'extrait enzymatique brut issu de la caillette de chevreau :

La **figure 35** illustre le profil d'éluion de l'EEB de chevreau, en faisant apparaître un seul pic doué d'activité coagulante, dont la mesure de l'activité coagulante a été effectuée au niveau de chaque fraction.

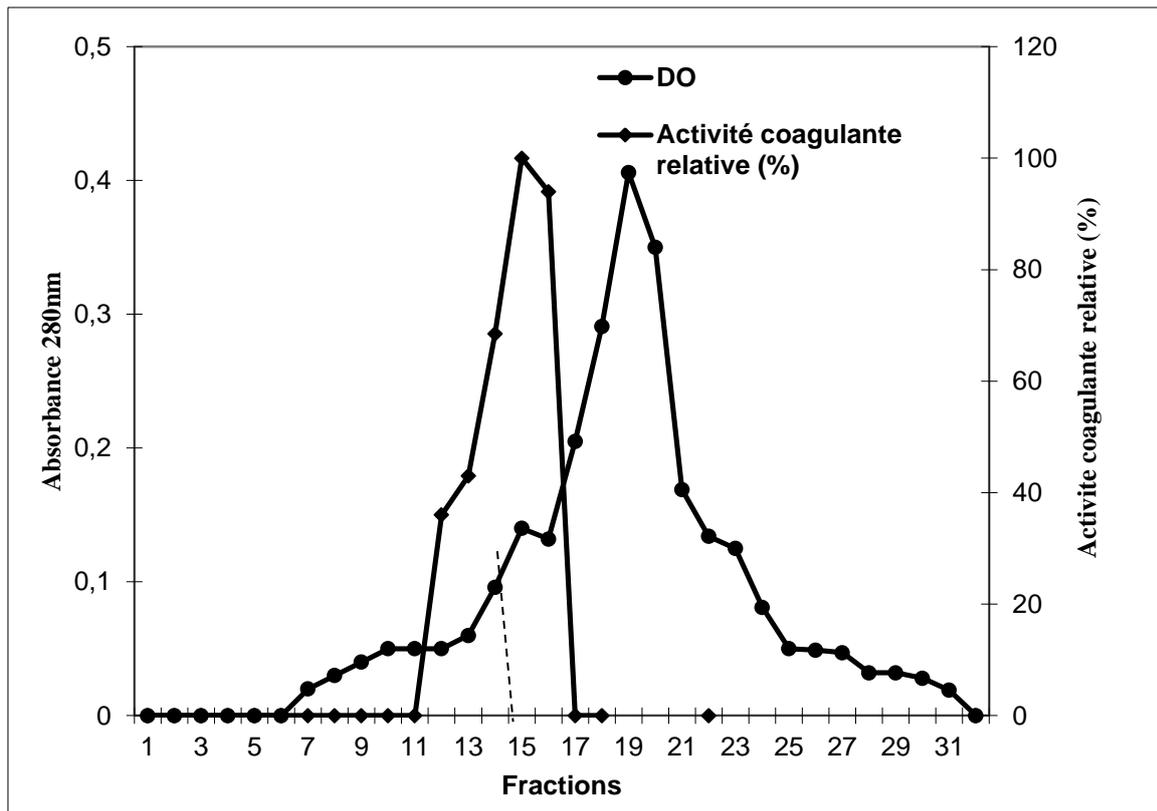


Figure 35 : Profil d'élution sur Sephadex G-75 de l'extrait enzymatique brut issue de caillette de chevreau, (colonne 1x30cm, tampon d'élution phosphate 0,1M pH 5,5, débit 0,3ml/min, fraction 2 ml).

L'enzyme coagulante pour ce profil a été retrouvée dans les fractions 12, 13, 14 et 15 ce qui semble prédire que l'élution a donné 2 pics dont le premier est actif (prolongement du pic en pointillé réalisé d'une manière fictive) avec un volume d'élution de 10ml et sa force de 0.17 UP. Le second pic qui débute à partir de la fraction 16 est probablement une protéine contaminante de l'extrait apparue après une exclusion moléculaire.

4.8. Détermination du poids moléculaire

Le poids moléculaire de la protéine active a été estimée à partir de droit étalon des protéines standards (γ -Globuline (158 k Da), BSA (67 k Da), Trypsine (23,8 k Da)) et dont profils chromatographique ont été obtenue par gel filtration sur séphadex G- 75 comme illustre la **figure 36**.

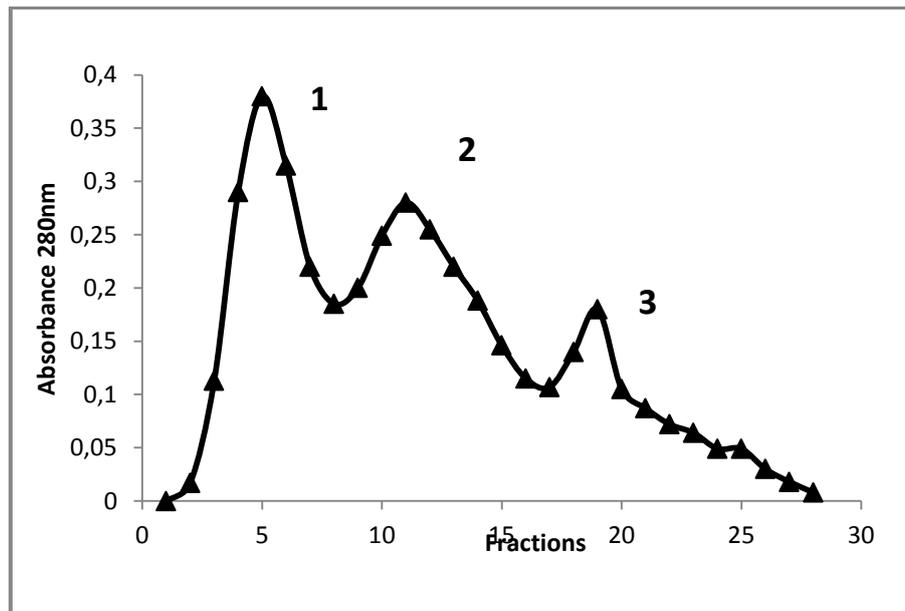


Figure 36 : Profil d'élution sur Sephadex G-75 des protéines standards. (Colonne *SpectraChrom* (1 x 30 cm), tampon d'élution Acétate (0,01 M; pH 5,5), débit : 0,66ml /mn, Fraction de 2,5ml). Proteines standards :1- γ -Globuline (158 k Da), 2- BSA (67 k Da),3 – Trypsine (23,8 k Da)

Il existe une relation linéaire entre le volume d'élution d'une substance et le logarithme de masse moléculaire (*Cf. Matériels et méthodes*). Le **tableau 22** résume les résultats obtenus.

Tableau 22: détermination du poids moléculaire de la fraction active du chevreau

Protéines	Poids moléculaire (K Da)	Volume d'élution (ml)	Log PM
γ -Globuline	158	10	5,19
BSA	67	22	4,82
Trypsine	23,8	36	4,37
Pic actif chevreau	32,5 – 18,5	30 - 34	4,41 – 4,26

Ces résultats est en concordance avec ceux rapportés par des chercheurs. Selon **Garnot et Martin (1980)**, la chymosine et la pepsine sont caractérisées par une masse de **30 000 Da** et de **35 000 Da** respectivement.

La différence de poids moléculaire indique que cette caractéristique dépend de l'origine de la coagulase Ainsi, les travaux portés sur les coagulases animales ont indiqué des poids moléculaires compris entre 31 000 et 40 000 Da (**Moschopoulou, 2011**).

4.9. Electrophorèse SDS-PAGE :

A fin de déterminer l'homogénéité de notre protéase extraite, la fraction active récupérée après purification sur gel filtration a été soumise à une Electrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE), les résultats sont indiqués dans la figure suivante

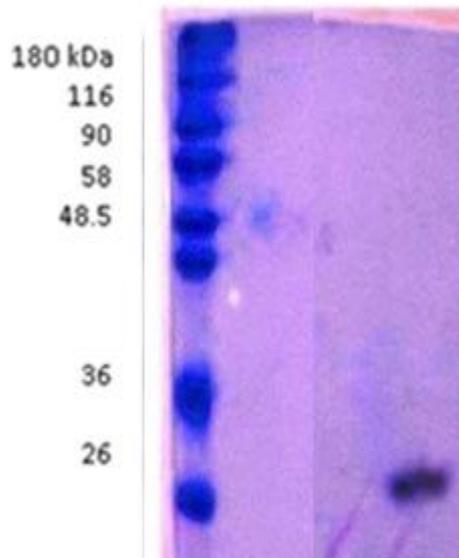


Figure 37 : Profil électrophorétique de la fraction active de l'enzyme du chevreau récupérée d'une gel filtration ; Marqueur utilisés : (Alpha 2 macroglobuline from equine serum : 180 kDa ; β -galactosidase from E.Coli : 116 kDa ; Lactoferrin from human milk : 90 kDa ; Pyruvate kinase (rabbit muscle) : 58 kDa ; Fumarase (porcine heart) 48.5 kDa ; Lactic déhydrogénase (rabbit muscle) 36.5 kDa ; Triosephosphate isomérase 26 kDa).

Le profil électrophorétique montre que la fraction active étudiée apparaît comme une bande homogène et l'élution de la protéase purifiée produit un seul pôle doué d'activité protéolytique. Cette bande est suivie d'une bande de poids moléculaire inférieur, mais la bande de 27 kDa s'est révélée la plus importante (**Figure 37**). Ces résultats se rapprochent à une étude sur la chymosine de buffle (23KDa) (**Amourache et Vijayalakshmi, 1984; Donnelly et al., 1986**), et se contredisent avec quelques études sur les ruminants (**Faccia M. et al 2012, Moschopoulou et al., 2006 (chèvre), Mohanty et al., 2003; Abdel Malak et al., 1996, (le buffle) et Baudys et al., 1988**), bovine (**Foltman, 1992; Donnelly et al., 1986 (agneau)**); cette différence est peut être due à un éventuel polymorphisme génétique ou dégradation de la chymosine native.

Conclusion :

Dans l'optique de recherche sur les succédanés de la présure utile en industrie fromagère, notre travail a porté sur l'extraction de l'agent coagulant à partir de la caillette de chevreau. L'étude de leur propriété coagulante et protéolytique, les caractéristiques biochimiques constituaient les principaux objectifs présentés dans cette partie.

Ainsi, La valorisation des systèmes gastriques du caprin comme sources potentielles des protéases coagulant le lait, a permis de contribuer à une ébauche de connaissance des propriétés de l'extrait enzymatique.

L'extrait brut clarifié de chevreau donne un taux de protéine de **6,95 mg/ml** avec une activité coagulante de **0,174 UP/ml**.

L'application de la technique de l'ultrafiltration, et en la comparant la technique de purification par précipitation au sulfate d'ammonium, nous permis de concentrer et d'améliorer significativement la teneur en protéines. Cette étape permet d'avoir un rendement de **46,69 %** avec un taux de protéine de **15,83 mg/ml** et une activité coagulante de **1,234UP/ml**.

Afin d'évaluer la capacité des extraits enzymatiques à coaguler le lait, la mesure du rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique a été déterminé. Les résultats observés ont montré que l'extrait de chevreau ultrafiltré a donné une activité protéolytique de **0,108 mg/ml**, avec un indice **AC/AP de 11,42**.

Les conditions optimales de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique ultrafiltré ont été déterminées selon la méthode de **Berridge (1952)** elle sont été caractérisées par une température de **45°C** avec un pH de **5,5**, l'adjonction d'une quantité de **0,04 mole** de CaCl_2 à un litre de lait peut induire une amélioration de l'activité notre extrait.

La purification de l'extrait enzymatique brut par chromatographie d'exclusion moléculaire a donné un profil d'élution caractéristiques de la chymosine. Par ailleurs, le poids moléculaire a été estimé et évalué à environ **32 kDa** à partir d'une élution sur colonne de gel sephadex G-75 de protéines standards à savoir, la γ -Globuline 158 k Da, la Sérum albumine bovine (BSA) : 67 k Da et la trypsine : 23,8 k Da. Quant à la séparation par SDS-PAGE nous a indiqué une bande monomère de poids moléculaire de **27kDa**.

L'étude de l'effet des inhibiteurs nous a permis de définir notre extrait comme Aspartylprotéase vu la sensibilité qui l'a manifestée envers la pepstatine.

L'approche scientifique des travaux est déterminante pour la suite de l'étude sur les enzymes de remplacement suivie de la motivation d'application en termes d'économie à travers la publication des premiers résultats.

Si l'intérêt scientifique sera évalué ultérieurement, il est intéressant à notre avis d'avoir notre propre approche d'appréciation :

Actuellement les substituts d'origine fongique dominent le marché mondial des agents coagulant des laits comparés aux présures de remplacement d'origine animale. Certes, le génie génétique a développé le clonage de la Chymosine de veau et constitue aujourd'hui, avec quelques rares restrictions réglementaires une autre voie d'application dont l'emploi en fromagerie est en pleine croissance. Les enzymes d'origines gastriques sont aussi une autre voie d'application en technologie fromagère bien que le doute persiste chez le consommateur en matière de pathologie nouvelle. Toutefois, les laitages à base de lait de chèvre sont très appréciés à travers le monde et il est important d'intégrer des facteurs intrinsèques ayant la même origine c'est à dire le lait de chèvre et les extraits enzymatiques de chevreau.

Références bibliographiques

- **Abd El-Fattah A.F. and El-Hawwary N.M. (1974).** Studies on the production of milk clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi, *J. Gen. Microbiol.* 84, 327–331.
- **Abdel Malak C.A., Abou El Adab I.F., Vukashinovic V., Zalunin I.A., Timokhina E.A., Lavrenova G.I. and Stepanov V.M.(1996).** Buffalo (*Bos buffali* L) chymosin purification and properties, *Comp. Biochem. Physiol.*, B 113, 57—62.
- **Alais C. (1984),**Science du lait : *principes des techniques laitières*, 4^{ème} édition, Paris, 814p.
- Amourache L. and Vijayalaksh M.A. (1984).** Affinity chromatography of kid chymosin on histidyl-sepharose, *J. Chromatogr.* 303, 285–290.
- Andren A. and Bjorck L. (1986).** Milk feeding maintains the prochymosin production in cells of bovine abomasal mucosa, *Acta. Physiol. Scand.*, 126, 419- 227.
- **Baudys M., Erdene T.G., Kostka V., Pavlik M. and Foltmann B. (1988).**Comparison between prochymosin and pepsinogen from lamb and calf, *Comp. Biochem. Physiol.* B 89, 385–391
- **Beka Robert G., Krier F., Magali B. , Valentin D. , Guiama B., Pauline D. ,David G., Carl M., Krasimir Dimitrov A., Marie-Christine S. , Didier Guillochon A. and Dominique V.M. (2014).** Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp, *Inter. Dairy J.* 34, 25-31.
- **Berridge N. J. (1952).** An improved method of observing the clotting of milk containing rennin, *J. of Dairy Res.*, 9, 328–329.
- **Brinkhuis J. and Payens T.A. (1984).** The influence of temperature on the flocculation rate of renneted casein micelles, *Biophys. Chem.* 1984;19:75–81.
- **Cheesman G. (1981).** Présure et fabrication de fromage, *enzyme and food process. Applied, publishers.* Ltd. London.85.
- Cheftel J.C. , Cheftel H. and Besancon P. ,(1977).** Laits et produits laitiers. In « *Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments* ». Paris, Ed. Tech. et Doc. Lavoisier, 801p.
- **Donnelly W.J., Carroll D.P., O'Callaghan D.M. and Walls D. (1986).** Genetic polymorphism of bovine chymosin, *J. Dairy Res.* 53, 657—664.
- **ECK A. (1990).** Le fromage, Ed .Tech. et Doc. Lavoisier (2ème édition).539 p. vie
- **Elagalamy E.I. (2000).** Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet. A comparison with buffalo rennet, *J. Dairy Res.*, 67, 73-81.

