

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE – EL- HARRACH

Thèse En vue de l'obtention du diplôme de magister en Sciences agronomiques
Option Sciences alimentaires

Extraction, purification et caractérisation de la coagulase de *Mucor pusillus*

Présenté par

Melle Nabila Belhamiche

Directeur de thèse : M^r. BELLAL M.M. Professeur (INA)

Co-Directeur de thèse: M^r. NOUANI A M.A. (Uni.)

Date de soutenance : 22/12/2005

Jury : **Président:** M^r. AMMOUCHE A. Professeur (INA) Boumerdès) **Examineurs** : M^r. MATI A.
M. . (Uni. Tizi-Ouzou) M^r. SABAOU N. Professeur (ENS)

Table des matières

Remerciements . .	5
Résumé . .	6
Abstract . .	7
ص خ لم . .	8
Introduction . .	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE . .	11
I- Les enzymes coagulantes des industries laitières . .	11
1 – La présure . .	11
2 – Les succédanés de présure . .	12
II- Le lait, substrat des protéases . .	17
1 – Les caractères du lait . .	17
2 – La composition globale . .	18
3 – Les caséines . .	19
4 – Mécanisme de la coagulation du lait . .	20
Matériel & Méthodes . .	23
I – Matériel biologique et milieu de culture . .	23
II – Obtention de l'extrait coagulant de <i>Mucor pusillus</i> . .	23
1 – Préparation de l'inoculum . .	23
2 – Ensemencement du milieu . .	23
3 – Extraction de l'enzyme . .	23
III – Etude des extraits coagulants . .	23
1 – Mesure de l'activité coagulante . .	24
2 – Mesure de l'activité protéolytique . .	24
3 – Dosage des protéines . .	24
IV – Purification de l'extrait enzymatique . .	25
IV.1 – Protocoles de purification . .	25
IV.2 – Méthodes de purification . .	26
V – Caractérisation de l'extrait coagulant purifié . .	29
1 – Détermination de la température optimale d'activité . .	29
2 – Influence de pH du lait . .	29
3 – Détermination de la concentration optimale de CaCl ₂ . .	29
4 – Influence de la concentration en extrait enzymatique . .	30
5 – Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique . .	30
Résultats & Discussion . .	31
I – Obtention de l'extrait enzymatique brut . .	31
II – Purification de l'extrait coagulant de <i>Mucor pusillus</i> . .	31
1 – Protocole I (Somkuti et Babel, 1968) . .	31
2 – Protocole II (Fernandez -Lahore et <i>al.</i> , 1998) . .	34
3- Détermination du poids moléculaire . .	46
III – Caractérisation de l'extrait fongique purifié et de la présure . .	46

1 – Influence de la température . .	47
2 – Influence de pH du lait . .	48
3 – Influence de la concentration en CaCl ₂ . .	49
4 – Influence de la concentration en extrait enzymatique . .	50
5 – Etude de la stabilité de l'extrait . .	51
6 – Activité protéolytique . .	54
Conclusion Générale . .	56
Références bibliographiques . .	57
ANNEXES . .	63
Annexe 1 . .	63
Annexe 2 . .	63
Annexe 3 . .	65
Annexe 4 . .	66
Annexe 5 . .	69

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance à mon enseignant Mr. BELLAL M.M., Professeur à l'Institut National Agronomique d'El-Harrach, pour avoir accepté de diriger ce travail malgré ses nombreuses occupations. C'est grâce à lui que je viens de faire mes premiers pas dans la recherche.

Il m'est agréable d'exprimer mes sincères remerciements à mon co-promoteur, Mr. NOUANI A., Maître assistant à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes, pour son aide précieuse, ses encouragements et surtout pour l'accueil qu'il m'a toujours réservé dans son laboratoire. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a témoignée. Ses qualités humaines et morales m'ont aidé à mener à terme ce travail, qu'il veuille trouver ici mon estime, ma gratitude et mon respect.

Mon profond respect et mes sincères remerciements vont à mon enseignant, Mr. AMMOUCHE A., Professeur à l'Institut National Agronomique d'El-Harrach, pour avoir accepté de présider le jury et d'apprécier la qualité de ce travail.

Je tiens à remercier Mr. MATI A., Maître de conférence à l'université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté de porter un jugement éclairé sur ce mémoire.

Mes remerciements vont à Mr. SABAOU N., Professeur à l'Ecole Normale Supérieure, qui a bien voulu examiner ce travail.

Je remercie vivement Melle. SLAMANI R., attachée de recherche à l'INRA, pour l'intérêt qu'elle a manifesté dans ce travail. Je lui exprime ma gratitude pour la bienveillante attention qu'elle m'a accordée tout au long de mon expérimentation. Mes sincères remerciements pour ses conseils et pour sa grande compétence. Elle a su me donner du courage pour affronter les longues journées passées au laboratoire. Je la remercie également pour tous ses sacrifices pour la réalisation de ce mémoire.

Il existe une personne que je ne saurai jamais assez remercier ; c'est Mr. LABADI R., technicien au laboratoire de chimie des sols du département sciences du sol (INA), qui a grandement contribué à l'aboutissement de ce mémoire. Il a su toujours me guider et me soutenir. Je le remercie également pour sa gentillesse et sa sympathie. J'ai bénéficié de toutes ses qualités humaines.

J'exprime ma reconnaissance à Melle. BENZITOUNI A., technicienne à l'Institut Pasteur d'Algérie pour sa disponibilité à tout moment sans oublier Mme. MOULAHOU M. pour ses orientations précieuses. Je remercie également Melle. KABLI pour son aide.

Je m'en voudrais de ne pas remercier mon camarade MANSOURI A. pour toute la documentation qu'il a mis à ma disposition et ce malgré son éloignement, sans oublier bien sur mon amie Souhila pour tous ses encouragements.

Toute ma reconnaissance à Mabrouk et Larbi, techniciens au département de technologie alimentaire (INA), pour leurs aides constantes, leurs conseils et surtout pour leur sympathie.

Mes remerciements vont également à notre bibliothécaire Baya pour sa disponibilité ainsi qu'à tous mes amis qui, à diverses reprises, ont manifesté leur soutien et leurs amitiés en particuliers Rosa, Nora, Sabiha, Rachid, Nucia, Fayçal, Nabil et Madjid.

Résumé

L'obtention d'une protéase coagulant le lait a été réalisée par culture en surface de *Mucor pusillus*. L'extrait brut présente une force coagulante de l'ordre de 1 /1200.

Des essais de purification de l'extrait coagulant ont été réalisés. Le meilleur rendement en activité a été obtenu par une chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100 de l'extrait brut lyophilisé.

L'électrophorèse sur PAGE-SDS a révélé une seule bande protéique homogène, caractérisée par un poids moléculaire de l'ordre de 49 000 Da.

Les conditions optimales d'activité coagulante ont été déterminées. L'activité est maximale à pH 5, à une température de 50°C et pour une concentration en CaCl₂ du lait de 0,02 M. L'enzyme est relativement stable dans l'intervalle de 30°C à 50°C pendant 30 mn d'incubation ainsi qu'aux basses températures.

Ces propriétés sont relativement similaires à ceux de la présure traditionnelle, exception faite pour la température.

Mots-clés : Protéases de *Mucor pusillus* , purification, caractérisation, coagulation du lait, présure.

Abstract

The obtaining of the milk-clotting protease was carried out by solid-state culture of the strain of *Mucor pusillus*. The crud extract show clotting strength about 1 / 1200.