- Faccia M. (2012).** Influence of mould size and rennet on pro- teolysis and composition of Canestrato Pugliese cheese, *Ital. J. Food Sc.* 10, 217–228.
- **Foltman B. (1970).** Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin), *Methods Enzymol.* 19, 421–436.
- Foltman B. (1992).** Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 52, 65–79.
- Foltman B. (1993).** General and molecular aspects of rennets, *Cheese Chem. Physics and Microbio.*, vol. 1, pp. 37–88.
- **Fox P.F. (1969).** Milk clotting and proteolytic activities of rennet and bovine pepsin and porcine pepsin, *J. Dairy Res.*, 36, 427-433.
- **Garnot P. and Martin P. (1980).** Présure, composition, activité, son rôle en fromagerie, *Technique Laitière*, 930, 27-30.
- **Garnot P., Toullec R., Thapon J.L., Hoang M. T., Marthieu C.M. and Ribadeau-Dumas B. (1977).** Influence of age, dietary protein and weaning on calf abomasal enzymic section, *J. Dairy Res.*, 44, 9-23.
- **Goursaud J. (1992).** Coagulation enzymatique du lait, In “ *Biotechnologie*”.Ed. Tec. Doc. Lavoisier, Paris.
- **Green M.L. and Stackpoole A. (1975).** The preparation and assesment of a suitable Mucorpusillus Lindt proteinase-swine pepsine mixture for Cheeddar cheesemaking, *J. Dairy res.*, 42:297 – 312.
- Green M .L. (1972).** .Assessment of swine, bovine and chicken pepsins as substitutes for cheddar cheese –making ,*J.Dairy Res .* , 39,261.
- **He X., Ren F., Guo H., Zhang W., Song X. and Gan B. (2010).** Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4, *Korean J. of Chem. Engineering*, 28, 203-208.
- **Jacob M., Jaros D. and Roham H. (2011).** Recent advances in milk clotting enzymes, *Int. J. Dairy Tech.*, 64, 14-33.
- **Kamoun P., (1991).** Appareils et méthodes en biochimie, 4e édition, *Flammarion Médecine Sc. Parie.* P. 80-84.
- **Kumar A, Sharma J, Mohanty A.K, Grover S and Batish V.K. (2006).** Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem. and Molecular Biol.*,145(1), 108 – 113
- **Laemmli U.K. (1970).**Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-5
- **Leite Júnior B. R., Alline Artigiani L.T. and Marcelo C. (2014).** Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process, *Innovative Food Sc. and Emerging Tech.*, 21, 44–49

- **Lo Piero A.R., Puglisi I. and Petrone G. (2011)** .Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk, *Eur.Food Res. Tech.* 233, 517–524.
- Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951)**. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- **Lucey J.A. (2002)a**. Rennet coagulation of milk pp286-293 in *Encyclopedia of Dairy Sc.* Roginski H., Fuquay J. Fox P. Elsevier
- Lucey J.A. (2002)b**. ADSA Foundation Scholar Award, Formation and physical properties of milk protein gels, *J. Dairy Sci.* 85, 281-294
- **Mahaut M., Jeantet R and Brule G, (2003)**.Initiation à la technologie fromagère,*Tec. Doc. Lavoisier.* Paris. 194 p.
- **Majumder R., Banik S.P., and Khowala S. (2015)**.Purification and characterisation of kappa-casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091, *Food chem.*173, 441 .
- **Mazorra-Manzano M.A., Perea-Gutiérrez T.C., Lugo-Sánchez M.E., Merheb C.W., Hamilton C., Eleni G., and Da-Silva R., (2013)**. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* and its hydrolytic activity on bovine casein, *Food Chem.* 104, 127.
- **Mohanty A.K., Mukhopadhyay U.K., Kaushik J.K., Grover S. and Batish V.K. (2003)**. Isolation, purification and characterization of chymosin from reverinebuffalo (*Bulbalus bubalis*), *J. Dairy Res.* 70, 37–43.
- Maurel A. (1989)**. Osmose inverse et ultrafiltration, *II – Tech. et applications Techniques de l'ingénieur*, J 2796 - J 2798,
- Moschopoulou E., Kandarakis I., Alichanidis E. and Anifantakis E. (2006)**.Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *J. Dairy Res.* 73, 49–57
- Moschopoulou E. (2011)**. Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production, *Small Ruminant Res.*, 101(1), 188–195
- **O’leary P.A. and Fox P.F. (1973)**.ovine pepsin suitability as a rennet substitute. *Ir. J. Agric. Res.*, 12,267-273.
- **Puglisi I., Petrone G. and Lo Piero AR. (2014)**.A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheesemanufacture, *Food and bioprod. process.*, 92, 67–72.
- **Ramet J. P. and Weber F. (1980)**. Contribution à l’étude de l’influence des facteurs du milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le Lait*, 60, 1-13.
- Ramet J.P. (1985)**. *La fromagerie et les variétés du bassin méditerranéen*.187p.
- Ramet J.P. (1985)**.Study of Enzymatic Coagulation of Camel Milk in *Soudia – Arabia.Mission Report,FAO*

- Ramet J.P. (1991).** La transformation en fromages de lait de dromadaire. *Revue Mondiale de zootech.*, n°67,20-28.
- Ramet J.P.(1994).** Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication de fromage au lait de dromadaire. Actes du Colloque : "*Dromadaires et chameaux animaux laitiers*", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- Renner E and Abd EL-Salam M.H, (1991).**Application of ultrafiltration *in the dairy industry*,londres Elsevier Applied Science,371 p.
- Shieh C.-J.,Phan Thi L.-A. and Shih I.L. (2009).** Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis natto*, *Biochem. Engineering J.*, 43, 85-91.
- Shamtsyan M., Dmitriyeva T., Kolesnikov B. and Denisova N. (2014).** Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial Mushroom. *LWT , Food Sc. and Tech.*, 58, 343-347.
- Sidikou I.D., Remy B., Hornick J.L., Losson B., Duquesnoy N., Yenikoye A. and Beckers J.F. (2005).** Le pepsinogène et la prochymosine des bovins: connaissances actuelles, applications et perspectives dans la stratégie de lutte contre les verminoses gastro-intestinales, *Ann. Méd. Vét*, vol. 149, p. 213-228.
- Soxhlet F. (1877).** Die Darstellung haltbarer Labflussigkeiten, *Milch-Ztg* 6, 497–501.
- Valles E. and Furet J.P. (1977).** Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention des extrait coagulants à base de pepsine bovine ; méthode d'extraction, *Lait*, 61, 601-617.
- Walsh M.K. and Li X. (2000).** Thermal stability of acid proteinases. *J. Dairy Res.* 67, 637–640.

Chapitre IV : Effet catalytique des extraits purifiés sur les caséines des laits bovin et caprin

1. Résumé

En industrie laitière, le caractère fluctuant de l'approvisionnement en présure a conduit à l'emploi de préparations enzymatiques d'origines diverses, Hydrolysant les fractions caséiniques du lait de façon analogue à la présure. Les profils hydrolytiques fournis par la méthode HPLC en phase inverse sur le gel coagulum formé après 40mn d'incubation avec nos trois protéases végétale, animale et bactérienne sont très proches des profils de la présure commerciale ; une apparition d'hydrolyse des extraits purifiés sur les caséines α et une dégradation totale de la κ caséine à la 40eme mn de réaction. Cependant une protéolyse secondaire est observée chez les caséines entières des laits et la caséine commerciale néanmoins l'extrait de tournesol a incité une hydrolyse générale des caséines.

2. Introduction

Dans les anciens travaux relatifs à l'action catalytiques des présures traditionnelles sur les caséines particulièrement celle issues des laits de jeunes bovins, **Green et Foster en 1974**, rapportent que la caogulation est le resultat du clivage de la caseine Kappa au niveau de la liaison Phe₁₀₅- Met₁₀₆. Ces enzymes exercent au cours de l'affinage , une action de protéolyse générale sur les caséines α et les caséines β dont la coupure des liaisons sensibles produit des peptides qui pourraient contribuer aux modifications de texture observées au cours de l'affinage des fromages et fait remarquer que ces fractions caseiniques sont très résistantes à l'action de la présure.

Par ailleurs, selon **Visser et De Groot-Mostert (1977)** Les présures d'origine microbienne se révèlent plus protéolytiques que la chymosine et dégradent plus tôt et plus rapidement la caséine β .

Dans un autre volet de la littérature, les présures d'origine végétale ont fait l'objet de nombreux travaux, elles sont utilisées comme source de protéases en raison de leur disponibilité, des processus de purification efficaces et l'isolement d'un coagulant naturel. En outre, leur emploi améliore l'acceptabilité et possèdent l'avantage d'améliorer les propriétés nutritionnelles et digestives des populations (**Duarte et al., 2009**).

Plusieurs travaux ont été réalisés sur la recherche de substituts de la présure à partir des microorganismes (Yegin et al., 2012; Kumar et al., 2005), de sous produits d'animaux (D'ambrosio et al., 2003) ou de plante (Silva et Malcata, 2005; Raposo et Domingos, 2008) susceptibles d'être employés dans l'industrie fromagère. En dépit des hypothèses émises sur les mécanismes par lesquels ces protéases agissent lors de la coagulation des laits, cependant et plus récemment, Anusha et al., (2014) a rapporté que les mécanismes d'hydrolyse des caséines n'est pas toujours claire et des doutes subsistent encore quant à leur profil hydrolytique et à leur potentiel réel d'application industrielle en tant que succédanés. Le but de la présente étude est un élément de réponse à ces hypothèses, qui repose sur la comparaison des activités catalytiques des extraits enzymatiques purifiés d'origine microbienne, végétale et animale sur les caséines des laits bovins et caprins. Les essais porteront seulement sur le gel coagulum formé après 40mn d'incubation et l'évaluation des profils hydrolytiques formés par la méthode HPLC en phase inverse.

3. Matériel et méthodes

3.1.Obtention des extraits purifiés

La méthodologie appliquée pour l'extraction et la purification des différents extraits enzymatiques étudiés est décrite dans les chapitres précédents (*Cf. Matériels et méthodes des chapitres I, II et III*)

Les essais d'hydrolyse des différentes caséines est réalisé à partir des extraits lyophilisés et dilués dans du tampon phosphate, pH 6,4 à 100m M contenant de l'azide de sodium à 0,02 % (m/v), à raison de 10 mg/ml selon la technique rapportée par **McSweeney et al., (1993)**.

3.2. Préparation des caséines entières des laits bovins et caprins

L'extraction des caséines entières est réalisée sur des laits de grand mélange (mélange de races) d'origine bovine et caprine. Le lait chauffé à 32°C est dégraissé par centrifugation à 3000g à température ambiante pendant 30mn et les caséines entières sont isolées par précipitation isoélectrique à pH 4,6 avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 1 molaire. Le précipité obtenu est lavé 3 fois avec de l'eau distillée, solubilisé à pH 7 à l'aide d'une solution de NaOH 1M dialysé à froid et lyophilisé (**Egito et al. 2007**).

3.3. Effet catalytique des extraits enzymatiques purifiés sur les caséines entières et les standards caseiniques

La préparation des solutions et l'effet d'hydrolyse des caséines ont été étudiés selon la méthode décrite par **Yüksel et Erdem (2009)**. Les caséines entières isolées, la caséine commerciale et les fractions caseiniques (Caséine κ , α et β) (Sigma chemicals, USA) sont dissous dans une solution tampon phosphate pH 6,4, 100mM à la concentration de 10 mg/ml. 200ul de chaque solution protéique sont mis à incuber en présence de 100ul de protease lyophilisé à 37°C pendant 40 mn. La réaction d'hydrolyse est stoppée par un chauffage à 95°C pendant 30mn. La solution d'hydrolysats obtenue est complétée à 1 ml avec du tampon phosphate (précédemment utilisé) est filtrée a travers un filtre seringue de 0,45um (**Silva et malcata, 2000**). Il est utile de rappeler que la durée d'hydrolyse (ou d'incubation) de 40 mn a été choisi par rapport aux conditions industrielles dont le temps de coagulation et de formation du gel présure avoisine la durée rapportée. Ces conditions sont issues du diagramme technologique de fabrication de l'Edam tel qu'il est élaboré au niveau de la laiterie fromagerie de Boudouaou (LFB).

L'analyse par chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC) des hydrolysats est réalisée a l'aide d'un HPLC Agilent series 1100 muni d'un logiciel *Chem Station for LC, Rev.A.10.02 [1757]*. Il est composé d'un formeur de gradient binaire, d'une colonne analytique C₁₈ (4,6 X 250 mm) à phase inverse de porosité 5 µm de diamètre et d'un détecteur UV.

Les conditions chromatographiques suivantes sont décrites dans le travail de **Yüksel et Erdem (2009)** portant sur la détection des protéines du lait par la RP-HPLC.

Solvants d'elution :

Solvant A: Acetonitrile, eau et acide trifluoroacetique dans le rapport 100:900:1 (v/v/v).

Solvant B: Acetonitrile, eau et acide trifluoroacetique dans le rapport 900:100:1 (v/v/v).

Conditions d'analyse :

Durée d'analyse: 30 minutes.

Température de la colonne: 25 °C.

Débit d'élution; 1.0 ml/ min.

Longueur d'onde de détection : 220 nm.

Volume injecté: 20 µL

Le programme de gradient d'élution de solvant a débuté à 20% du solvant B, et il a été généré immédiatement après l'injection de l'échantillon en augmentant la proportion de solvant B à 46% à la fin du cycle. Ensuite a été retourné aux conditions démarrées en 2,4 minutes.

4. Résultats et discussion

Le comportement des caséines vis-à-vis des présures de remplacement sélectionnés a été étudié sur un système modèle composé de caséines entières isolées à partir des laits bovins et caprins et séparément sur les fractions caseiniques α , β et κ caséine. Pour rappel, le travail a été réalisé sur des solutions de caséines incubées à 37°C dont le temps d'action des enzymes est limité à 40 mn. Cette valeur exprime la durée qui permet d'obtenir le gel présure ou coagulum, première étape pour la fabrication des différentes variétés de fromage. Les anciens travaux, tels ceux de **El Negoumy (1968)**, ont rapporté un temps identique et conclue que la caséine κ est le seul composant des caséines entières du lait qui est attaqué par la chymosine en 50 minutes.

Faut-il bien rappeler que les mécanismes par lesquels la présure traditionnelle (chymosine extraite de caillètes de veaux non sevrés) coagule le lait, sont des phénomènes très bien étudiés et connus et qu'on retrouve détaillés dans les manuels qui traitent de la technologie fromagère. En effet, La conversion de la caséine en gel est obtenue par l'action hydrolytique de la chymosine sur la κ -caséine (Phe₁₀₅-Met₁₀₆) et l'élimination des macropeptides des micelles de caséine. Cette action spécifique est suivie par une activité mineure de protéolyse générale sur les différentes fractions caseiniques, particulièrement les α et β caséines comme cela a été rapporté par plusieurs auteurs (**Brulé et al., 1997; Dalgleish, 1998;; Pires et al., 1999 ; Walstra et al. 1999; Lucey, 2002; Sandra & Corredig, 2013; De Kruif, 2014**). Qu'en est-il des succédanés de la présure ? Sur ce volet, beaucoup de travaux ont mis en évidence l'interaction de certaines enzymes de remplacement, d'origine animale, végétale ou microbienne avec le substrat caseinique bien que l'action catalytique sur les fractions α et β caséines et les peptides formés a été étudié particulièrement durant l'étape d'affinage des fromages, bien que pour **Egito et al., en 2007** ont rapporté que l'action spécifique des enzymes protéolytiques du tournesol sur les caséines n'est pas encore connue.

Par ailleurs, l'étude d'identification des fractions protéiques du lait ou les peptides formés lors de l'hydrolyse des caséines les protéases a été réalisé en utilisant plusieurs techniques. En effet, Diverses méthodes sont employées, à savoir les techniques électrophorétiques et isoélectrofocalisation (IEF), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par échange ionique, les interactions hydrophobes] et les méthodes en phase inverses ou enfin l'électrophorèse capillaire, l'électrophorèse capillaire en zone et la spectrométrie de masse (**Ng-Kwai-Hang et al., 1984 ; Kim et al., 1994 ; Ana et al., 2002;** . Toutefois, et depuis la

dernière décade, la chromatographie liquide à haute performance particulièrement en phase inverse (RP-HPLC) est de plus en plus utilisée pour être une technique qui permet une analyse rapide et récemment automatisée, caractérisée par de bonnes séparations, des résolutions élevées et une précision et des résultats reproductibles (**Bonfatti et al. (2008)** ; **Bonizzi et al., 2009** ; **Bougherra et al., 2017**)

4.1. Chromatographie des caséines entières et des fractions caseiniques

La **figure 38** représente les profils HPLC des caséines standards (α , β et κ caséines), la caséine commerciale et les caséines entières isolées des laits bovin et caprin. La colonne de phase inverse (ODS C₁₈) utilisée a permis d'éluer les fractions caseiniques dans l'ordre suivant : La caséine K est la première molécule éluee avec un temps de rétention qui avoisine les 19 mn, suivie de la α -CN (24 mn) et enfin la B-CN avec une élution à 27 mn environ (**Figure 38 a, b, c**). Dans nos conditions expérimentales, la fraction de β -CN est mal résolue et éluee avec un épaulement au pic à 26 mn dans l'échantillon de caséine entière bovine. Il y a lieu de noter que les profils chromatographiques des standards caseiniques, particulièrement la α -CN et la β -CN ont identifié des pics associés au composé dominant qui est le composé pris en compte dans l'étude. Cependant, à titre comparatif, la mobilité des différentes caséines sur des gels de polyacrylamide en page -SDS ou page-UREE rapporté par **Majumder et al. (2015)** et **Egito et al. (2007)** ont montré que l' α -CN possède la mobilité la plus réduite suivi de la β -CN et enfin la caséine κ .

Par ailleurs, la technique HPLC employée a permis une identification des fractions issues des caséines entières (Figure 1, e, f, g) avec une résolution meilleure chez la caséine commerciale. À ce titre, il faut remarquer que l'élution des pics de protéines a contaminé les caséines expérimentales lors de l'isolement à partir des laits analysés. Des remarques identiques ont été faites par **Bonfatti et al. (2008)** sur les profils des protéines des laits analysés par la RP-HPLC. Auparavant, pour **Bodin et al., (2001)**, ces pics mineurs sont probablement attribués à la séparation des variants β -CN et ceux correspondant aux principales variantes κ -CN A et B. Cependant, ces variants génétiques probables et les formes α s1 et α s2 des caséines α S élues ne sont pas pris en compte du fait d'une identification qu'on a jugé difficile.

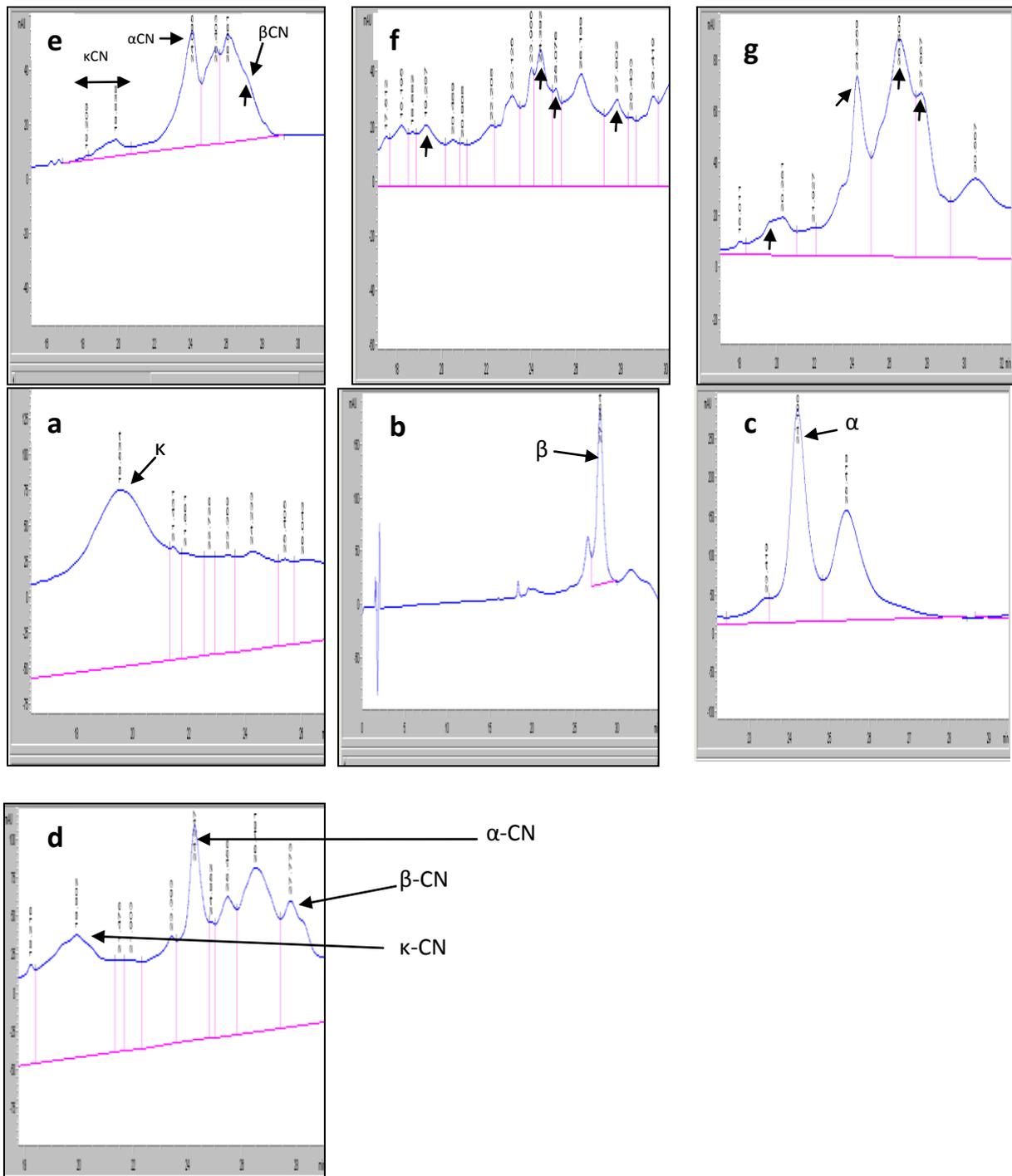


Figure 38 : Profil HPLC en phase inverse des caséines standards (2mg/ml), **e** : Caséine de lait bovin, **f** : caséine ce lait caprin, **g** : Caséine commerciale, **a** : κ caséine, **b** : β caséine, **c** : α caséine, **d** : mélange des caséines α , β et κ .

(Conditions HPLC : système binaire, **solvant A** : acétonitrile, eau, acide trifluoro acétique 100-900-1 v/v/v, **Solvant B** : acétonitrile, eau, acide trifluoro acétique, 900-100-1 (v/v/v).

Température de la colonne C₁₈: 25 °C, **Débit** : 1.0 ml/min, **Détection** : 220 nm, **volume injecté** : 20 μ L)

Dans cette étude, les conditions HPLC ont été optimisées particulièrement pour la composition de la phase mobile et le gradient afin d'avoir une résolution maximale des pics alors que la température de fonctionnement a été ajusté a la température ambiante. Les temps de rétention des principaux pics élués coïncidaient avec les temps de rétention des fractions protéiques standards.

Dans un autre volet, de l'étude, on s'est intéressé à l'optimisation de la durée d'analyse pour éluer les fractions standards dans une solution mélange (**Figure 1, e**). En effet, une durée de 30 mn de temps de rétention après injection a permis l'élution de l'ensemble des protéines (fractions caseiniques). Avec des protocoles semblables, plusieurs auteurs ont déjà rapporté le même temps après optimisation des paramètres d'analyse des fraction proteiques du lait (**Bonizzi, 2009 ; Bonfatti et al. 2008 ; Bonfatti et al. 2013 ; Veloso et al. 2002 ; Bramanti et al. 2003**). Ce temps de rétention des composés de 30 mn a été ajusté pour l'ensemble des profils chromatographiques obtenus lors de l'analyse des effets d'hydrolyse des caséines des laits par les protéases isolées. En revanche, **Ruprichová et al. (2015)** à l'aide d'une colonne en phase inverse de dimension 150 mm × 3.0 mm et d'un détecteur à barrettes diode (photodiode array detector) a obtenu une durée de rétention pour la détection des fractions caseiniques des laits bovin et caprin de 15 mn soit la moitié du temps d'analyse avec des protocoles classiques qui emploient une colonne analytique a 250mm x 1,6mm et un détecteur des composés dans l'UV (214, 220 ou 280nm).

4.2. Suivi d'hydrolyse des caséines entières

Les figures 39 et 40 représentent respectivement les profils HPLC des caséines entières isolées des laits bovin et caprin est les profils des fractions standards des caséines κ et α .

Comparés aux profils avant hydrolyse, l'incubation des caséines en présence d'agents coagulant pendant 40 mn a montré l'apparition de nombreux pics suite a l'effet catalytique des enzymes.

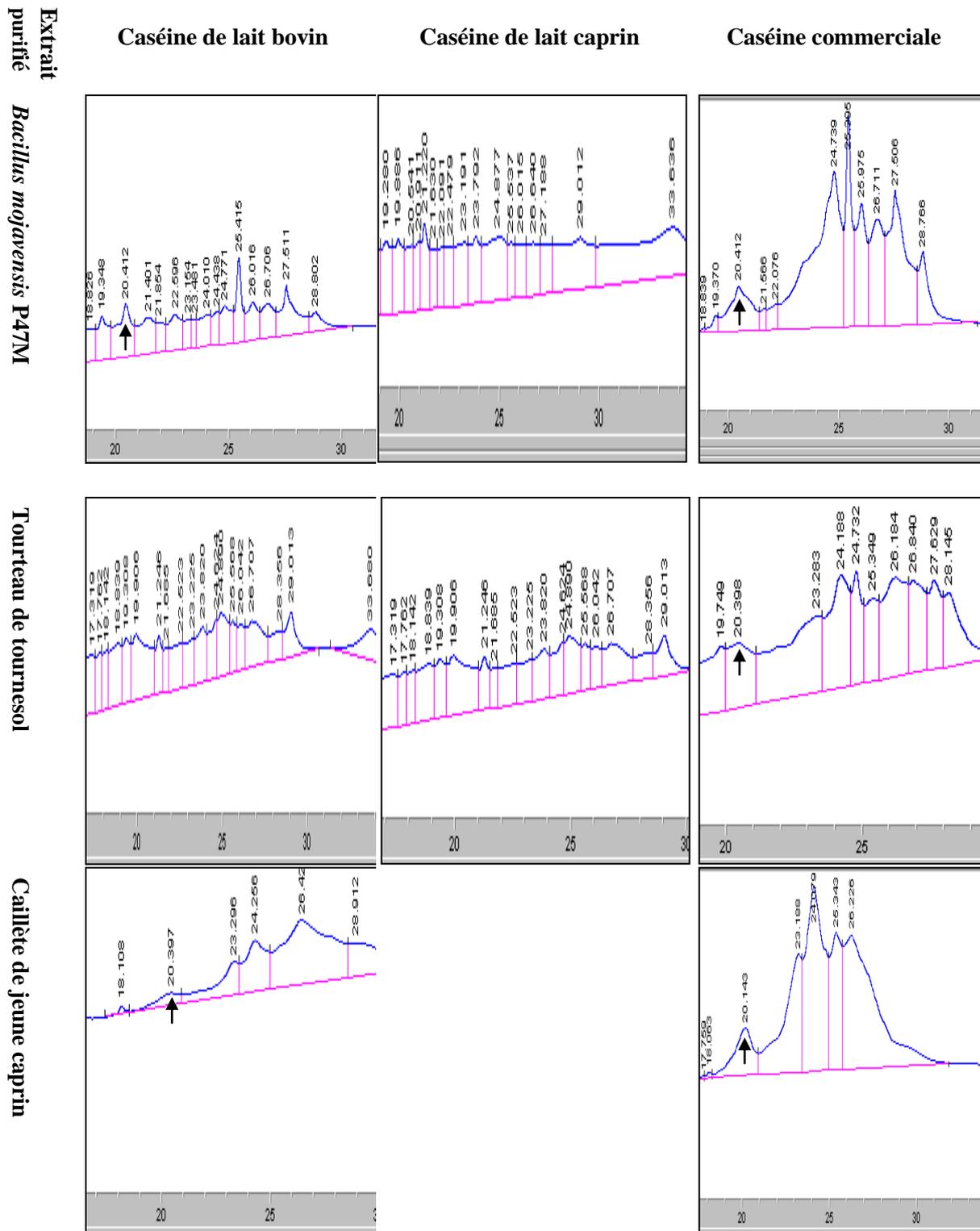


Figure 39 : Profil HPLC en phase inverse de l'hydrolyse des caséines du lait bovin et du lait caprin par les protéases purifiées obtenues à partir des caillètes de jeune caprin, de tourteau de tournesol et par fermentation de *Bacillus mojavensis* P47M après 40mn d'incubation à 37°C. (Conditions HPLC : système binaire, **solvant A** : acétonitrile, eau, acide trifluoro acétique 100-900-1 v/v/v, **Solvant B** : acétonitrile, eau, acide trifluoro acétique, 900-100-1 (v/v/v). **Température de la colonne C₁₈**; 25 °C, **Débit** : 1.0 ml/min, **Détection** : 220 nm, **volume injecté** : 20 µl).

Extrait purifié

Bacillus mojavensis P47M

Tourteau de tournesol

Caillète caprine

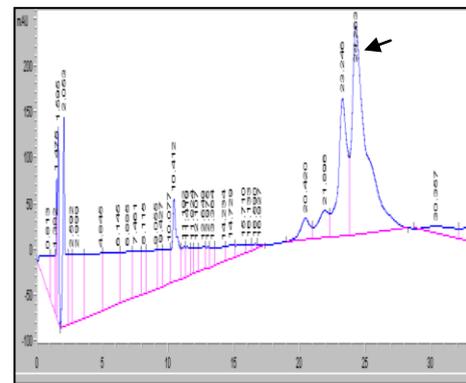
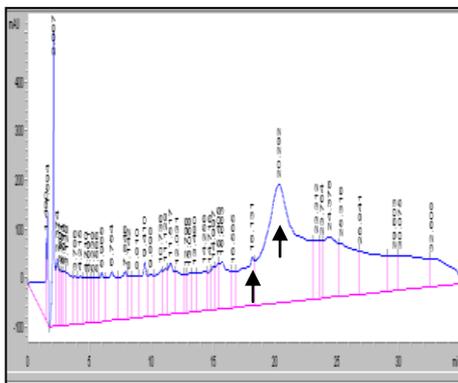
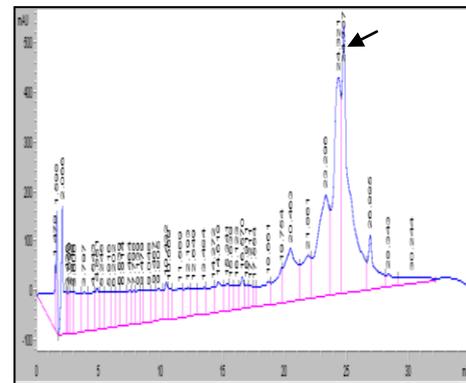
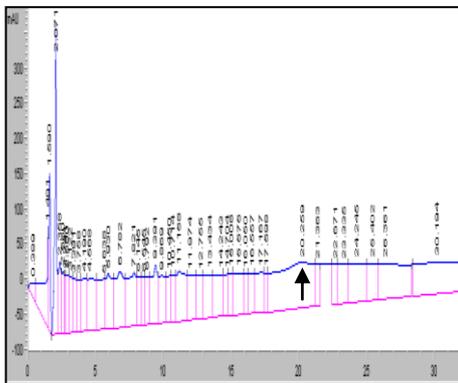
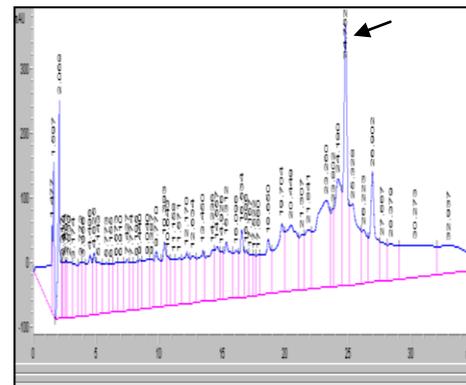
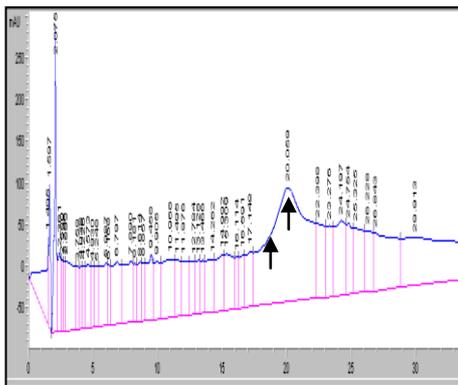
 κ caséine α caséine

Figure 40 : Profil HPLC en phase inverse de l'hydrolyse des κ et α caséines standards par les protéases purifiées obtenues par fermentation de *Bacillus mojavensis* P47M et à partir des caillètes de jeune caprin et de tourteau de tournesol après 40mn d'incubation à 37°C. (Conditions HPLC : système binaire, **solvant A** : acétonitrile, eau, acide trifluoro acétique 100-900-1 v/v/v, **Solvant B** : acétonitrile, eau, acide trifluoro cétique, 900-100-1 (v/v/v). **Température de la colonne C₁₈**; 25 °C, **Débit** : 1.0 ml/min, **Détection** : 220 nm, **volume injecté** :20 uL)

L'observation des profils et la cartographie des pics vraisemblablement des peptides apparus après hydrolyse montrent une certaine similitude dans la fréquence d'apparition des pics entre les 3 extraits étudiés. **Merheb- Dini et al. (2010)** ont montré que Les hydrolysats de caséine contenant une gamme de peptides ont été caractérisés par la RP-HPLC et que les pics sont apparus au delà de 40 mn de durée d'analyse et après une protéolyse de 1 heure. Les peptides qui interagissent fortement avec la colonne RP-HPLC sont de nature plus hydrophobe sont élués plus tard. En revanche et dans nos conditions expérimentales, le temps de rétention est arrêté à 30 mn et une durée de protéolyse de 40mn.