The purification tests of the clotting extract were realised. A better recovery was obtained by molecular size chromatography on Sephadex G-100 of the lyophilised crud extract.

The SDS- PAGE data was reveal a single homogeneous band, characterised by its molecular weight measured about 49 000 Da.

The clotting optimal conditions activities were determined. The activity is maximum at a pH 5, at a temperature of 50°C and for a 0,02 M CaCl₂ concentration. The enzyme is relatively stable from 30°C at 50°C after 30 mn incubation period and at low temperature of conservation.

This properties were relatively similar with the rennet one except for the temperature.

Keys words: *Mucor pusillus* proteases, purification, characterisation, milk-clotting, rennet.

ص خ لم

البحر:

لحصول على البروتين لمخثر الحليب قد تم بالزرع اسطحي لأورمة *Mucor pusillus*.

لمستخلص الإنزيمي بقوة تخثر مقدارها 1/1200.
عند محاولات تنقية المستخلص لمخثر الحليب تم إنجازها. أفضل مردود لوحظ بعد عملية الفصل الجزئي للمستخلص الخام المجفف. التحليل الإلكتروني أظهر إنزيم مخثر ممتلئة، تتميز بوزن جزيئي قدره 49000 دالتون.
ظروف المثالية لعمل الإنزيم قد تم تحيينها. عمل الإنزيم تكون ذروته عند pH قدره 5، عند درجة حرارة تقدر بـ 50 °م وعند تركيز $CaCl_2$ يقدر بـ 0,02 مول. المستخلص الإنزيمي يتميز بالاستقرار بين درجة حرارة 30 °م إلى 50 °م لمدة 30 د وعند درجة حرارة منخفضة. هذه الظروف متشابهة مع لمروبات ما عدا الحرارة.

كلمات المفتاح : بروتين ، *Mucor pusillus* ، تنقية ، تمييز ، مخثر الحليب ، لمروبات.

Introduction

La présure animale, qui renferme essentiellement de la chymosine, constitue l'agent coagulant le plus utilisé dans la coagulation enzymatique du lait. Toutefois, son extraction demanderait des sacrifices trop onéreux. En effet, la présure nécessite la récupération, après l'abattage, des caillettes de veaux non sevrés ; ceci affecte lourdement les coûts par la faiblesse du rendement en viande.

L'augmentation de la production fromagère impose une utilisation croissante d'enzyme de coagulation qu'il n'est pas possible d'obtenir par le seul traitement des présures, car la production de veaux de lait est fluctuante.

En Algérie, l'industrie fromagère a utilisé, durant la période (1997-2001), 4,324 Kg de présure et ses concentrés, soit un coût de l'ordre de 16 millions de DA (Rapport des statistiques du Commerce Extérieur, 2001).

Comme toute industrie alimentaire, la fromagerie subit des pressions provoquées d'une part par la demande croissante du marché et d'autre part, par la nécessité de rentabiliser ses opérations de transformation.

Ainsi, la production limitée d'enzyme et l'augmentation de la demande par une industrie fromagère qui ne cesse de se développer ont provoqué une situation de pénurie de présure. Cette situation et la totale dépendance de notre pays en matière d'approvisionnement en agents coagulants vis-à-vis des laboratoires étrangers imposent la recherche de produits susceptibles de remplacer la présure, en particulier d'origine animale, végétale et microbienne. Par ailleurs, les principaux critères d'un succédané de présure consistent en :

- l'obtention de produits fromagers comparables à ceux de la présure de veau ;
- L'absence de toxicité ;
- Un prix de revient moins élevé à celui de la présure.

Plusieurs préparations coagulantes ont été étudiées par notre équipe de recherche. Les pepsines avicoles, bovines et ovines présentent des propriétés qui se rapprochent de celles de la présure animale (Morsli, 1996 ; Bengana, 2001 ; Slamani, 2002). Cependant, la disponibilité des coagulases animales demeure tributaire du marché de la viande.

Nos études ont porté également sur les coagulases végétales notamment, les extraits coagulants du figuier, de la fleur du cardon et des graines de melon. Toutefois, ces succédanés sont doués d'une excessive activité protéolytique qui confère aux produits finis des caractères organoleptiques indésirables (Morsli, 1996 ; Mouzali, 2001 ; Fernani, 2002).

Notre intérêt est porté sur l'étude d'une protéase coagulant le lait, issue de la culture d'une souche bactérienne isolée localement ; le *Bacillus subtilis* LC 33 . Les activités coagulantes de cette coagulase sont comparables à celles de la présure commerciale (Matoub, 2000). Néanmoins, l'activité protéolytique élevée de cette coagulase limite son emploi industriel.

A l'échelle industrielle, trois souches fongiques productrices de coagulases sont exploitées par les grandes usines de fermentation en vue de fabrication fromagère. Il s'agit de : *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* et d'*Endothia parasitica*. En effet, en 1974, les coagulants

fongiques ont assuré la fabrication de 60% de fromages aux Etats Unis (Sternberg, 1976). Les conditions d'emploi en fromagerie de ces préparations, selon Goursaud (1999) sont :

- Le mélange des enzymes coagulantes d'origine fongique avec la présure ou ses dérivés, est interdit.
- Seuls les fromages au lait de vache peuvent être coagulés avec ces préparations.
- Les fromages à appellation d'origine sont obligatoirement coagulés par la présure.

Par ailleurs, des études comparatives de ces enzymes coagulantes et de la chymosine ont indiqué de grandes similarités dans le mécanisme de la coagulation du lait. De plus, plusieurs variétés de fromages préparées avec ces extraits sont semblables à celles obtenues avec la présure. Ainsi, l'extrait coagulant d'*Endothia parasitica* a conduit à des résultats satisfaisants dans la fabrication des fromages à pâte molle. Les coagulases de *Mucor*, selon Luquet (1985), ont permis d'obtenir des fromages de bonne qualité dont les rendements fromagers sont voisins de ceux de la présure de veau.

En revanche, les souches de *Mucor* et d'*Endothia parasitica*, au cours de leurs développement, secrètent en plus de leurs protéases coagulantes des enzymes protéolytiques non spécifiques, des cellulases et des lipases. Selon Lemieux et Simard (1991), ces enzymes confèrent au fromage un goût d'amertume ; d'où la nécessité de les éliminer. Ainsi, les préparations brutes sont traitées en utilisant des méthodes physico-chimiques : filtration, centrifugation et précipitation par des solvants ou par des sels, et /ou des méthodes chromatographiques. Des études ont montré que l'amélioration du rapport activité coagulante par l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique de *Mucor* a été obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une échange ionique (Anstrup, 1980).

A la lumière d'une étude réalisée sur la possibilité d'obtenir un extrait coagulant à partir de la culture de *Mucor pusillus*, souche référencée 953771 du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, les conditions de culture ainsi que la croissance ont été déterminées (Belhamiche, 2001).

L'objectif de notre présente étude vise une meilleure connaissance d'une coagulase fongique issue de *Mucor pusillus*. Dans ce contexte, l'approche a consisté en :

- L'obtention de la coagulase par culture en surface de *Mucor pusillus* et l'optimisation d'un protocole de purification ;
- La recherche des conditions optimales d'activité coagulante de l'extrait coagulant purifié et de la présure ;
- Et la caractérisation de l'aptitude protéolytique des extraits brut et purifié par comparaison à la présure industrielle.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Les enzymes coagulantes des industries laitières

1 – La présure

1.1 – Historique

Il y a environ 7000 ans, le lait était transporté dans des sacs. Ces sacs, appelés outres, étaient fait avec l'estomac de certains animaux. Or, un voyageur de cette époque qui décida de se rafraîchir avec le lait qu'il transportait, eu la surprise de découvrir que le lait s'était transformé en une substance semi solide. Intrigué et affamé, il goûta le contenu de son outre et ne trouva pas ça mauvais du tout, il venait de découvrir le fromage.