Cependant, les observations sont mieux représentées et les pics sont bien résolus chez la caséine commerciale tandis que les profils chromatographiques des caseines α et κ analysés séparément semblent un être bon marqueur de l'activité hydrolytique des extraits enzymatiques.

En effet, l'effet d'hydrolyse des extraits purifiés sur les caséines α et κ a montré qu'après 40 mn de réaction, il y a eu dégradation totale de la κ caséine. L'apparition d'un peptide avec un temps de rétention de 20mn est probablement un composé lié à l'enzyme qu'on retrouve dans l'ensemble des échantillons (montré par une flèche). Par ailleurs, la caseine α semble intacte après 40 mn d'incubation des standards caseiniques (**Figure 3**) mais en revanche une protéolyse mineure est observée chez les caséines entières des laits et la caséine commerciale à l'exception de l'effet d'hydrolyse générale accentuée avec l'extrait du tournesol. Ces résultats semblent en accord avec les travaux réalisés avec la chymosine animale sur les caséines bovines, caprines et ovines (**Trujillo, et al., 1997; Pintado et al., 2001**) mais contredisent ceux du tournesol. En effet, selon **Egito et al. (2007)**, dans les rares travaux sur la protéase de la graine de tournesol, les composants de la caséine étaient plus résistants à la protéolyse provoquée par l'extrait de protéine de graine de tournesol (plus de 60 mn) qu'à celui provoqué par l'extrait de protéine de graine d'albizia et que la majorité des caséines α et κ ont disparu en 40 mn d'hydrolyse. En revanche, les travaux réalisés sur les extraits de calotropis (pommier de Sodome) ont montré qu'après 1 heure de protéolyse, une hydrolyse importante des α , β et κ caseines à l'inverse de la chymosine ou seule la κ a disparu après analyse du gel d'hydrolysat de caseine (**Anusha et al., 2014**). Inversement, **Ordiales et al., 2012** rapporte que les enzymes de la coagulation du lait provenant de fleurs de *Cynara cardunculus* hydrolysaient mieux l' α -caséine que la β -caséine et étaient moins efficaces dans le clivage de la κ -caséine.

Cependant, pour la majorité des enzymes coagulant le lait obtenu à partir de différentes sources, animales, végétales ou microbiennes, l'effet catalytique durant le processus de

coagulation du lait se manifeste par la protéolyse de la caséine κ bovine et caprine particulièrement au niveau du clivage de la liaison Phe₁₀₅ – Meth₁₀₆ (Hidalgo et al., 2010 ; Montalbano et al., 2016) et rarement la rupture de la liaison Lys₁₁₆-Thr₁₁₇ caprine (Silva et Malcata 2000b; Silva et Malcata 2005a) ce qui a expliqué probablement la similarité des profils chromatographique d'hydrolysats de caséine obtenus après 40 minutes d'incubation.

Conclusion

Dans les chapitres précédents, nous avons rapporté que les extraits enzymatiques étudiés constituent dans l'ensemble des agents coagulants prometteurs pour l'industrie fromagère. Les aptitudes technologiques ont permis, à travers des essais de fabrication de fromage à partir des laits bovins et/ou caprins, d'avoir propriétés intéressantes des laitages produits et une caseinolyse normale au cours du processus de coagulation (résultats non publiés dans cette thèse).

Les résultats de l'étude actuelle révèlent que les extraits enzymatiques étudiés sont similaires à la présure commerciale dans le modèle d'hydrolyse des caséines après 40 minutes d'activité enzymatique. Certes le choix de la durée d'incubation était volontaire (40 mn) mais suffisante d'une part pour avoir des informations sur les mécanismes d'action des protéases sur les caséines des laits par HPLC et d'autre part suffisante pour former un coagulum ou gel connu pour être la première étape dans le procédé de fabrication d'un fromage.

La technique HPLC employée a permis une identification des fractions issues des caséines entières avec une résolution meilleure que chez la caséine commerciale. Par ailleurs, les conditions HPLC ont été optimisées et les temps de rétention des principaux pics élués coïncidaient avec les temps de rétention des fractions protéiques standards et avec une durée d'analyse de 30 mn. Sur le plan hydrolyse des caséines. Il apparaît que l'effet d'hydrolyse des extraits purifiés sur les caséines α et κ a montré qu'après 40 mn de réaction, il y a eu dégradation totale de la κ caséine. mais en revanche une protéolyse mineure est observée chez les caséines entières des laits et la caséine commerciales à l'exception de l'effet d'hydrolyse générale accentuée avec l'extrait du tournesol. Ces résultats semblent en accord avec les travaux réalisés avec la chymosine animale sur les caséines bovines, caprines et ovines mais contredisent ceux du tournesol dans les seuls travaux d'Egito et al., (2007). Cette particularité, a donné une qualité de fromage Edam comparable à celle de la présure commerciale microbienne *d'Aspergillus niger* var. *awamori* (résultats non publiés)

Références bibliographiques :

- Ana C.A., Veloso N., Teixeira I. and Ferreira M.P.L.V.O. (2002).** Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea–polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *J. of Chromatography A*, 967, 209–218
- Anusha V., Kumari S. and Bindhu O. S. (2014).** Characterization of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. *Eur Food Res Technol*, 238:997–1006
- Bodin J.P., Morgan f. and Gaborit P., (2001).** Lien entre le niveau de lipolyse du lait de chèvre et la qualité sensorielle des fromages au lait cru ou pasteurisé. *Lait* **81**, 743-656.
- Bonfatti, V., Grigoletto, L., Cecchinato, A., Gallo, L. and Carnier, P. (2008)** Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography A*, 1195, 101-106.
- Bonfatti V., Giantin M., Rostellato R., Dacasto M. and Carnier P. (2013).** Separation and quantification of water buffalo milk protein fractions and genetic variants by RP-HPLC. *Food Chem.*, 136, 364–367 365
- Bonizzi J., Joanna N. Buffoni, and Feligini M. (2009).** Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context. *J. of Chromato.A*, 1216, 165–168
- Bougherra F., Dilmi-Bouras A., Balti R., Przybylski R., Adoui F., Elhameur H., Chevalier M., Flahaut C., Dhulster P. and Naima N.(2017).** Antibacterial activity of new peptide from bovine casein hydrolyzed by a serine metalloprotease of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* BR16. *J. of Functional Foods* , 32, 112–122
- Bramanti E., Sortino C., Onor M., Beni F. and Raspi G.(2003).** Separation and determination of denatured alpha(s1)-, alpha(s2)-, beta- and kappa-caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *J. Chromatogr A*. 994(1-2):59-74.
- Brulé G. Lenoir J. and Reneuf F. (1997).** La micelle de caséine et la coagulation du lait. In *le Fromage. TEC & DOC Lavoisier*: Paris; 7-41.
- Dagleish DG. (1998).** Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *J. of Dairy Sc.*, **81**: 3013-3018.
- De Kruif C. G. (2014).** The structure of casein micelles: a review of small-angle scattering data. *J. of Applied Crystallography*, 47(5), 1479–1489.

- Duarte AR., Duarte R., Moreira KA., Cavalcanti H., De Lima JL. and Porto ALF. (2009).** *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze a new vegetable source for milk-clotting enzymes. *Braz Arch Biol Technol* , 52:1–9
- D’ambrosio A., Rossano R., Ungaro N. and Riccio, P. (2003).** Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida*. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **22**, 145–150.
- Egito AS., Girardet JM., Laguna LE., Poirson C., Molle D. and Miclo L. (2007).** Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein, *Inter.Dairy J.*, **17**: 816–825.
- El Negoumy A. M. (1968).** Starch gel electrophoresis of products of action of crystalline rennin on caseins and its components. *J. Dairy Sci.* 51:1013
- Green M.L. and Foster D. (1974).** Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheese made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *J. Dairy Res.*, **41**, 269-82.
- Hidalgo M.E., Pires M.S. and Risso P.H. (2010).** A study on bovine kappa-casein aggregation after the enzymatic action of chymosin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **76**, 556–563
- Kim H.-H.Y. and Jimenez-Flores R. (1994).** Comparison of Milk Proteins Using Preparative Isoelectric Focusing Followed by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Volume 77, Issue 8, 2177–2190.
- Kumar S., Sharma N. S., Saharan M. R. and Singh R. (2005).** Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: Purification and characterization. *Process Biochem.*, **40**, 1701–1705.
- Lucey J. A. (2002).** ADSA Foundation Scholar Award. Formation and physical properties of milk protein gels. *J. of Dairy Sc.*, 85(2), 281–294.
- Majumder R., Banik S.P., and Khowala S. (2015).** Purification and characterisation of kappa-casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091, *Food chem.* **173**, 441
- McSweeney P., Olson N. F., Fox P.F., Healy A. and Hojrup P. (1993).** Proteolytic specificity of chymosin on bovine as,-casein. *J.of Dairy Res.*, **60** ,401-412

- Merheb-Dini C.,Gomes E.,Boscolo M. and Da Silva R. (2010).** Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Food Chem*, **120**, 87-93.
- Montalbano M., Segreto R.,Di Gerlando R.,Mastrangelo S. and Sardina M.T. (2016).** Quantitative determination of casein genetic variants in goat milk: Application in Girgentana dairy goat breed. *Food Chem.* ,**192**, 760–764
- Ng-Kwai-Hang K. F. and Kroeker E. M. (1984).** Rapid Separation and Quantification of Major Caseins and Whey Proteins of Bovine Milk by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J Dairy Sci* , 67:3052-3056
- Ordiales E., Martín A., Benito M. J., Hernández A., Ruiz-Moyano S. and Górdoba M. G. (2012).** Technological characterization by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making. *Food Chem.*, **133**, 227–235.
- Pintado A. I., Macedo A. C., Teixeira G., Pais M. S., Clemente A. and Malcata F. X. (2001).** Caseinolytic activity of fruit extract from *Opuntia ficus-indica* on bovine, caprine, and ovine sodium caseinates. *Biotech. Progress*, **17**, 643–646.
- Pires M.S. Orellana G.A. and Gatti C.A. (1999).** Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles: action of Ca²⁺ and pH. *Food Hydrocolloids*, **13**: 235-238.
- Raposo S. and Domingos, A. (2008).** Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process Biochem.*, **43**, 139–144.
- Ruprichová L., Tompa G., Králová M., Borkovcová I. , Bedáňová I. and Vorlová L. (2015).** Profiling of caseins in cows’ , goats’ and ewes’ milk and dairy products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. of Food and Nutri. Res.*, Vol. 54, No. 3, pp. 218–228.
- Sandra S. and Corredig M. (2013).** Rennet induced gelation of reconstituted milk protein concentrates: The role of calcium and soluble proteins during reconstitution. *Inter.Dairy J.*, 29(2), 68–74.
- Silva V. and Malcata F. X. (2005).** Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chem.*, **89**, 19–26.
- Silva S. and Malcata F. (2000).** Comparative catalytic activity of two plant proteinases upon caprine caseins in solution. *Food Chem*, **71**, 207-214
- Trujillo A. J., Guamis B. and Carretero C. (1997).** Proteolysis of goat b-casein by calf rennet. *Inter. Dairy J.*, **7**, 579–588.

-Visser F.M. and De Groot-Mostert E.A. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria, and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. IV. Protein breakdown: a gel electrophoretical study. *Neth. Milk. Dairy J.* 31:247–264.

-Walstra P., Geurts TJ. Noomen A., Jellema A. and Van Boekel MAJS. (1999). Principles of Milk Properties and Process, *Dairy Tech.*. In *Food Sc. and Tech.*, Bekker M (ed). Wageningen Agricultural, Univ New York (USA): New York; 727p.

-Yegin S., Goksungur Y. and Fernandez-Lahore M. (2012). Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. *Food Chem.*, **133**, 1312–1319.

-Yüksel Z. and Erdem Y.K. (2009). Detection of the milk proteins by RP-HPLC, *GIDA GD08054*, 3, 1-7.

Conclusion générale et perspectives

Dans notre présente étude, nous essayons de trouver de nouvelles sources potentielles de protéases coagulant le lait de différentes origines. Parmi plusieurs matières premières étudiées, trois espèces ; *Helianthus annuus*, *Capra hircus* et *Bacillus mojavenis*, très répandues en Algérie, dévoilent une richesse en protéases pouvant ainsi présenter un remplaçant intéressant de la présure commerciale qui, actuellement, enregistre une pénurie mondiale importante.

Pour cela, une meilleure connaissance de ces trois succédanées demeure l'objectif capital de notre travail.

Quatre volet principaux ont été suivi lors de notre expérimentation, à savoir l'extraction, la purification, la caractérisation et l'étude de l'effet catalytique des extraits purifiés sur les caséines des laits bovin et caprin.

Dans une première étape, nous avons obtenus des extraits bruts issus des tourteaux de tournesol, la caillette caprines non sevrés, et *Bacillus mojavenis*, une estimation de l'activité coagulante et protéolytique des extraits coagulants a été effectuée.

Les résultats obtenus ont montré que les EEB animal et bactérien présentent une activité coagulante plus élevée qu'a celle de l'extrait végétal qui avait un taux d'activité protéolytique prononcé.

Un pré purification par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium pour les extraits végétal et bactérien a donné un rendement de purification de 93 % et 48 % respectivement, quant à l'ultrafiltration, elle a permis l'amélioration de l'activité de la protéase de chevreau de 46 %.

la chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75 de la fraction active issue de la chromatographie d'échange de cations a permis de révéler deux pics dont le 1^{er} est doué d'une forte activité coagulante de l'ordre 0.0012 UP. Le tamisage moléculaire de l'extrait enzymatique brut du chevreau a donné un profil d'élution caractéristique de la chymosine et incité un indice de purification de 17.3 pour l'agent coagulant bactérien.

La séparation par SDS-PAGE des protéases préalablement purifiées indique un poids moléculaire de 48 KDa, 27KDa et 26KDa pour l'extrait de tournesol, du chevreau et du *Bacillus* respectivement. L'étude des propriétés physicochimiques a pour but de connaître des éventuelles applications de nos extraits . Elle a montré qu'il s'agit

d'aspartylprotéases pour EEV ayant un pH optimal de 5.5 et une température optimale 70°C, de métalloprotéase pour EEB avec les valeurs optimales de pH et température, et une aspartyleprotéase pour EEA avec un pH de 5.5 et une température de 45°C.