Ainsi, nous savons depuis ce temps là qu'une substance contenue dans l'estomac des jeunes ruminants fait cailler le lait. En fait, cette substance s'appelle la présure.

1.2 – Définition

La présure est la préparation coagulante provenant de la quatrième poche de la caillette des jeunes ruminants nourris exclusivement au lait. Elle constitue la principale enzyme traditionnellement utilisée dans l'industrie laitière.

En fait, l'extrait coagulant renferme essentiellement deux protéases: la chymosine et la pepsine.

1.3 – Propriétés

Majeure composante de la présure, la chymosine (E.C.3.4.23.4) est sécrétée sous forme de prochymosine inactive. Sous l'action de l'acidité du milieu, elle devient active.

Comme la pepsine, la chymosine est une protéase acide à aspartate. Son poids moléculaire est de 30 700 Da. Selon Foltmann (1979), la chymosine est constituée d'une seule chaîne peptidique renfermant 323 acides aminés.

Outre son activité coagulante, spécifique sur la caséine κ , la chymosine a une activité de protéolyse générale sur toutes les fractions caséiniques.

L'activité optimale de cette enzyme a lieu à pH 5,5 et à une température de 42°C. Elle est stable à pH acide 5,3 et 6,3 et dénaturée à pH 8. Son inactivation thermique, selon Goursaud (1999), a lieu dès 50°C et elle est totale à 61°C.

La sécrétion de la pepsine (E.C.3.4.23.1), d'après Ramet (1990), ne devient prépondérante qu'une fois la synthèse de la chymosine est arrêtée. Cette protéase est caractérisée par un poids moléculaire de 33 400 Da. Bien que l'action protéolytique de la pepsine est voisine de celle de la chymosine ainsi que les fortes homologues de structure que présentent ces deux enzymes, les conditions d'action sont différentes. En effet, selon Martin et al. (1982) et Goursaud (1999), il y a une différence importante en pratique qui

consiste en l'influence du pH sur l'activité ; la chymosine est encore active à pH 6,8, alors que la pepsine ne coagule plus le lait au dessus de pH 6,7.

La pepsine est relativement stable entre pH 5 et 5,5 et instable à pH 2. En solution, elle est thermosensible après 50°C. D'après Goursaud (1999), sa dénaturation thermique a lieu à partir de 70°C.

1.4 – Extraction

La présure est obtenue par macération de caillettes des jeunes bovidés dans une saumure de NaCl et contenant des additifs nécessaires à la conservation et à la coloration. Le jus est ensuite purifié par diverses méthodes physico-chimiques et chromatographiques.

Selon Goursaud (1999), un litre d'extrait commercial au 10 000^e est obtenu à partir de 1 à 2 caillettes de 60 g.

2 – Les succédanés de présure

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

Cependant, un succédané de la présure animale doit présenter une bonne solubilité dans l'eau, un degré de pureté élevé et une activité protéolytique et lipolytique faibles. En plus, il ne doit pas contenir d'enzymes contaminantes (telles les lipases).

Par ailleurs, il doit respecter, selon Ramet (1990) et Smeets (1995), les modalités habituelles du déroulement du processus de la fabrication fromagère. Pour cela, tout succédané de présure doit répondre aux critères suivants :

- L'activité protéolytique de l'enzyme ne doit pas être trop élevée ;
- Les propriétés rhéologiques du coagulum doivent évoluer après floculation de manière à assurer le travail mécanique du gel dans les délais habituels ;
- La synérèse du coagulum au cours de l'égouttage et les modalités d'affinage devaient permettre d'obtenir les caractéristiques usuelles des fromages dans un délai sensiblement égal à celui de la présure ;
- Les rendements fromagers doivent être très proches ou supérieurs à ceux obtenus lors de l'emploi de la présure.

D'un point de vue réglementaire, comme tout additif, l'emploi des enzymes doit être soumis à une réglementation stricte qui permet d'éviter tout risque de toxicité. Selon Noor-Develliet *et al.* (1983) :

- Le milieu de culture utilisé dans le cas des enzymes microbiennes ne doit laisser aucun résidu nocif ou toxique ;
- Les micro-organismes utilisés doivent être non pathogènes et ne pas produire de toxines ou de substances cancérigènes ;
- Les préparations enzymatiques commercialisées ne doivent pas contenir de contaminants microbiens ;

- Les agents de stabilisation et de dilution doivent être dans un état d'innocuité ;
- Les doses d'utilisation des préparations enzymatiques doivent être respectées afin d'éviter les conséquences dangereuses d'un surdosage.

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

2.1 – Les succédanés de présure d'origine végétale

Différentes préparations enzymatiques obtenues à partir de certains organes de végétaux sont capable de cailler le lait ; les plus connues sont : la ficine, la papaine et la broméline.

L'utilisation de la fleur de cardon comme agent coagulant a été considérée comme l'un des facteurs déterminants de la qualité des fromages typiques portugais au lait de brebis (Sousa et Malcata, 1997 ; Agboola, 2002 ; Zhao et al., 2003).

L'extrait coagulant du *Cynara cardunculus* L. a fait l'objet de l'étude menée par Mouzali (2001). Il a été conclu que, malgré que les caractères physico-chimiques de cette enzyme soient proches de ceux de la présure, cet agent coagulant se caractérise par une activité protéolytique excessive.

Selon certains auteurs (Macedo et al., 1993 ; Martin et al., 1996 ; Silva et Malcata, 1998 ; Vioque et al., 2000), l'extrait coagulant du *Cynara cardunculus* présente deux protéases acides aspartiques : la cardosine A, tout comme la chymosine, est responsable de l'activité coagulante et la cardosine B, similaire à la pepsine, est la principale responsable de l'activité protéolytique. Cependant, la fleur de cardon n'est pas utilisée, selon Macedo et al. (1996), dans la fabrication des fromages au lait de vache vu le goût amer qu'elle lui confère.

D'autres coagulases ont été étudiés, en l'occurrence, l'extrait du figuier (Oner et Akar, 1993 ; Fadyloglu, 2001) et de l'artichaut (Llorente et al., 2004).

De nouvelles plantes ont fait l'objet de plusieurs études afin de pouvoir les substituer à la présure animale. En effet, les travaux de Kaneda et Tominaga en 1975 ainsi que ceux de Uchikoba et al. en 1995 ont porté sur l'extraction et la purification de la Cucumisine (E.C.3.4.21.25), protéase serine capable de coaguler le lait et extraite à partir de la chair de melon (*Cucumis melo* L var.Prince).

Récemment, la lactucine, une protéase coagulante provenant des feuilles de la laitue (*Lactuca sativa* L.), a été purifiée et caractérisée (Lo Piero et Petrone, 1999 ; Lo Piero et al., 2000).

Notre équipe de recherche s'est intéressée à l'étude d'enzymes coagulants le lait d'origine végétale, en l'occurrence, la ficine (Morsli, 1996 ; Ball Ibrahima, 2000). Par ailleurs, Fernani (2002) a pu étudier un succédané local issu des graines de melon, fruit très répandu en Algérie et dont l'exploitation n'engagerait pas de dépenses considérables.