En résumé, les résultats de cette étude nous ont permis la purification et la caractérisation de nouvelles protéases issues de la biodiversité algérienne qui peuvent être valorisées comme produits locaux.

En outre, la technique HPLC a montré une similarité des comportements catalytiques de nos trois agents coagulants purifiés et celle de la présure commerciale entre autre une dégradation totale de κ caséine après 40 minutes d'incubation.

Tous ces résultats nous amènent à conclure la possibilité d'usage de ces coagulases comme substituts de la présure commerciale et confirment que son utilisation peut basculer du secteur traditionnel vers le secteur industriel et peuvent être conçus pour les employer à l'avenir dans la préparation de fromage traditionnel.

Enfin et à travers les résultats enregistrés, la similitude avec la présure traditionnelle en matière de propriétés biochimiques des enzymes a été démontrée sans pour autant égaler le caractère très spécifique de la Chymosine comme étant l'agent coagulant du lait par excellence. Aujourd'hui et pour des raisons philosophiques, religieuses et surtout pathologiques, les laitages portant le label Bio sont en pleine croissance, la biodiversité végétale, caprine et microbienne sont actuellement ancrées dans l'esprit des chercheurs et du consommateur et l'emploi des succédanés de la présure sous forme purifiée dans l'industrie du fromage est à notre avis très intéressante si toutes les restrictions technologiques sont levées.

Des études complémentaires sur ces protéases, notamment en ce qui concerne l'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. Effectuer davantage d'expérimentation pour décrire plus uniformément et profondément le rôle de ces protéinases dans une matrice complexe tel que le fromage et l'étude des qualités rhéologiques de ce dernier et parallèlement une réalisation d'une approche économique qui révélera les avantages et inconvénients économiques de l'utilisation de ces trois matières premières utilisées en technologie fromagère sont des perspectives jugées importantes à fin de confirmer leur potentiel de coagulation du lait par rapport à la présure de référence.

Annexes

Annexes

Annexe 1

Préparation de substrat de Berridge (COLLIN et al., 1977)

Les constituants du substrat de Berridge

➤ Le lait en poudre

Le lait en poudre utilisé est de type LOW-HEAT obtenu à d'un lait écrémé pasteurisé de bonne qualité bactériologique (moins de 5000 germes/ml).

C'est une poudre n'ayant subi qu'un chauffage faible qui entraîne un respect de l'état physico-chimique de protéines solubles du sérum, elle est réservée dans des boites métalliques dans un endroit non humide.

➤ Solution de CaCl_2

La solution de CaCl_2 de qualité anhydre utilisée à une concentration de 0,01M, la solution est conservée à +4°C à l'obscurité.

Mode opératoire

Pour préparer 100ml de substrat de Berridge, on dissous 12g de lait en poudre dans 100ml de CaCl_2 à 0,01M. On verse une petite quantité de solution sur la totalité de la poudre de façon à obtenir par agitation manuelle une bouillé homogène, le reste de la solution CaCl_2 chlorure de calcium est alors ajoutée sur cette bouillé, puis agité par un agitateur magnétique douce pendant 30mn. Le pH du lait ainsi préparé est ajusté à pH=6,4 avec une solution de HCL 1N ou NaOH 1N. Le substrat est prêt à l'emploi et conserver au réfrigérateur.

Annexe2

Dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al (1951).

1. Solutions :

Solution A :

Na_2CO_3 5g
Eau distillée.....100ml

Solution B :

CuSO₄.5H₂O0,5g
 Tartrate double de Na et K1g
 Eau distillée100ml

Solution C :

50 ml de la solution A + 2 ml de la solution B à préparer immédiatement

Solution D :

NaOH(1N).....4g
 Eau distillée1000ml

Solution E :

Réactif de folin Ciocalteau0,5ml

Solution F :

BSA20mg
 Eau distillée100ml

Gamme étalon :

A partir de la solution mère de BSA des dilutions sont préparées selon le tableau ci-dessous :

Concentration en BSA µg/ml	0	25	50	75	100	150	200
Solution mère de BSA (ml)	0	0.125	0.25	0.375	0.5	0.75	1
Eau distillée (ml)	1	0.875	0.75	0.625	0.5	0.25	0

2. Méthodes :

- 1ml d'échantillon
- Ajouter 3 ml de la solution C et mélanger
- 1 ml de la solution D.
- Laisser 10 min à température ambiante.
- 0.5 ml de folin ciocalteau.
- Laisser 30min à l'obscurité.
- Lire la DO à 750 nm.

3. Expression des résultats :

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses les concentrations en BSA des dilutions préalablement préparées et sur l'axe des ordonnées les D.O mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration en protéine inconnue X , est déterminée en portant la valeur de la D.O correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetées sur l'axe des abscisses.

Annexe 3

Mesurer de l'activité protéolytique (MURADO *et al.*, 1993)

- **Les solutions**

Solution alcaline A : solution de Na_2CO_3 anhydre à 2% dans NaOH 0,1M (P/V).

Solution cuivrique B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 0,5% dissous dans double tartrate de Na et K à 1%.

Solution C : mélange extemporané de 50ml de A + 1ml de B.

Solution D : réactif de folin-ciocalteau dilué au $\frac{1}{2}$ avec l'eau distillée.

- **Condition d'hydrolyse**

On prend 1ml de la solution de caséine à 1% dans NaOH à 0,02N et on ajoute 1ml de l'extrait enzymatique. Le mélange ainsi obtenue est incubé pendant 10mn à 35°C.

Après incubation, on ajoute 5ml d'une solution de TCA à 5% et laisser par la suite au repos pendant 15mn. la précipité blanc qui se forme est séparé par centrifugation à 6800tr/mn pendant 5mn.

- **Préparation de l'échantillon**

Le filtrat (surnageant obtenu) est diluée 5 fois avec une solution tampon de phosphate (0,4M, pH 6), après on prend 1ml de filtrat diluée et l'ajoute 5ml de la solution C, le tout mélangé et suivi d'une incubation à 35°C au bain marie pendant 10 mn. Chaque tube reçoit 0,5 ml de la solution D. On agite immédiatement et on continu à incuber à 35°C pendant 20 min.

- **Préparation de témoin**

On prend 1ml de la solution de caséine est additionné à 5ml de TCA à 5%. Le témoin ainsi obtenu est traité de la même manière que précédemment.

- **Courbe d'étalonnage**

On prépare des solutions diluées de concentrations croissantes : 20, 40, 60, 80, 100µg/ml à partir d'une solution mère de tyrosine (100µg/ml), le témoin contient 1ml d'eau distillée.

- on ajoute dans chaque tube 5ml de la solution C.
- incubation pendant 10 min à 35°C au bain marie.
- on ajoute dans chaque tube 0,5ml de la solution D et agiter fortement.
- on les laisse incuber 20 min à 35°C au bain marie.

Lecture de l'absorbance : La lecture de la densité optique se fait au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 660nm.

Tubes	0	1	2	3	4	5
Eau distillé(µl)	1000	800	600	400	200	0
Tyrosine (µl)	0	200	400	600	800	1000

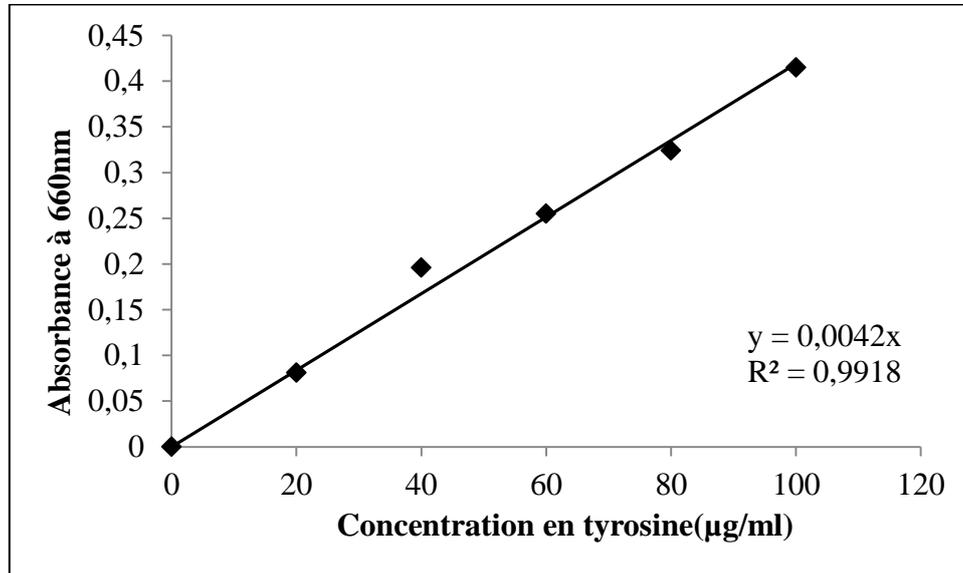


Figure : courbe étalon de tyrosine

Annexe 4

Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS).

1. Solutions :

Solution d'acrylamide (A) :

Acrylamide.....	37, 5 g
Bis-acrylamide.....	1 g
Eau distillée (qsp).....	100 ml

Tampon du gel de séparation (S) :

Tris.....	18,15 g
Eau distillée.....	100 ml
Ajuster à pH 8,8 avec de l'HCl 4 N (6N)	

Tampon du gel de concentration (C) :

Tris.....	6 g
Eau distillée (qsp).....	100ml
Ajuster à pH 6,8 avec de l'HCl 4 N (6N)	

Tampon d'électrode 5X (garder à +4°C) solution mère :

Tris	15g
Glycine.....	72g
Eau distillée (qsp).....	1000ml

Ajuster à pH 8,3 avec du Tris si le pH de la solution est < valeur normal (8,3-8,5)

Tampon d'électrode 1X + SDS (garder à T ambiante) :

Tampon d'électrode 5X.....	200ml
SDS.....	10ml (10%)

Eau distillée (qsp).....1000ml

Tampon d'échantillon 2X :

Solution (C).....500µl

Eau distillée.....250µl

SDS 10 %.....200µl

2-mercaptoéthanol.....50µl

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon

Chauffage à 95°C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide

Ajouter 200 µl d'une solution de glycérol 50 % (v/v) et quelques grains de bleu de bromophénol

• **Coloration au Bleu de Coomassie R 250 :**

Solution de fixation :

TCA.....12g

Eau distillée (qsp).....100ml

Solution de coloration :

Bleu de Coomassie R 250.....0,5g

TCA.....4g

Méthanol.....100ml

Eau distillée.....100ml

Solution de décoloration :

Acide acétique.....37,5ml

Eau distillée.....312,5ml

Méthanol.....150ml

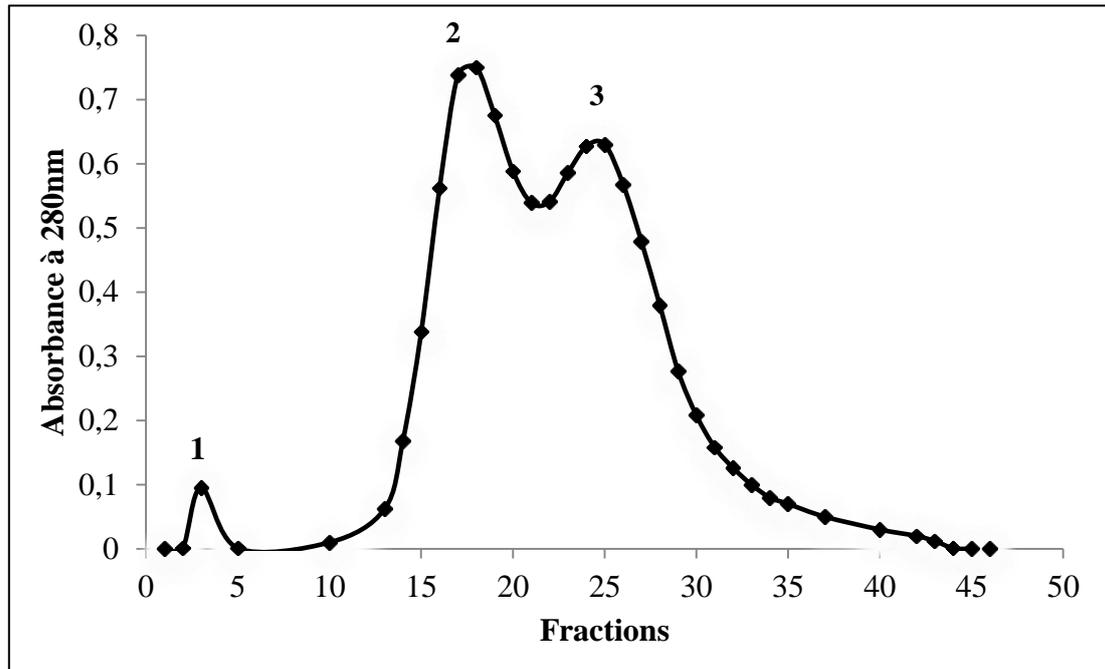
Solution de persulfate d'ammonium :

Persulfate d'ammonium.....0,1g

Eau distillée (qsp).....1ml

Annexe 5

Courbe étalonnage poids moléculaire tournesol



Profil d'élution sur Sephadex G-75 des protéines standards. (Colonne analytique *Spectra Chrom* (1 × 30 cm), tampon d'élution acétate (0,1M ; pH 5,2), débit : 18ml/h, fraction de 1ml).(1 : BSA, 2: Tyrosine, 3: Lactalbumine)

Annexe 6

Préparation des dilutions

Une série de dilution de 10^{-1} à 10^{-9} a été effectuée de la manière suivante :

D'une façon aseptique on prélève 1 ml de la solution mère préalablement préparée et homogénéisée qu'on introduit dans un tube de 9 ml d'eau physiologique ce qui nous donne la dilution 10^{-1} , de cette manière on prélève 1 ml que nous introduisant dans autre tube de 9 ml d'eau physiologique pour obtenir la dilution 10^{-2} , et on opère de la même façon pour les autres dilutions.

Méthode d'ensemencement et de dénombrement

Ensemencement et dénombrement sur milieu solide

- **Par étalement**

On dépose sur la gélose 0,1 ml de chaque dilution de l'échantillon à analyser, qu'on étale sur la surface de façon uniforme à l'aide d'un râteau pipette.

- **Par incorporation**

On dépose 1 ml d'échantillon au fond de boîte de pétri, au quel on ajoute du milieu gélosé liquéfié bien homogénéisé puis on laisse solidifier, on incube à la température adéquate pendant une durée précise en fonction des microorganismes recherchés.

Le dénombrement est effectuée par la méthode classique de comptage sur boîte de pétri et le nombre de colonies est déterminé comme suit :

$$X : Nm \times 1/D \times 1/V$$

X : nombre de bactérie

Nm : Nombre moyenne de germe

D : la dilution considérée

V : le volume ensemencé

La lecture ne se fait en principe que sur des boîtes contenant de 30 à 300 colonies.

Annexe 7

Préparation de Solution tampon acétate de sodium à 0,1 M.

-**Solution A** : acétate sodique 0,1 M : 8,204 g/l (C₂ H₃ O₂ Na) au 13,61g (C₂ H₃ O₂ 3 H₂O)

-**Solution B** : acide acétique 0,1 N : (6,005 g/l)

Pour avoir une solution tampon à pH = 4 :

Mélanger : 16.6 ml de A + (100 – 16,6) ml de B.

Pour avoir une solution à pH = 5 :

Mélanger : 67,8 ml de A + (100 - 67,8) ml de B.

Annexe 8 :

Mode opératoire activité protéolytique (KUMAR et al 2006)

2g caséine sont dissous dans un petit volume de NaOH 0,1N jusqu'à dissolution complète puis le pH est ajusté à 6,5 avec une solution d'HCL 0.1 puis compléter avec une solution de tampon Phosphate pH5,5 -0,1M à 100ml (Kobayashi and Murakami ,1978)).