Bien que de nombreux coagulants d'origine végétale ont été expérimentés il faut, toutefois, noter qu'ils sont peu utilisés en technologie laitière. Selon Green (1977) et Lopez et al., (1996), le pouvoir coagulant très variable de ces extraits ainsi que leurs activité protéolytique très élevée confèrent un goût d'amertume pour le fromage.

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

2.2 – Les succédanés de présure d'origine animale

L'appareil digestif de certains mammifères secrète diverses protéases autres que la présure notamment la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine. Les deux premières enzymes bien que capables de coaguler le lait, ont donné de mauvais résultats en fromagerie à cause de leur activité protéolytique excessive.

La pepsine bovine, selon Anifantakis et Kandarakis (1983), peut substituer, avec succès, la présure habituelle dans la fabrication du fromage Feta.

La pepsine porcine, en mélange avec la présure, permet d'obtenir de meilleurs résultats dans la fabrication de fromages acides (Ramet, 1990).

L'utilisation de la pepsine du lapin, comme agent susceptible de remplacer la présure, a été rapportée par Abd-EL-Rahman et *al.* en 1990.

Par ailleurs, la pepsine du pro ventricule du poulet a été utilisée, selon Cuvellier (1999), avec succès dans la fabrication de fromages locaux en Israël.

La paroi interne de l'estomac de la morue de l'atlantique secrète une pepsine qui permet de coaguler le lait à 15°C plus efficacement que la chymosine de veau d'où la possibilité, selon Haard et *al.* (1980), de contrôler l'activité protéolytique excessive par inactivation thermique.

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

Une étude relative à la possibilité d'obtenir des coagulases d'origine avicole, menée par notre équipe de recherche, a montré que les abats de poulet particulièrement le pro ventricule de *Gallus gallus* constitue une source potentielle de coagulases. Selon Morsli (1996), cet extrait du pro ventricule du poulet a permis la fabrication d'un fromage à pâte molle (Camembert) dont la qualité organoleptique ainsi que le rendement étaient comparables au fromage témoin préparé avec la présure. Par ailleurs, il a été constaté que le comportement de cette enzyme est analogue à celui de la présure traditionnelle (Morsli et *al.*, 2000).

La recherche des coagulases de remplacement de la présure a été orientée vers la possibilité d'explorer les abats de bovins adultes, d'ovins et ceux de poissons. En effet, d'après l'étude de Bengana (2001), la substitution de la présure par la pepsine bovine a permis son utilisation avec succès pour la fabrication de fromage à pâte molle type Camembert.

Par ailleurs, les caillettes d'ovins constituent une source potentielle de pepsine qui peut être substituée, en partie, à la présure. En effet, l'étude menée par Slamani en 2002 a fait ressortir que les caractéristiques de la pepsine ovine se rapprochent à celles de la pepsine bovine.

L'obtention de la pepsine à partir de l'estomac de divers poissons en l'occurrence le mérrou, le merlan et le limon a été également réalisée. Dans ce contexte, les travaux de Nouani et *al.* en 2002 ont porté sur l'utilisation de l'extrait coagulant du merlan dans la fabrication de fromage de type Edam ; cet extrait a donné, dans une première étape, un bon coagulum. Dans une étude similaire, Machou (2004) a noté que le comportement de la pepsine de limon (*Seriola dumerili*) diffère très peu de celle de la présure traditionnelle.

Bien que certains succédanés peuvent être considérés comme produits de remplacement de la présure de veau, il convient, toutefois, de noter que comme l'élaboration de la présure, leur disponibilité reste tributaire du marché de la viande.

2.3 – Les succédanés de présure d'origine microbienne

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

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

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

Le principe de production des enzymes microbiennes exo cellulaires comporte la culture de micro organisme dans un milieu de culture approprié à partir duquel l'enzyme est extraite. Le traitement de la biomasse est nécessaire dans le cas des enzymes endocellulaires.

La production industrielle d'enzyme comporte un certain nombre d'étapes, telles que la préparation de l'inoculum, le milieu de culture, la fermentation, l'extraction, la purification et le conditionnement sous diverses formes ; liquides, poudres ou lyophilisées dans le cas d'une purification poussée (Cuvellier, 1999).

2.3.1 – Les succédanés bactériens

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

Des souches ont été isolées localement par notre équipe de projet en l'occurrence, *Bacillus subtilis* S3 et *Bacillus coagulans* (Chemlal, 1998) et *Bacillus subtilis* LC33 (Matoub, 2000).

Selon ces auteurs, les extraits obtenus présentent des caractéristiques cinétiques relativement analogues à celles de la présure traditionnelle.

Cependant, l'utilisation des enzymes bactériennes n'a pas dépassé le stade expérimental. Selon Mahon et Brown (1985), des essais assez poussés avec ces préparations coagulantes ont indiqué la présence d'une activité protéolytique trop élevée par comparaison à la présure dans les mêmes conditions de la coagulation du lait.

2.3.2 – Les succédanés fongiques

Parmi les espèces fongiques à pouvoir coagulant, seules trois moisissures sont exploitées par les grandes usines de fermentation en vue de la production de coagulases.

Le *Mucor pusillus* produit une coagulase avec un rendement élevé seulement en culture solide (Aunstrup, 1980). Les rendements obtenus par Somkuti et Babel en 1968 sur milieu liquide étaient extrêmement bas. Par ailleurs, l'étude menée par Belhamiche en 2001, a rapporté une force coagulante de 2400 US /ml en culture en surface contre une force de 14,81 US /ml en culture submergée.

La protéase du *Mucor pusillus* est une protéase acide avec un résidu aspartate au niveau du site actif. Elle est constituée d'une seule chaîne peptidique et son poids moléculaire est d'environ 30 000 Da.

Les travaux de Khan et *al.* en 1983, ont montré l'existence de deux protéases acides et une alcaline dans le mycélium (protéases intracellulaires).

La préparation enzymatique est commercialisée par la firme Japonaise MEITO-SANGYO sous la dénomination de Noury-Renn.

Le *Mucor miehei* est bien adapté à la fermentation submergée. Il secrète une protéase acide à aspartate ayant un poids moléculaire d'environ de 38 000 Da. La coagulase contient une seule chaîne peptidique avec 6 % de carbohydrates.

L'extrait coagulant est commercialisé par :

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

L' *Endothia parasitica* est cultivée en culture submergée. L'enzyme est beaucoup plus protéolytique que celle du genre *Mucor*. Son poids moléculaire varie entre 34 000 et 39 000 Da. Elle est constituée d'une seule chaîne peptidique.

La préparation coagulante est produite par une firme Américaine PFIZER sous la dénomination Suparen.

Des études comparatives réalisées avec certaines présures fongiques et la chymosine ont indiqué de grandes similarités dans le mécanisme de coagulation du lait. En effet, selon Luquet (1985), les protéases fongiques, contrairement aux protéases bactériennes, ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure. Cependant, d'après Lemieux et Simard (1991), les préparations commerciales contiennent de multiples enzymes protéolytiques et d'autres enzymes qui influent la fabrication du fromage. Ainsi, selon Sternberg (1976), un fromage fabriqué avec la préparation cristalline du *Mucor pusillus* var. Lindt présente un goût moins amer que celui fabriqué avec la préparation brute de la même présure fongique.

Par ailleurs, certaines préparations commerciales de *Mucor pusillus* contiennent une lipase dont l'incorporation dans le caillé constitue l'origine probable du taux élevé des acides gras volatiles et du goût amer de certains fromages fabriqués avec cette enzyme.

Les coagulants du genre *Mucor* ont été largement utilisés dans la fabrication de plusieurs variétés de fromages, bien que de légères modifications dans la technique de la fabrication fromagère sont parfois avérées nécessaires car l'action protéolytique spécifique sur les caséines n'est pas étroitement semblable à la présure. Selon Ramet (1981), des différences sensibles aux variations du pH, de la température et du calcium induisent une rhéologie spécifique du gel durant le caillage et l'égouttage.

L'utilisation de la préparation Noury avec l'addition du CaCl_2 dans la fabrication du fromage Gouda a donné un fromage très semblable à celui fabriqué avec la présure.

Par ailleurs, les travaux de Polychroniadou et Manolkidis en 1984 ont montré la bonne aptitude que possèdent les extraits coagulants: Noury, Rennet, Rennilase et Suparen à la fabrication de fromage de chèvre à croûte fleurie.

La préparation Rennilase a été utilisée dans la fabrication des fromages italiens : l'Edam et le Camembert mais avec des rendements légèrement inférieurs à ceux fabriqués avec la présure. En revanche, selon Reys et *al.* (1979), les propriétés des préparations produites par le *Mucor pusillus*, et surtout celles de la Fromase, sont bien comparables à celles de la présure.

Reignier (1980) confirme qu'il est parfaitement possible, grâce à l'utilisation de l'enzyme extraite de *Mucor miehei* (solution Rennilase), de fabriquer, en adaptant les processus technologiques, des fromages d'excellente qualité (Goursaud, 1999).

Enfin, certains auteurs en l'occurrence, Green et Stackpoole (1975) et Jarmul et *al.* (1982) ont montré l'efficacité d'utiliser une préparation fongique (Noury ou Fromase) en mélange avec la pepsine dans la fabrication de fromage.

2.4 – Production de la chymosine fermentaire

Grâce au développement du génie génétique, il est actuellement possible de produire de la chymosine à partir de micro-organismes (Aikawa et *al.*, 1990 ; Alais et Linden, 1997 ; Collin et *al.*, 1997 ; Rao et *al.*, 1998 ; Beldarrain et *al.*, 2000 ; Munoz et *al.*, 2004).

La chymosine fermentaire résulte du clonage du gène responsable de la production de la chymosine à partir de l'estomac de veau sur certains micro-organismes ; les plus utilisés sont: *Escherichia coli*, *Klebsyveromyces* et *Aspergillus*.

Cette méthode constitue l'une des voies porteuses d'espoir pour la synthèse d'enzymes utilisables dans l'industrie laitière.

La chymosine produite par les micro-organismes, selon Goursaud (1999), a une structure identique à celle synthétisée dans l'estomac du jeune bovidé et fournit les mêmes performances que la présure pure en terme d'activité enzymatique, utilisation et conservation.

II- Le lait, substrat des protéases

Le lait est un produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée, le lait est la principale matière première pour la fabrication d'un fromage.

1 – Les caractères du lait

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

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

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

2 – La composition globale

Le lait est riche en protéines, matière grasse, lactose, vitamines et sels minéraux. Les teneurs moyennes du lait de vache en ses principaux groupes de constituants sont illustrées dans le tableau I.

Outre sa complexité et son hétérogénéité, le lait présente, selon Martin et Coulon (1995), une grande variabilité dans sa composition avec la race, l'espèce, l'individu, la saison et l'alimentation de l'animal. La composition moyenne des principaux constituants des divers types de lait, selon Alais (1984), est indiquée dans le tableau II.

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

Les teneurs du lait en ses différents constituants (g /l)	
CONSTITUANTS MINÉRAUX	
Eau	902
Constituants salins minéraux	6,2
Gaz dissous	0,1
CONSTITUANTS ORGANIQUES	
Constituants salins organiques	1,7
Lactose	49
Matière grasse	38
Protéines ou constituants azotés protéiques	32
- Caséine	26
- Protéines dites solubles	6
Constituants azotés non protéiques.	1,5

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

	Eau	Extrait sec total	Matières azotées			Matière grasse	Lactose	Sels minéraux
			Total	caséine	NPN (%)*			
Vache	87,30	12,50	3,50	78	5	3,50	4,70	0,80
Chèvre	87,10	13,60	4,00	75	7	4,30	4,50	0,80
Brebis	81,00	19,10	6,00	77	5	7,50	4,50	1,10
Bufflesse	87,50	17,80	3,60	80	---	7,50	4,70	0,80

Tableau II : La composition moyenne des différents types de lait en leurs principaux constituants (pour 100 g du lait) (Alais, 1984).

3 – Les caséines

La micelle de caséine est une particule sphérique formée par l'association des caséines (κ s₁, κ s₂, β et α), de quelques fragments peptidiques (les caséines γ) issus de la protéolyse de la caséine α et de composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphate (Brule et Lenoir, 1990).

Les caséines du lait ont la caractéristique essentielle de précipiter à pH 4,65 à température ambiante et de ne pas être insolubilisée par le chauffage à 100°C. Les quatre types de caséines, selon Terrien et Fournier (1998), n'ont ni les mêmes propriétés physico-chimiques, ni les mêmes masses moléculaires.

De nombreux modèles, concernant l'organisation de la micelle, ont été émis. Le plus récent, selon Linden et Lorient (1994), est celui de D.G. Schimdt. Ainsi, la micelle est composée d'un noyau hydrophobe, entouré d'une couche polaire rassemblant les parties riches en groupements phosphoriques et groupements hydrophiles ; la caséine κ s'y trouvait concentrée.

La croissance des micelles s'arrête lorsque la surface externe est occupée par les groupements hydrophiles (Figure1).

Quelle que soit la structure réelle, la micelle est composée, dans le lait de vache, de l'association d'environ 11 000 molécules de caséines κ s₁, κ s₂, β et α en proportions relatives 4-1-4 -1,3 (d'après Holt, 1992) de phosphate et citrate de calcium et magnésium (Tarodo de la Fuente et al., 1999).

Deux facteurs sont responsables de la stabilité des micelles :

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

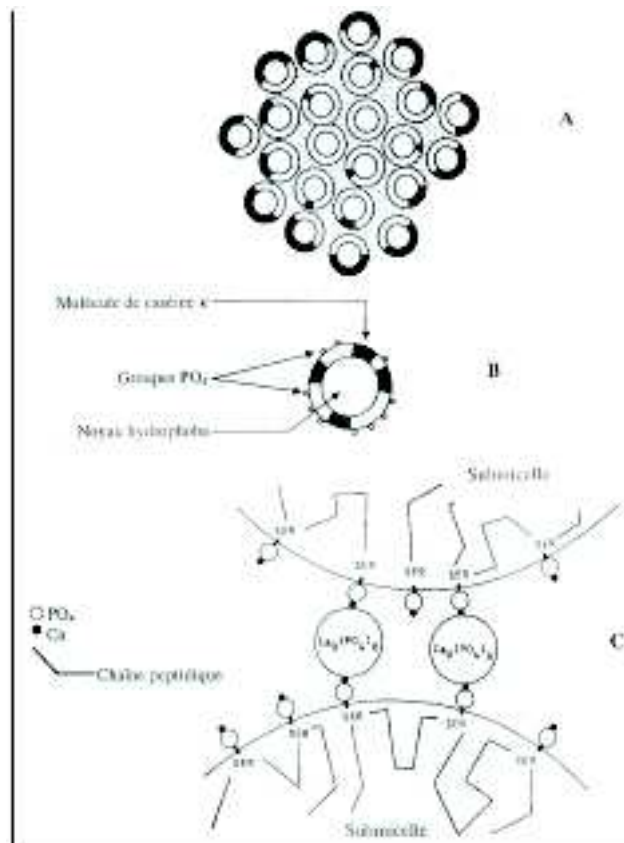


Figure 1 : Modèle de formation des micelles selon Schimidt (Ramet, 1990). A : micelle, B : submicelle, C : pontage de deux submicelles.