5 ml de tampon phosphate et 0,5 d'une solution de d'extrait enzymatique sont ajoutés, Le mélange est incubé à 37°C pendant 1heure, la réaction est arrêtée par l'ajout de 5 ml de T.C.A. à 12%, sont ajoutés au mélange puis mis dans de la glace pendant 20 min le précipité protéique formé est séparé par une centrifugation à 6000g -4 °C pendant 10 min.

Finalement, le taux exprimé en tyrosine du surnageant est estimé par la méthode de Lowry (1951).

Une unité d'activité protéolytique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 0.0092 umol/mn de tyrosine.

Courbe étalon de tyrosine :

- Préparer des solutions diluées de concentrations croissantes : 20, 40, 60, 80 et 100 µg /ml à partir d'une solution mère de tyrosine (100 µg /ml). Le tube témoin contient 1 ml d'eau distillée.

Le dosage est effectué selon la méthode de lowry (1951) :

(Annexe 2)

Lecture de l'absorbance :

La lecture de la densité optique est effectuée à 660 nm après avoir étalonner le spectrophotomètre avec le témoin.

Annexe 9 :

Mesure de l'activité protéolytique (Green et Stackpoole, 1975)

➤ *Solution :*

Solution alcaline (A) :

-Soude caustique (NaOH) (2g/500ml)	500ml
-Carbonate de sodium	10g

Solution cuivrique (B) :

-Sulfate de cuivre 5 H ₂ O (0,32g/100ml)	2ml
-Tartrate de sodium et de potassium(1g/100ml)	2ml

Solution (C) :

-Solution (A)	50ml
-Solution (B) :	1ml

Solution (D) : réactif de Folin-Ciocalteu dilué ½

➤ *Méthode de mesure :*

Courbe étalon de tyrosine :

-Préparer des solutions diluées de concentration croissantes : 20, 40, 60, 80 et 100 µg/ml. Le tube témoin contient 1 ml d'eau distillée.

-Ajouter dans chaque tube 5 ml de la solution (C).

-Incuber pendant 10 mn à 35°C au bain marée.

-Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de solution (D) et agiter fortement.

-Laisser incuber 20 mn à 35 °C.

Condition d'hydrolyse :

-Ajouter 1 ml de la solution enzymatique à 1 ml de la solution de caséine à 2% dans le tampon citrate de sodium pH 5,5.

- Incuber pendant 10, 30, 60 et 90 mn à 35°C.
- Après incubation, ajouter 5 ml de TCA à 12%.
- Laisser reposer 15 mn.
- Filtrer à travers du papier filtre.

Préparation de l'échantillon :

- A 1 ml de filtrat, ajouter 5 ml de solution (C) puis mélanger.
- Incuber pendant 10mn à 35 °C.
- Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D) et agiter immédiatement.
- Incuber à 35°C pendant 20mn.

Préparation de blanc :

- A 1 ml de solution caséinique sont ajoutés 5 ml du TCA12%.
- Ajouter enfin 1 ml de solution enzymatique.

Lecture de l'absorbance :

Lecture de densité optique est effectuée à 660nm après avoir étalonner le spectrophotomètre avec le témoin.

Résumé

Dévoiler des nouvelles sources de protéase coagulant le lait est l'objectif de notre présente étude, pour cela, une extraction des agents coagulants bruts à partir des tourteaux de tournesol, de *Bacillus mojavensis* et de caillette de chevreau est réalisée, ces derniers présentent un indice AC/AP de 44.5, 164, 11.42 respectivement.

Après une identification de la bactérie *Bacillus mojavensis*, une optimisation de son milieu de culture ; vis-à-vis de son milieu de base, sa température, et son agitation ; est réalisée à fin d'avoir une meilleure force coagulante de son extrait ; l'optimum des paramètres sont discernés suivant un plan factoriel complet.

Les protéases végétale et bactérienne sont ensuite, purifiées par précipitation fractionnée Sulfate d'ammonium, et par ultrafiltration pour l'extrait animal, suivi d'une gel filtration G-75. Les rendements en activité récupérés sont de 14% et 15.4% et 46%. La séparation de ces trois protéases par électrophorèse SDS-PAGE a donné un poids moléculaire de 48 KDa pour l'extrait végétal, et 26KDa et 27KDa pour le bactérien et l'animal respectivement. Cette étude nous a permis la caractérisation de l'activité des enzymes en comparaison avec la présure, en fonction de divers paramètres (pH, température, concentration du lait en CaCl₂ et concentration de l'enzyme).

De plus et dans le but de classification des enzymes, une étude des effets des inhibiteurs est effectuée, l'extrait de tournesol et de chevreau sont inhibées par la pepstatine A indiquant qu'il s'agit d'aspartylprotéases, contrairement à l'extrait de *Bacillus* où l'activité était inhibée par EDTA dévoilant ainsi qu'elle fait partie des métalloprotéases. . Aussi Ces coagulases possèdent la capacité d'hydrolyse totale des caséines κ.

Les résultats aboutis, jugent que les tourteaux de tournesol, la caillette caprine et *Bacillus mojavensis* présentent une source potentielle des protéases coagulant le lait, pouvant ainsi remplacer la présure commerciale dans l'industrie fromagère et palier aux problèmes de sa pénurie.

Mots-clés : Protéases, *Helianthus annuus*, *Bacillus mojavensis*, Chevreau, Extraction, Purification, Hydrolyse.

Abstract

To find new source of milk clotting enzyme is an objective of our present study, for that, an extraction of the crude extracts from sunflower meal, of *Bacillus mojavensis* and goat rennet is realized, these, present index MCA/PA of 44.5;164.11 and 11.42 respectively.

After an identification of the bacterium *Bacillus mojavensis*, an optimization of its culture medium; with modify its basic substrate, its temperature and its agitation is realized has fine to have a better MCA. The optimum of the parameters is distinguished according to Central design composite. The vegetable and bacterial proteases are then purified by fractional precipitation with ammonium sulfate, and by ultrafiltration for the animal extract, followed by a gel filtration G-75, the yields activity recovered are of 14% , 15,4% and 46%. The separation of these proteases per SDS PAGE electrophoresis gave a molecular weight of 48kda for the vegetable extract, 26KDa and 27 KDa for bacterial and animal extracts respectively. This study allowed us the characterization of the activity of enzymes in comparison with rennet according to various parameters (pH, temperature, concentration of CaCl₂ and concentration of the enzyme). Moreover, with aim of classification of our enzymes, a study of the effects of the inhibitors is carried out, the extract of sunflower meal and goat rennet are inhibited by Pepstatine A indicating that it is about Aspartylproteases, contrary to the extract of *Bacillus* where the activity was inhibited by EDTA revealing thus it is part of the metalloproteases. Also these coagulases have the ability of total hydrolysis of casein κ . The succeeded results judge that sunflowers meal, goat rennet and *Bacillus mojavensis* present a potential source of the milk clotting enzyme, thus being able to replace commercial rennet in the cheese industry and solve the problem of its shortage

Keywords: Proteases, *Helianthus annuus*, *Bacillus mojavensis*, young goat, Extraction, Purification, Hydrolysis.

Characterization of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus mojavensis* P47M strain isolated from Algerian dairy farm soil

Kahlouche Amal¹ and Nouani Abdelouahab^{1,2*}

1. Laboratory of Food Technology and Human Nutrition, High National School of Agronomy, BP 16002, El Harrach, Algiers, ALGERIA

2. University of Boumerdes, Food Technology Laboratory, BP 35000, Boumerdes, ALGERIA

*nouania2@gmail.com

Abstract

A strain P47M which produces a milk-clotting enzyme isolated from soil of Algerian dairy factory was identified as *Bacillus mojavensis* based on morphology and internal transcription spacer sequence. Phylogenetic and sequencing analysis of 16S rDNA gene showed 100% identity of the tested strain with the *B. mojavensis* in the database (GenBank KY694978.1). This strain produced a good active extracellular protease which is purified by partial purification with fractionation with ammonium sulfate (40-80% saturation) followed by molecular exclusion chromatography which revealed the presence of a single active peak of 31 kDa.

Monomeric band of 29 kDa was revealed by SDS-PAGE. The optimal activity was observed at pH 6,0, 70°C and 0,05 M of CaCl₂. The clotting enzyme proved to be a metalloprotease by EDTA inhibition. Furthermore, according to the ratio MCA /PA (Milk clotting enzyme/proteolytic activity) of the order of 164 and its distinctive properties, P47M protease might be a useful contribution to the cheese industry.

Keywords: Milk clotting enzyme, identification, characterization, *Bacillus mojavensis*, culture medium.

Introduction

In dairy technology, various milk clotting enzymes (MCEs) from animals, plants and microorganisms have been suggested as calf rennet substitutes^{1,2}. Many milk coagulants of microbial origin have been investigated during the past years and selecting new microorganisms for enzyme production are increasing in number around the world. However, it is known that for a long time calf rennet has been the traditional source of milk-clotting enzymes for cheese manufacturing, but decreasing worldwide rennet supplies with increasing in cheese consumption³. Also, the production of milk-clotting enzymes from microbial has been receiving increasing attention and recent studies conducted on microbial proteases have been published, indicating the new interest that microorganisms (fungi and bacteria) based proteases have evoked.^{2,4-6}

On the other hand, nowadays most research works about MCEs production have focused on fermentation by fungus,

such as *Mucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* var and *Aspergillus oryzae* or bacterium such as genus *Bacillus*^{5,7}. So, enzymes from some bacteria such as *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* and *Enterococcus faecalis*, have been suggested as potential rennet substitutes⁸. More advanced attempts at purification and a deeper understanding of the biochemical mechanisms of these enzymes became the center of interest of researchers. However, very less work has been done on proteases in this perspective in Algeria. For these reasons, our research has been undertaken to find effective and competitive substitutes used industrially.

Microorganisms utilize various substrates as the source of nutrient for growth and metabolic activities. The solid state fermentation or submerged fermentation processes are usually simpler and can use wastes or agro-industrial substrates, such as defatted soybean cake, wheat bran, rice bran, banana waste etc. for enzyme production^{7,9}.

It is well known that this method has been successfully applied in many areas of biotechnology such as milk clotting enzyme production¹⁰. The aim of the present study was to elucidate the nature and the characteristics of the milk clotting enzyme produced by *Bacillus mojavensis* P47M in submerged fermentation and to estimate the possibility to use in cheese-making industry.

Material and Methods

Microorganism, culture conditions and isolation

method: Fifty grams of soil samples were collected near a dairy factory in the region of Boumerdes (North of Algeria about 50 km east of Algiers with coordinates of 36°45'37.23"N 3°28'20.52"E). A small amount of soil was homogenized under magnetic agitation for 20 min with 90 ml sterile physiological water to make an initial dilution (10⁻¹)¹¹. Serial dilutions were made for each sample and 0,1 mL of the appropriate dilution to 10⁻⁹ was spread on plate count agar (PCA) medium containing 2% (w/v) actidione antifungal agent to prevent fungal growth and 12% (w/v) sterilized skimmed milk powder. The plates were incubated at 30°C for 48 h for the enumeration of the caseolytic strain producing milk clotting protease by the presence of a clear halo around the colony.

Colonies with distinct morphologies differences such as color (Gram technique), shape and size were selected and purified by streaking using the same medium. All isolates were checked for milk clotting production and examined microscopically before stock preparations. The gram

positive bacterial isolates identified as *Bacillus* were purified and the selected strains showing clotting activities were maintained on agar conservation.

Identification of strain P47M: The procedure of strain identification was developed in our earlier works¹⁰. Briefly, macroscopy and microscopy were performed on Petri dishes with plate count agar (PCA) on colonies of 24h. For sequencing analysis, the genomic DNA was extracted from the strain by the standard chloroform isoamyl alcohol method using PrepMan ultra sample preparation reagent kit (Applied Biosystems, ThermoFischer Scientific, France) and purified on NucleoFast plates (Macherey Nagel). The amplification of the 16S rDNA was performed through PCR technique, using Taq DNA polymerase, genomic DNA as a template and 3- forward and 5- reverse universal primers.

The sequences of these primers used are as follows: F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), R1 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), F2 (5'-CTCCTACGGGAGGCAG-3') and R2 (5'-GACACGAGCTGACGACA-3'). The PCR products were sequenced by Sanger technique under the optimised conditions by Geno screen (Geno-screen Campus de l'Institut Pasteur de Lille 1, rue du Professeur Calmette – 59000 Lille – France). After obtaining the sequencing results, 16S rDNA nucleotide sequence (sequence of 915 bp) of the strain was deposited in GenBank and aligned with the 16S rDNA sequences available in public data bases in National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and LeBibi database (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebib/lebib.cgi>) using basic local alignment search tool (BLAST) software.

Protease production in shake flask cultures, medium composition and inoculum: According to Rao et al,¹² the basal minima medium (pH 6.8) used for milk clotting protease production, contained (g.l⁻¹): wheat bran (50), yeast extract (3), glucose (4), casein (2) and Na₂HPO₄ (3). The production medium (50 mL) placed in a 250 mL Erlenmeyer flask was inoculated with 10⁷ to 5.10⁸ bacteria per milliliter (Mac Farland 3) and incubated at 32°C on a rotary shaker with agitation (180 rpm) for 24 h in a IKA® KS 4000i control shaker. After incubation, the culture broth was filtered and then centrifuged (Jouan GR 422) at 13,000 g, 4°C for 20 min. Total protease yield and milk clotting activity was determined in the cell-free supernatant. Strain that showed the highest milk-clotting activity and the lowest proteolytic activity were selected for further studies and identified using 16S rDNA sequencing. The selected strain is called P47M.

Analytical procedure

Milk clotting activity: Milk clotting activity (MCA) was measured according to the procedure described by Shieh

et al¹³ with slight modifications. Skim milk powder was reconstituted by dissolving 12.5 g in 100 ml of 0.5 g/l of CaCl₂ solution (pH 6.5). The clotting assay was carried out by mixing 10 ml of this substrate with 1 ml of sample which is based on the visual evaluation of the appearance of the first clotting flakes. Clotting activity was expressed in terms of Soxhlet units (SU). One SU is defined as the amount of enzyme which clots 1ml of a solution containing 0.12 g skim milk powder and 0.11 mg CaCl₂ in 40 min at 35°C. the clotting activity was calculated using the following formula:

$$SU = 2400 \times 10 \times D/T$$

where T = clotting time (s) and D = dilution of crude extract.

Proteolytic activity assay: Proteolytic activity was determined by the method reported by Silva et al⁴ and Shieh et al¹³. The reaction mixture was composed of 0.4 mL of 0.5% casein (Sigma) (w/v) in distilled water, 0.4 mL of 0.2 mol/L acetate buffer at pH 5.5 and 0.2 mL of the crude enzyme. The reaction occurred in a bath at 35°C and at the end of 30 min, the reaction was stopped by adding 1 mL of 10 % trichloroacetic acid (TCA). 2 mL of the above filtrate was added by 5 mL NaOH (0.28 N) solution and 1.5ml phenol reagent (Folin-Ciocalteu phenol solution: water = 1:2). After the mixture was kept at 35 °C for 15 min, optical density (OD) at 660 nm was measured. The proteolytic activity was expressed in terms of units corresponding to OD_{660nm} (UV-Visible Spectrophotometer, model V560, Shimadzu, Japan)

The ratio (R) was determined by dividing the milk clotting activity by the proteolytic activity by the formula:

$$R = \text{MCA (SU)} / \text{PA (POD}_{660\text{nm}})$$

Protein concentration assay: Protein determination was according to the method of Lowry et al¹⁴ with crystalline bovine albumin as standard.

Partial purification of the milk-clotting enzyme (NH₄)₂SO₄ fractionation: Milk clotting enzyme in crude extract was precipitated between 40–80% saturation of (NH₄)₂SO₄. The precipitate obtained after centrifugation at 10,000 g at 4°C for 20 min was suspended in acetate buffer (0.01 M, pH 5.5) and dialyzed overnight against repeated changes of the same buffer.

Size-exclusion chromatography: The concentrated extract was loaded on to Sephadex G-75 column (30 cm x 1.5 cm) pre-equilibrated with acetate buffer (0.01 M, pH 5.5). Enzyme fractions of 1.5 ml were eluted at 36 mL/h flow rate with the same buffer and were analyzed for enzyme activity and protein content. Active enzyme fractions were pooled and lyophilized for further studies.