4 – Mécanisme de la coagulation du lait

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

4.1 – La coagulation acide

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

Lorsque le pH est voisin de 5, la charge des submicelles est très réduite et la précipitation s'amorce (point isoélectrique de la caséine), la neutralisation des charges est complète ; les micelles des caséines flocculent et se soudent formant au repos un gel homogène qui emprisonne le lactosérum et occupe entièrement le volume du lait. Au cours

de la déminéralisation du complexe phosphocaséinate de calcium, le calcium colloïdal migre dans le sérum.

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

4.2 – La coagulation par la présure

La coagulation par l'action des enzymes protéolytiques se déroule en deux étapes. La première est purement enzymatique. Selon Lenoir et *al.* (1985), elle correspond à une protéolyse très limitée et très spécifique de la caséine par la présure. En effet, la chymosine, principale composante de la présure, exerce une action spécifique sur la caséine κ en hydrolysant sa liaison très labile (Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶). Ainsi, la molécule de la caséine κ se scinde en deux segments inégaux : le paracaséine κ qui reste intégré à la micelle, est insoluble et acide, et le caséinomacropéptide qui se dissocie de la micelle, il est soluble, acide et est éliminé dans le lactosérum.

Le détachement du caséinomacropéptide de la micelle la rend instable. En effet, il se produit la réduction des charges négatives de la micelle et de son degré d'hydratation. Ainsi, ses facteurs de stabilité se trouvent affectés. Des liaisons s'établissent entre les micelles modifiées permettent leur agrégation et la formation d'un gel dans la mesure où il n'est pas agité ; c'est la phase de coagulation (Mc.Mahon et Brown, 1984 ; Khalid et *al.*, 1990 ; Mietton et *al.*, 1994 ; Tarodo de la Fuente et *al.*, 1999 ; Schorsch et *al.*, 2002).

Il faut, toutefois, signaler qu'une réaction de protéolyse générale se déroule, dès la première phase de coagulation enzymatique, sur toutes les caséines sous l'effet de la chymosine.

Le gel présure est très minéralisé, ce qui lui permet sa cohésion et sa fermeté avant le déclenchement de la synérèse.(Mietton et *al.*, 1994 ; Tarodo de la Fuente et *al.*, 1999).

4.3 – La coagulation mixte

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

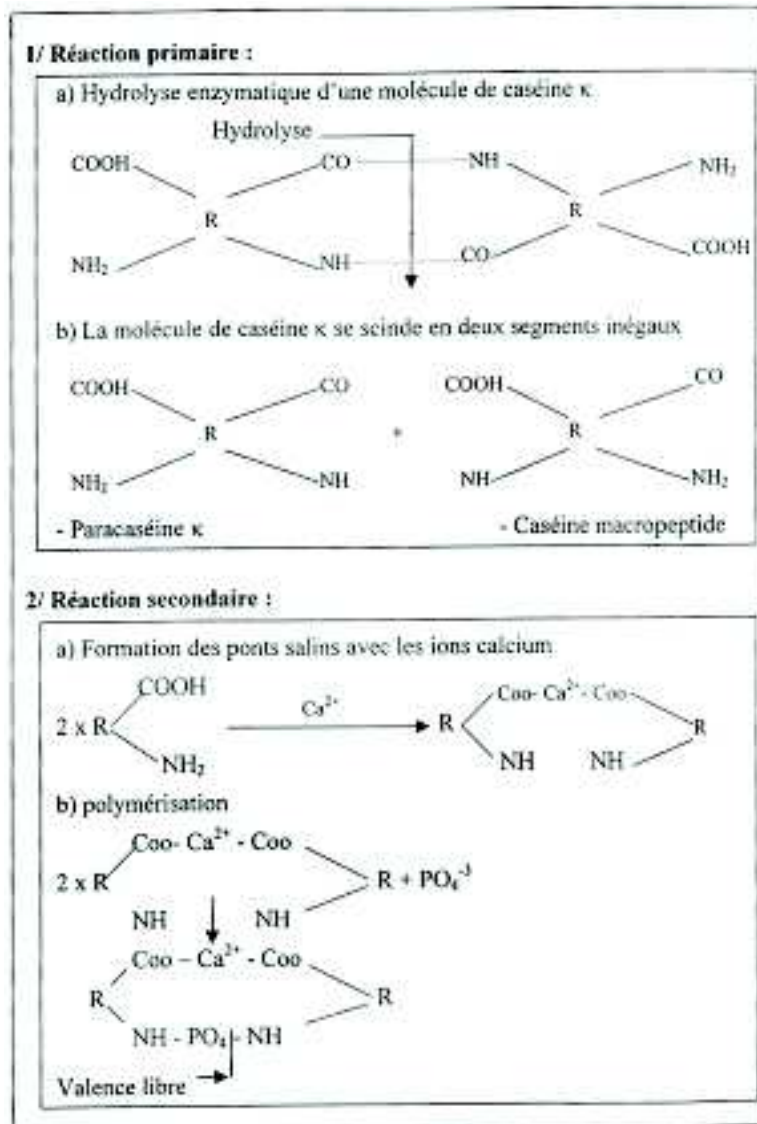


Figure 2 : Mécanisme de la coagulation du lait par la présure (Garnier et al., 1968 in : Alais, 1984).

Matériel & Méthodes

I – Matériel biologique et milieu de culture

Au cours de notre expérimentation, nous avons utilisé une souche fongique : *Mucor pusillus* référencée 953771, provenant sous forme lyophilisée du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris – Laboratoire de Cryptogamie –.

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

Le milieu de culture utilisé est de type solide (fermentation en surface), préconisé par Levadoux et *al.* (1989). Il est composé de 60 g de son de blé et de 10 ml d'une solution à 0,01 % de sulfate d'ammonium.

Le choix de ce type de fermentation repose sur les résultats obtenus par des travaux antérieurs (Belhamiche, 2001).

II – Obtention de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*

1 – Préparation de l'inoculum

Après ensemencement des boîtes de pétri contenant le milieu malt gélosé et leur incubation à 37°C pendant 5 jours, les spores sont libérées à l'aide d'une solution à 0,1 % de tween 80. La suspension de spores est filtrée sur de la laine de verre stérile.

2 – Ensemencement du milieu

10 ml du filtrat servent à inoculer le milieu de culture contenu dans un erlen de 500 ml. Le milieu ainsi ensemencé est incubé à 37°C pendant 4 jours (durée d'incubation optimisée par Belhamiche (2001)).

3 – Extraction de l'enzyme

A la fin de l'incubation, 200 ml du tampon phosphate (0,02 M ; pH 6) sont ajoutés dans l'erlen. Après agitation mécanique pendant 1 heure à 300 trs /mn, le contenu est filtré puis centrifugé à 10 000 g pendant 30 mn à + 4°C.

III – Etude des extraits coagulants

1 – Mesure de l'activité coagulante

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

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

Avec :

$$UP = \frac{10 \times V}{T_c}$$

V: volume de lait (substrat de Berridge)* ajusté à pH 6,4 et porté à 35°C. (Voir annexe 1)

v : volume de l'extrait enzymatique.

T_c : temps de coagulation en secondes.

2 – Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est mesurée selon la méthode de Green et Stackpoole (1975) (annexe 2). Elle permet l'évaluation du taux de dégradation du substrat (caséine) pendant la réaction primaire. Cette activité est déterminée par mesure de la concentration en produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA à 12 %). Le dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode de Lowry et *al.* (1951).

3 – Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est réalisé selon la méthode de Lowry et *al.* (1951) (annexe 3). Le principe de cette méthode se base sur la coloration bleue développée par les protéines suite à une réaction entre le réactif de Folin et les acides aminés, principalement la tyrosine et le tryptophane et à un degré moins la cystéine et l'histidine.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration protéique contenue dans les extraits. Cette concentration est déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie en utilisant le sérum d'albumine bovin (B.S.A. à 200 µg /ml) (annexe 3, figure 3).

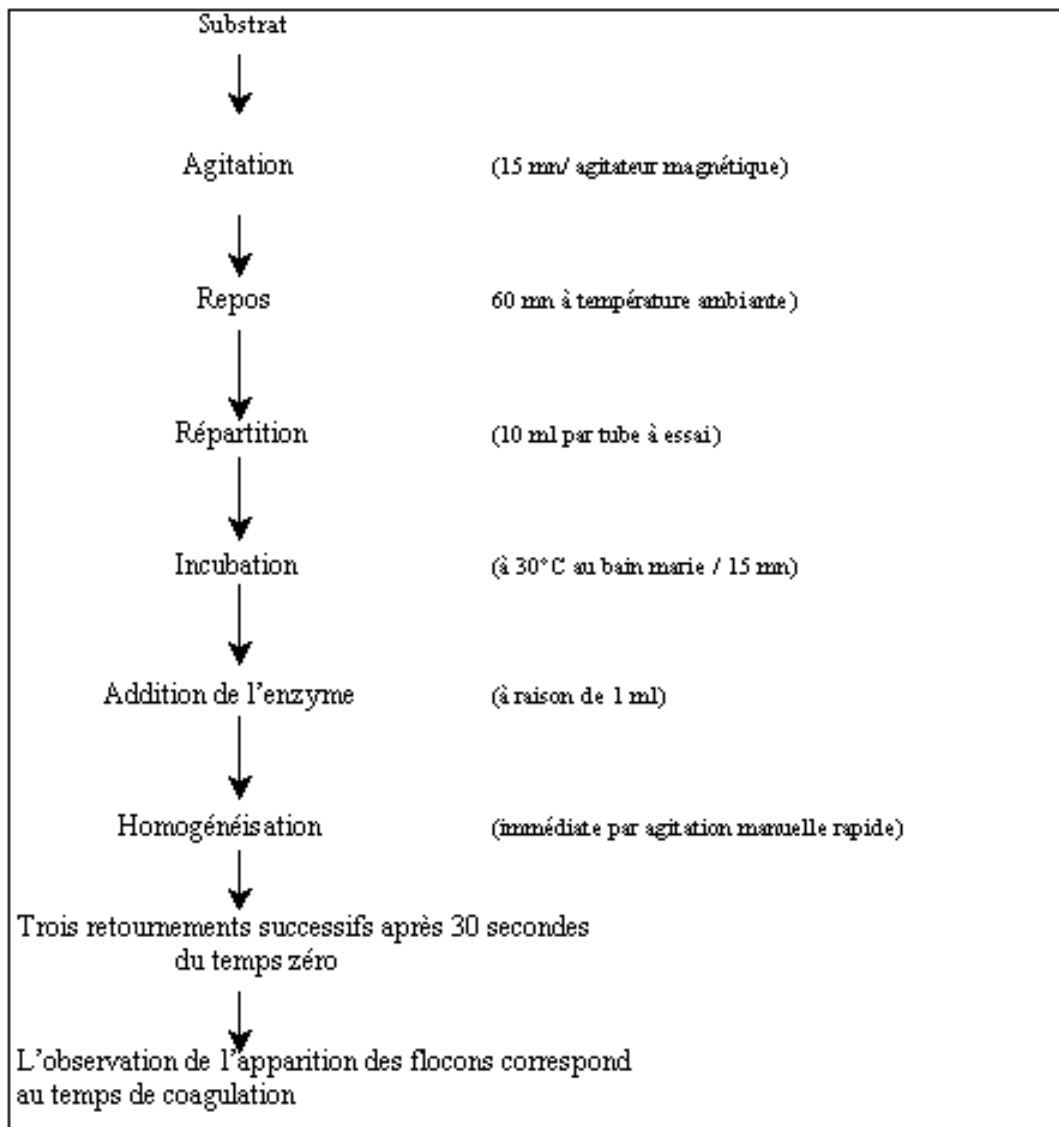


Figure 3 : Mesure du temps de coagulation par la méthode de Berridge (1945) modifiée par Collin et al. (1977).

IV – Purification de l'extrait enzymatique

IV.1 – Protocoles de purification

Afin de pouvoir purifier l'extrait enzymatique coagulant issu de la culture de *Mucor pusillus*, nous nous sommes basés sur deux protocoles de purification. Le premier est préconisé par Somkuti et Babel (1968) ; le second est proposé par Fernandez-Lahore et al. (1998). Ce dernier a été modifié en remplaçant l'ultrafiltration par la précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation (figure 4).

IV.2 – Méthodes de purification

1 – Précipitation au sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium provoque, dans une solution protéique, une déshydratation et une précipitation des protéines induisant ainsi le phénomène de relargage.

L'avantage du relargage est que les protéines conservent leur conformation native et peuvent être redissoutes habituellement sans dénaturation.

L'extrait enzymatique brut est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation. La solution enzymatique ainsi saturée est mise à décanter à + 4°C pendant une nuit. Après centrifugation à 10 000 g pendant 30 mn à + 4°C, le culot est mis en suspension dans le tampon phosphate (0,02 M ; pH 6).

2 – Dessalage de l'extrait enzymatique

L'élimination du sulfate d'ammonium de l'extrait coagulant est réalisée par la gel filtration sur une colonne Pharmacia (20 x 1 cm) contenant du Sephadex G-25, dont la zone de fractionnement est de 1000 à 5000 Da. Les fractions actives sont rassemblées puis concentrées avec du saccharose.

3 – Concentration avec le saccharose

Cette méthode permet de réduire une quantité considérable d'eau présente dans l'échantillon en utilisant le principe d'osmose où l'eau migre à travers la membrane semi-perméable du milieu le moins concentré vers le plus concentré. Elle consiste à saupoudrer du saccharose sur le boudin de dialyse placé dans un récipient à + 4°C.