Molecular Weight Determination: The molecular weight of the protease from *B. mojavensis* was determined after purification of the active fraction on Sephadex G-75. The column was calibrated with a mixture of standard proteins of known molecular weight including γ -globulin (158 kDa), BSA (67 kDa) and trypsin (23.8 kDa).

PAGE-SDS electrophoresis: The active fraction obtained from gel filtration is kept frozen or freeze-dried for electrophoresis according to Laemmli¹⁵ in order to check homogeneity and the purity of enzyme. The different samples and markers, volume to volume in the sample buffer, are separated on a polyacrylamide gel formed by gel separation at 12% and a 5% concentration gel.

The electrophoretic migration is achieved through a 'Max Fill Bioblock Scientific' electrophoresis system. The kit of molecular weight marker proteins (26–180 kDa) was run for comparison purposes.

Effect of Inhibitors: According to the methods reported by He et al¹⁶ and Majumder et al¹⁷, different protease inhibitors including particularly a metalloprotease inhibitor (ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) at 5mM, an aspartic protease inhibitor (pepstatin A at 10 μ M and 20 μ M and 2-mercaptoethanol at 5mM, were added separately to the purified enzyme. Subsequently the residual milk clotting activities were determined with reference to the activity of the enzyme without inhibitors.

Biochemical properties of purified enzyme

Optimum pH and temperature: The optimum temperature determined in the purified fraction obtained by gel-exclusion chromatography was investigated at pH 6.3 of skim milk substrate in the 30–80°C range. pH effect on milk clotting enzyme expressed in relative activity (%) was determined by adding 0.75 mL of adequate buffers solutions to skim milk to make the substrate at different pH range of 5 to 8.

Effect of CaCl₂ concentration on milk clotting: The effect of CaCl₂ concentration on milk clotting was determined using increasing concentrations of the calcium chloride solution (0.005M, 0.01M, 0.02M, 0.03M, 0.04M and 0.05M).

Effect of enzyme concentration: The optimum concentration of purified extract was determined by the shortest time of one observing the milk clotting with 0.2-0.4-0.6- 0.8 and 1 mg/mL concentrations.

In all above experimental conditions, the time taken for the milk to clot was taken as measure of enzyme activity (Temperature at 35°C, 0.01M concentration of CaCl₂ and enzyme extract concentration of 0,1 mg / mL). Commercial microbial rennet (*Aspergillus niger* var. Awamori, CHR HANSEN–1300 IUMC/g) is used as a reference.

Results and Discussion

Identification of the strain: For further characterization, the PCR product of strain P47M was examined by electrophoresis, purified and then sequenced by Genoscreen (Campus de l'Institut Pasteur de Lille, France). In addition to biochemical and morphological identification, the 16S rDNA gene was successfully amplified from the genomic DNA of the strain P47M (figure 1). The nucleotide database has shown 100% homology with *B. mojavensis* strain. Therefore, our strain was designated *B. mojavensis* P47M with accession number KY694978 and the data bases allowed us to elaborate a phylogenetic dendrogram for P47M and related strains (figure 1).

Production of milk clotting enzyme: Our results showed that the production profile of enzymatic activities by the *Bacillus mojavensis* strain is interesting in submerged fermentation and the microorganism was able to grow and secrete the clotting activities in a short period of time (24 h). After fermentation followed by cold centrifugation, we recover 60 mL of crude extract characterized by a protein content of 11.14 mg/mL. This value is higher than obtained for *Bacillus subtilis* YB-3 under submerged fermentation⁵ but lower than *Bacillus subtilis* MTCC 10422⁶. It is obvious that these milk clotting protease were obtained under different fermentation parameters and can exhibit conflicting results. The ratio of milk-clotting activity to general proteolytic activity to prepare an enzyme is its suitability index as a rennin milk substitute¹⁸.

So, the MCA obtained is 90 SU and proteolytic activity of 0.547 with a ratio of 164. These results are considered very satisfactory for an enzyme in the crude state and possess the potential to replace natural rennin in cheese making. Majumder et al¹⁷ reported that the values of the ratio MCA/PA of *Termitomyces clypeatus* protease (64) and that obtained from commercial preparation (69.48) were considerably similar and could be considered a substitute for chymosin. Otherwise, the combination of casein with wheat bran used in the culture medium as an enhancer for the enzyme coagulant seems effective in a short period of fermentation (24h).

Enzyme purification and molecular mass value: Partial purification of the milk-clotting enzyme on the culture filtrate (crude extract) was carried out by fractional precipitation with (NH₄)₂SO₄ between 40 and 80% of saturated solution. It is known that this method is an effective way to produce substantial amounts of active proteinases⁹. Indeed, in our results the precipitant obtained by this fraction was the most active milk-clotting enzyme fraction and its MCA was equivalent to 88 SU.

On the other hand, the total protein content of the extract pre-purified is 6.58 mg / mL equivalent to 38 % of precipitated proteins from the overall rate of the crude extract. So, in partial purification of the enzyme, 59% recovery was achieved by precipitation in 40-80% saturated

ammonium; 41% of non-enzymatic protein were removed with 1.65-fold purification for 48.8% recovery (table 1).

A one-step chromatographic procedure, size exclusion chromatography was performed for purification of the milk-clotting enzyme. It is carried out on the precipitate at 40-80% saturation ammonium sulfate to the extract of *B. mojavensis* P47M. The elution pattern figure 2(A) showed that the extract partially purified was separated into three peaks of proteins but with only one having milk clotting activity. The active fraction was eluted with a total volume about 18 mL. The passage through a Sephadex G-75 column eluted with a buffer acetate pH 5.5 further purified the enzyme to 17.3-fold with 15.4% recovery. The results of the purification procedure are summarized in table 1.

A similar behavior was reported by Ding et al⁷ who studied a protease from *B. amyloliquofaciens* and in accord with the milk-clotting enzyme from *B. sphaericus* reported by He et al¹⁶.

Gel filtration chromatography is an established method for determining the size and molecular mass of proteins. So, our results reported that size exclusion chromatography indicated that the molecular weight of the enzyme was about 31 kDa [figure 2(A)a]. On the other hand, the electrophoretic profile shows that the studied active fraction appeared as one homogeneous band and elution of purified protease produced a single peak gifted with proteolytic activity. This band is followed by two bands of lower molecular weight but 29-kDa band proved to be the major one [figure 2(B)]. These results confirm those obtained by Ageitos et al¹⁹ with *B. licheniformis* strain USC13 showing that c. 35-kDa active fraction obtained from gel exclusion chromatography and analyzed by SDS-PAGE showed a band of 34-kDa.

With the same protocol, Kumari Narwal et al⁶ reported a molecular mass of purified MCE from *Bacillus subtilis* MTCC 10422 as determined by the gel filtration and electrophoresis was found to be monomeric of 27 kDa. Similar results from *B. pumilis* were reported by Yasuda et al²⁰ (monomeric of 29 kDa). In addition, this value agrees with those of proteinases from *Bacillus species* in the range of molecular weight (27-44 kDa) reported by Peng, et al²¹.

Compared to others milk clotting enzyme, Areces et al²² reported earlier that the molecular weights of chymosin and bovine pepsin are 35.65 and 33.37 kDa respectively while values between 32.50 and 34 kDa have been observed in fungal proteinases. Furthermore, the molecular weight of the order of 62 kDa to 67 kDa has been reported for the coagulase of vegetable source^{23,24}.

However, it is wise to make use of purified enzyme in cheese making than crude enzyme which can cause odor and brown coloration affecting the quality of the final

product and therefore, consumer acceptance. In laboratory, crude extract production by *B. mojavensis* P47M has been successfully applied in the preparation of unripened cheese and similar of texture profile is observed with the control (figure 3).

Effect of Inhibitors: It is known that protease inhibitors were used to identify the group at the active site of the enzyme and inhibition studies primarily give an insight into the nature of an enzyme and the nature of the active center. Of the inhibitors tested, table 2 showed that crude enzymatic extract retained approximately 57% and 53% of milk-clotting activity in the presence of pepstatin A at 0.01 mM and 0.02 mM respectively while 2-mercaptoethanol at 5mM was able to suppress up to 67% of the enzyme activity.

However, the complexing agent EDTA showed an apparent effect in enzyme activity at 5 mM and significantly inhibited MCA causing 100% of inhibition. These results suggest the presence of a metalloprotease in the enzymatic extract. Similar results were reported from *B. amyloliquefaciens* D4¹⁶ and *B. subtilis* YB3⁵ at 5 mM EDTA. On the other hand, other studies²⁵⁻²⁷ showed that some protease produced from *Bacillus sp.* belongs to the family of serine proteases.

Enzymes properties

The effects of temperature and pH: Figure 4(A) and (B) showed that the tendency of increase in apparent activity along the decrease in pH was almost the same in the case of rennet and *Bacillus mojavensis* P47M. However, maximum potency was observed at pH 5.5 from rennet and pH 6.0 from *B. mojavensis* P47M slightly lower than skim milk (pH 6.3). Enzyme activity decreased at higher pH values and became null at pH 7.5. The optimal pH range (5.5- 6.0) was similar to what is reported for the milk-clotting enzymes from *B. subtilis* natto^{5,13} and *B. amyloliquefaciens* D4¹⁶.

The relative milk-clotting potency (%) was also studied as a function of the temperature on the milk substrate at pH 6.3. The milk clotting enzyme is examined in the temperature range of 30 to 85°C. The optimum of rennet lies at around 55°C while *B. mojavensis* P47M at 70°C is different with calf rennet which has an optimum temperature in the range 40–42°C²⁸. On the other side, the enzyme still exhibited good activity (80%) at 65°C indicating good stability in skim milk substrate. This was in accordance with the fact that other clotting proteases from microbial origin had rather high optimal temperature for milk clotting. Indeed, similar values were reported earlier and new studies from other *Bacillus* strains^{5,7,29}.

Effect of CaCl₂ concentration on milk clotting: According to previous works reported in the literature, calcium has important function on casein aggregation during the second step (non-enzymatic) of milk clotting and

the concentrations usually used in cheese making technology are in the range of 0.01 to 0.02 M CaCl₂. On the other side, the amount of decrease of clotting time upon addition of calcium varies with the milk-clotting enzyme in

skim milk substrate³⁰. Indeed, figure 4(C) showed that calcium addition had a positive effect on the activity of the milk-clotting enzyme.

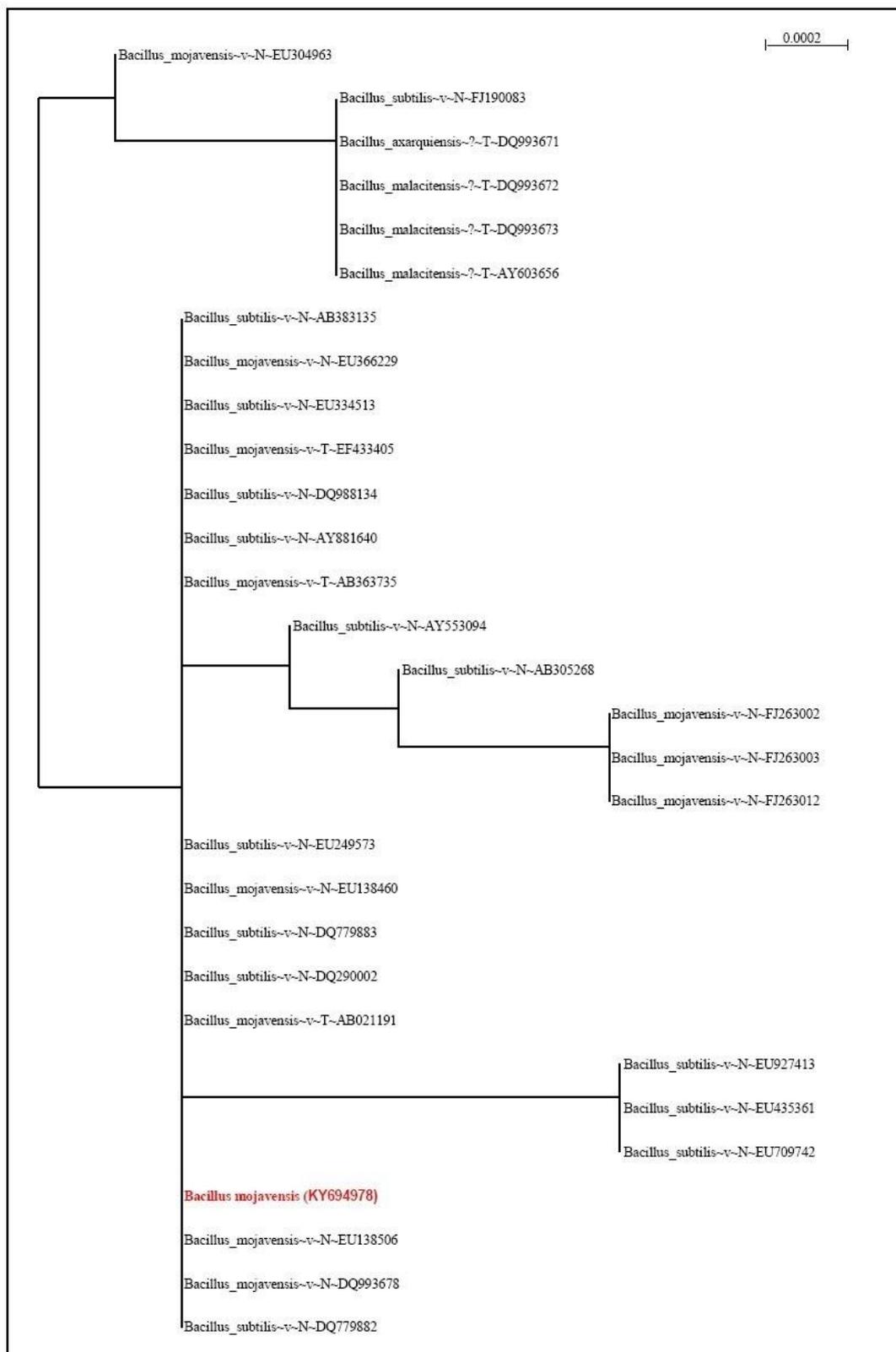


Figure 1: Phylogenetic tree derived from analysis of 16S rDNA sequence of strain P47M and related sequences obtained from NCBI. Scale bar. 0.001 substitutions per nucleotide position. The GenBank accession number for each strain follows the species name.

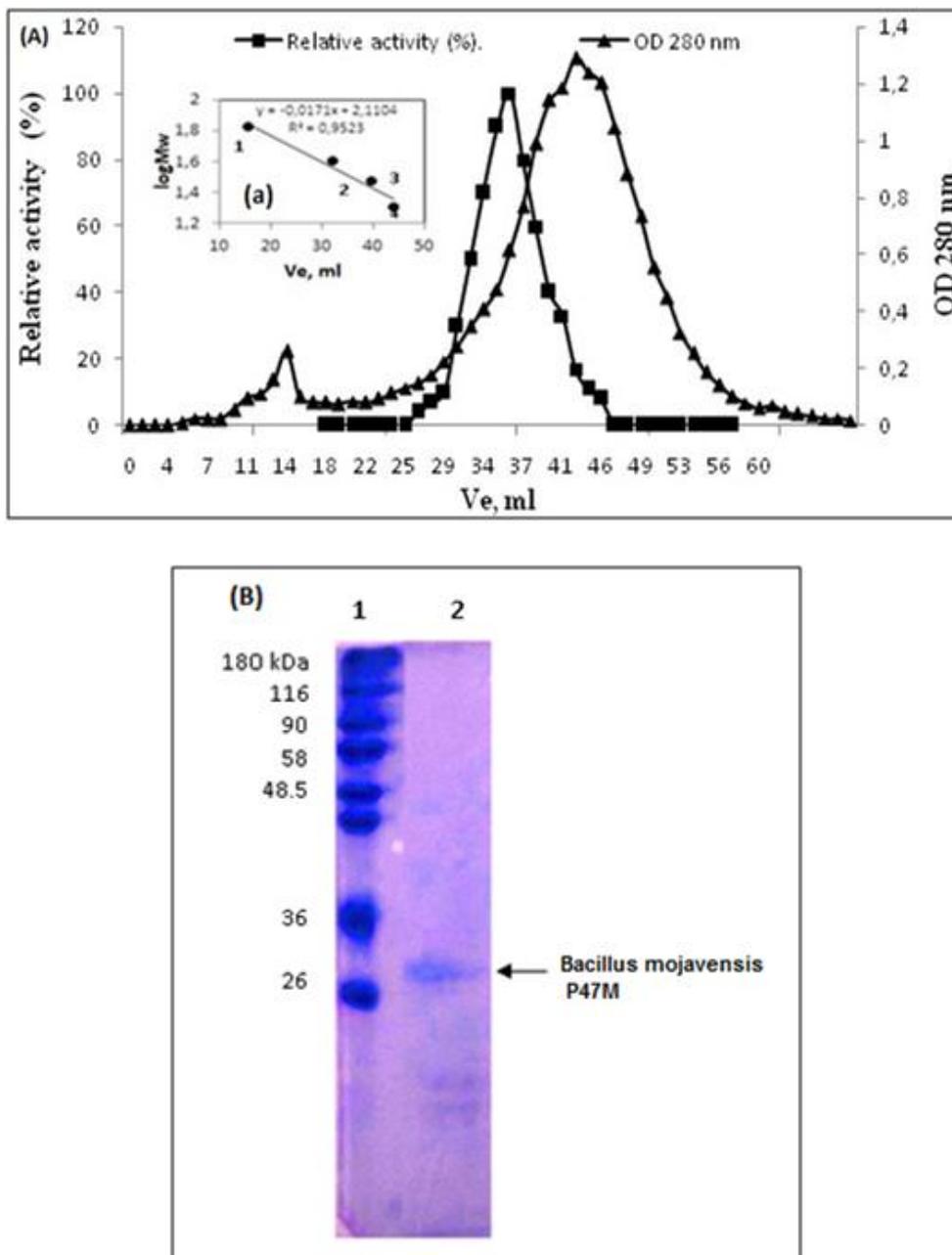


Figure 2: (A) Gel-exclusion chromatography through Sephadx G-75 of a crude extract of *B. mojavensis* P47M after precipitation with 40- 80% saturated ammonium sulphate strain and molecular weight determination of the milk-clotting enzyme *Circles* Molecular-weight standards: 1: Bovin serum albumin (67 kDa), 2: Ovalbumin (40kDa), 3: Carbonic anhydrase (30kDa), 4: trypsin (23.8k Da) (a). SDS-PAGE electrophoretogram of the *Bacillus mojavensis* P47M milk-clotting enzyme. Line 1: standard molecular weight markers, Line 2: (B) After purification by gel filtration.

Table 1
Purification steps of milk clotting enzyme from *B. mojavensis* P47M

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (SU)	Specific activity (SU/mg)	Recovery (%)	Purification Fold
Crude extract	668	5400	8,08	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (40-80%)	197,4	2640	13.37	48.8	1.65
GelfiltrationG-75	5,94	830	139,8	15.4	17.3

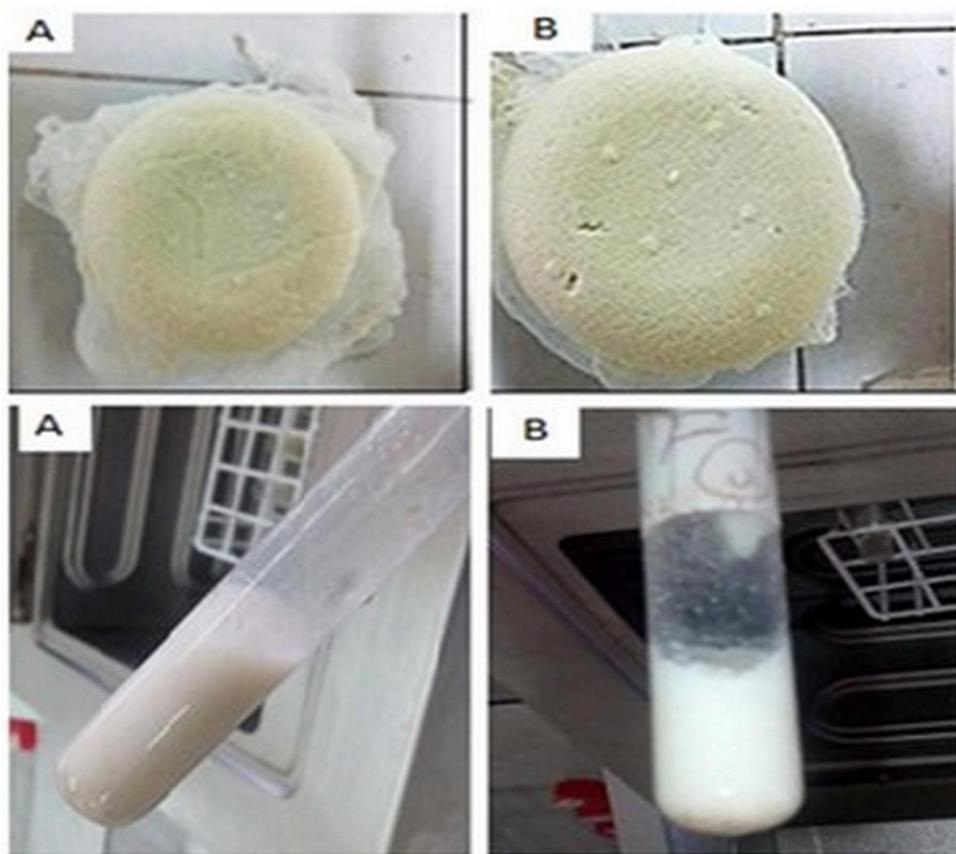


Figure 3: Crude cheese and aspect of milk-clotting activity in the assay tubes produced by (A) *Bacillus mojavensis* P47M and (B) commercial rennet *Aspergillus niger* var. *awamori*

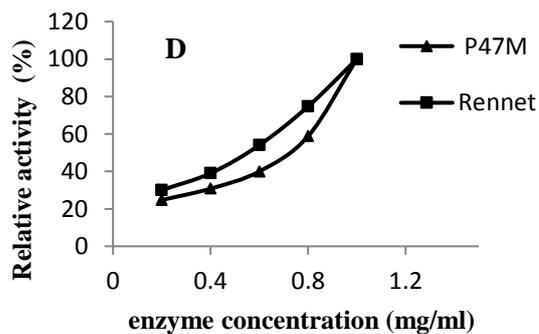
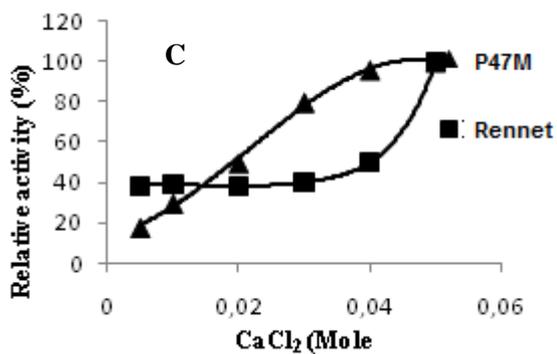
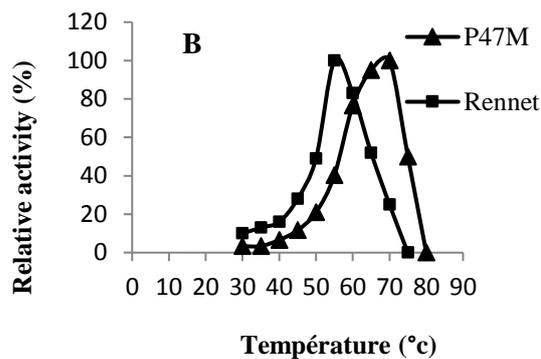
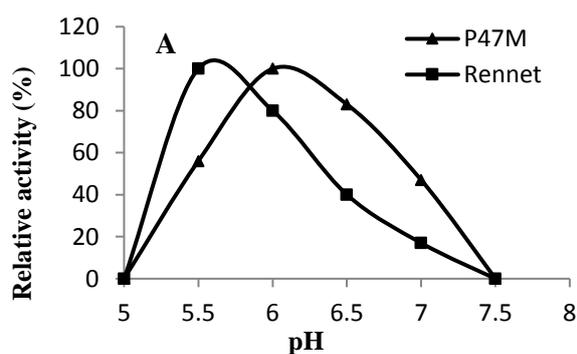


Figure 4: Physical–chemical properties of milk-clotting activities of the enzymatic extract from *Bacillus*: (A) Milk pH, (B) Effect of milk temperature, (C) Concentration of CaCl₂ and (D) Enzyme concentration on the activity.

Table 2
Effect of inhibitors on milk clotting activity (MCA) of enzymatic extract from *B. mojavensis* P47M

Inhibitor	Concentration (mM)	Residual activity (%)
Control	0	100
2-Mercaptoethanol	5	23
EDTA	5	0
Pepstatin A	0,01	53
	0,02	57

The coagulation rate increased with increasing concentration of 0.05M for both enzymes (Rennet and *B. mojavensis* P47M) and the saturation is not observed in this work. Ding et al⁷ observed similar phenomenon in *B. subtilis* B1 and showed that low concentrations (0 to 0.05 M) of CaCl₂ promoted the milk clotting activity when high concentrations (> 0.05 M) of CaCl₂ restrained the MCA. Some works reported earlier similar results from Bacillus strain such as *B. sphaericus*³¹ and *B. subtilis* K-26³².

Effect of enzyme concentration on milk clotting: It is well known that the coagulant in cheese making has a dual role to produce cheese curd and to develop texture and flavor during cheese ripening. Also, according to Foltman³³, the clotting time is reduced when the concentration of rennet is increased caused by an increase in the rate of proteolysis of κ -casein, though there is no direct proportionality between the values. This observation is in agreement with our results (figure 4D) for both enzymes which show that enzyme concentration is proportional to relative milk clotting potency (%).

Conclusion

In conclusion, this study allowed us to achieve main objective to contribute to a better understanding of coagulation proteases milk as a substitute for rennet derived from the culture of a bacterial strain *B. mojavensis* P47M. So, the preliminary study of a curd extract revealed that its physicochemical properties did not differ significantly from those of curds prepared with commercial rennet.

The enzymatic extract exhibits a good milk-clotting and the cheese making assay in laboratory did not differ with those obtained from commercial rennet. Although, strains P47M can thus be regarded as a potential source of milk-clotting enzyme with applications in the cheese industry particularly in Algeria who import rennet, requires additional studies to develop the production of microbial rennet.

Acknowledgement

The authors would like to thank Prof. Malek Amiali Director of food technology and human nutrition laboratory (ENSA, Algeria) for his kind help. The authors are also grateful to Prof. Benchabane Ahmed and Dr. Talantikite Souad for their valuable support and suggestions.

References

- Nouani A., Belhamiche N., Slamani R., Belbraouet S., Fazouane F. and Bellal M.M., Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization, *International Journal of Dairy Technology*, **62**, 112 (2009)
- Lemes A.C., Pavón Y., Lazzaroni S., Rozycki S., Brandelli A. and Kalil S.J., A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development, *LWT - Food Science and Technology*, **66**, 217 (2016)
- Cavalcanti M.T.H., Martinez C.R., Furtado V.C., Neto B.B., Teixeira M.F., Lima Filho J.L. and Porto A.L.F., Milk-clotting protease production by *Nocardia* sp. in an inexpensive medium, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **21**, 151 (2005)
- Silva B.L., Geraldes F.M., Murari C.S., Gomes E. and Da-Silva R., Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **172**, 1999 (2014)
- Li Y., Liang S., Zhi D., Chen P., Su F. and Li H., Purification and characterization of *Bacillus subtilis* milk-clotting enzyme from Tibet Plateau and its potential use in yak dairy industry, *European Food Research and Technology*, **234**, 733 (2012)
- Kumari Narwal R., Bhushan B., Pal A., Panwar A. and Malhotra S., Purification, physico-chemico-kinetic characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422, *LWT - Food Science and Technology*, **65**, 652 (2016)
- Ding Z., Liu S., Gu Z., Zhang L., Zhang K. and Shi G., Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran, *African Journal of Biotechnology*, **10**, 9370 (2011)
- Dutt K., Gupta P., Saran S., Misra S. and Saxena R.K., Production of milk-clotting protease from *Bacillus subtilis*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **158**, 761 (2009)
- Rajagopalan G. and Krishnan C., Optimization of agro-residual medium for α -amylase production from a hyper-producing *Bacillus subtilis* KCC103 in submerged fermentation, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **84**, 618 (2009)
- Talantikite-Kellil S., Nouani A., Saunier M., Gillmann L., Brahmi A. and Fazouane F., Isolation and identification of bacterial strain I33M producing milk-clotting enzyme: Optimization of culture parameters using response surface, *African Journal of Biotechnology*, **11**, 16594 (2012)

11. Stefanis C., Alexopoulos A., Voidarou C., Vavias S. and Bezirtzoglou E., Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities, *Folia Microbiologica*, **58**, 61 (2013)
12. Rao K.M.D., Studies on the production of bacterial rennet in pilot plant fermentor, *Biotechnol. Bioeng*, **17**, 1349 (1976)
13. Shieh C.J., Phan Thi L.A. and Shih I.L., Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis natto*, *Biochemical Engineering Journal*, **43**, 85 (2009)
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265 (1951)
15. Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680 (1970)
16. He X., Ren F., Guo H., Zhang W., Song X. and Gan B., Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4, *Korean Journal of Chemical Engineering*, **28**, 203 (2010)
17. Majumder R., Banik S.P. and Khowala S., Purification and characterisation of kappa-casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091, *Food Chemistry*, **173**, 441 (2015)
18. Abdel-Fattah A.F., El-Hawwary N.M. and Amr A.S., Studies on the production of milk-clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi, *Journal of General Microbiology*, **84**, 327 (1974)
19. Ageitos J.M., Vallejo J.A., Sestelo A.B., Poza M. and Villa T.G., Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13, *Journal of Applied Microbiology*, **103**, 2205 (2007)
20. Yasuda M., Aoyama M., Sakaguchi M., Nakachi K. and Kobamoto N., Purification and characterization of a soybean-milk-coagulating enzyme from *Bacillus pumilus* TYO-67, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 474 (1999)
21. Peng Y., Yang X. and Zhang Y., Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties and thrombolytic activity in vivo, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69**, 126 (2005)
22. Areces L.B., Bonino M.B., Parry M.A., Fraile E.R., Fernandez H.M. and Cascone O., Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **37**, 283 (1992)
23. Llorente B.E., Brutti C.B. and Caffini N.O., Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 8182 (2004)
24. Sidrach L., Garcia-Canovas F., Tudela J. and Rodriguez-Lopez J.N., Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A, *Phytochemistry*, **66**, 41 (2005)
25. Kumar C.G., Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*, *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 13 (2002)
26. Genckal H. and Tari C., Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats, *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 703 (2006)
27. Uyar F., Porsuk I., Kizil G. and Yilmaz E.I., Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15, *Eurasian Journal of Biosciences*, **1**, 1 (2011)
28. Wu F.C., Chang C.W. and Shih I.L., Optimization of the production and characterization of milk clotting enzymes by *Bacillus subtilis natto*, *SpringerPlus*, **2**, 33 (2013)
29. Esawy M.A. and Combet-Blanc Y., Immobilization of *Bacillus licheniformis* 5A1 milk-clotting enzyme and characterization of its enzyme properties, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 197 (2006)
30. Kowalchyk A.W. and Olson N.F., Milk Clotting and Curd Firmness as Affected by Type of Milk-Clotting Enzyme, Calcium Chloride Concentration and Season of Year, *Journal of Dairy Science*, **62**, 1233 (1979)
31. El-Bendary M.A., Moharam M.E. and Ali T.H., Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme Produced by *Bacillus sphaericus*, *Journal of Applied Sciences Research*, **3**, 695 (2007)
32. Rao L.K. and Mathur D.K., Purification and properties of milk-clotting enzyme from *Bacillus subtilis* K-26, *Biotechnology and Bioengineering*, **21**, 535 (1979)
33. Foltmann B., On the enzymatic and coagulation stages of the renneting process, *Journal of the Society of Dairy Technology*, **12**, 655 (1959).

(Received 23rd April 2017, accepted 26th June 2017)