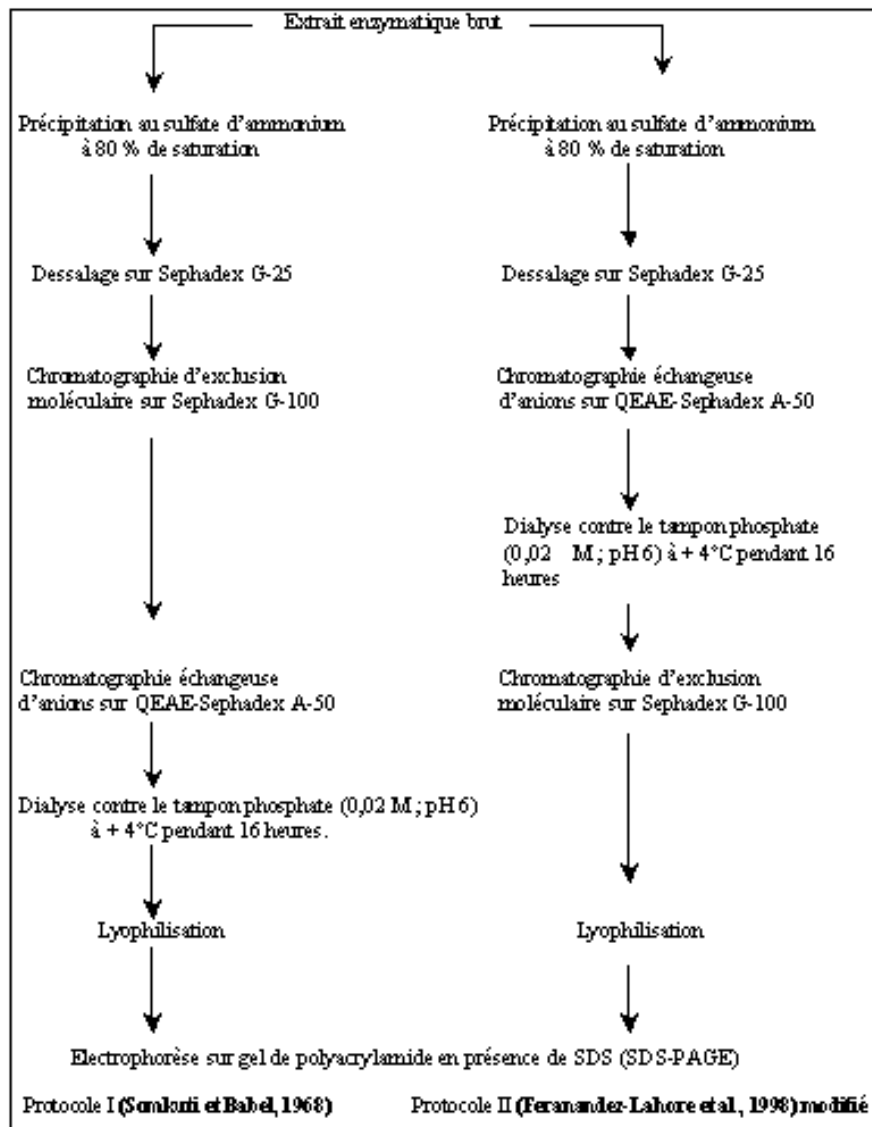


Figure 4 : Schéma des protocoles suivis au cours de la purification.

4 – Chromatographie échangeuse d'anions

La chromatographie échangeuse d'anions permet de séparer les protéines selon leurs charges. En effet, sur une phase stationnaire échangeuse d'anion (Cl^-), les protéines chargées négativement seront retenues. En revanche, les protéines chargées positivement seront éluées en premier. Les protéines retenues sur la phase stationnaire sont ensuite éluées en modifiant la force ionique de l'éluant (phase mobile).

Dans notre étude, nous avons utilisé l'échangeur Q.E.A.E.(Quaternary-amino-ethyl)-Sephadex A 50, qui est un gel de dextrane sur lequel sont fixés les groupements chargés positivement.

Le gel, gonflé dans du tampon phosphate (0,02 M ; pH 6) est dégazé et coulé dans une colonne (1 x 20 cm) équilibrée avec le même tampon.

Après concentration de l'extrait, les protéines sont éluées à + 4°C en utilisant un gradient linéaire NaCl de force ionique allant de 0 à 0,5 M préparé dans le même tampon.

Le débit d'éluion est maintenu constant à 45 ml /heure. La lecture de la densité optique est effectuée à 280 nm. Les fractions présentant une activité coagulante sont rassemblées et dialysées contre le tampon phosphate (0,02 M ; pH 6) durant 16 heures à + 4°C.

5 – Chromatographie d'exclusion moléculaire

La chromatographie d'exclusion moléculaire (la filtration sur gel) est une technique qui permet la séparation des molécules en fonction de leurs poids moléculaires et de leurs tailles.

La séparation est réalisée dans un ordre décroissant des poids moléculaires ; il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion (V_e) et le logarithme du poids moléculaire (Log PM) de la protéine.

La colonne Pharmacia (1 x 60 cm) est calibrée avec un mélange de protéines standards à poids moléculaires connus ; sérum albumine bovin : 67 000 Da ; pepsine : 35 000 Da et trypsine : 23 8000 Da.

Une quantité aliquote de 1,5 ml d'échantillon est éluée avec le tampon phosphate (0,02 M ; pH 6) à un débit de 2 ml / heure. La lecture des densités optiques est réalisée à 280 nm. Les fractions douées d'une activité coagulante sont rassemblées et concentrées puis conservées.

6 – Lyophilisation

La lyophilisation est un procédé de concentration et de conservation des protéines. Elle comporte deux étapes ; la congélation puis la sublimation (passage sous vide directement de l'état solide à l'état vapeur) (Kamoune, 1998). Les fractions actives rassemblées sont congelées et lyophilisées en vue d'une étude électrophorétique.

7 – Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du dodecyl sulfate de sodium (SDS- PAGE)

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la séparation des protéines en fonction de leurs charges et de leurs poids moléculaires.

Le S.D.S. ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{-SO}_3, \text{Na}^+$) est agent dénaturant qui se fixe sur les protéines leur conférant une charge négative. De ce fait, la mobilité électrophorétique du complexe S.D.S protéines dépendra du poids moléculaire.

A chaque étape de purification, un échantillon est conservé à l'état congelé ou lyophilisé en vue d'une électrophorèse dans le but de contrôler l'homogénéité, la pureté de l'enzyme et de déterminer son poids moléculaire.

Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de masse moléculaire d'une protéine et sa mobilité électrophorétique au sein d'un gel. La détermination de la masse moléculaire des échantillons est effectuée en utilisant une courbe étalon où $\text{Log (PM)} = f(\text{Rf})$.

Le rapport frontal R_f est calculé grâce à la relation suivante :

Distance parcourue par la protéine

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la protéine}}{\text{Distance de migration de bleu de bromophénol}}$$

Distance de migration de bleu de bromophénol

Les différents échantillons ainsi que les marqueurs, repris volume à volume dans le tampon échantillon sont séparés sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de séparation à 12 % et d'un gel de concentration à 5 % (voir annexe 5).

La migration électrophorétique est réalisée grâce à un système d'électrophorèse « Max Fill Bioblock Scientific » dans les conditions suivantes :

- Voltage : 250 V
- Ampérage : 74 mA
- Température ambiante
- Temps : 1 heure.

La révélation des protéines ainsi séparées se fait par la coloration du gel au bleu de Coomassie (R-250) pendant deux heures suivie d'une décoloration jusqu'à apparition nette de bandes.

V – Caractérisation de l'extrait coagulant purifié

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

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

1 – Détermination de la température optimale d'activité

La température optimale de coagulation du lait a été déterminée en portant le lait à différentes températures de 25°C à 65°C.

2 – Influence de pH du lait

L'influence de pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été déterminée en faisant varier le pH du lait de 5,0 à 7,2.

3 – Détermination de la concentration optimale de CaCl₂

L'influence de la concentration en CaCl₂ sur l'activité coagulante a été déterminée en faisant varier la concentration du lait en ions CaCl₂ de 0,00 M à 0,05 M.

4 – Influence de la concentration en extrait enzymatique

Les activités coagulantes ont été déterminées en faisant varier la concentration en protéines de l'extrait de 0,06 mg /ml à 0,3 mg /ml.

5 – Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique

5.1 – Stabilité thermique

La stabilité thermique de l'extrait a été étudiée en mesurant son activité coagulante résiduelle après maintien de l'extrait enzymatique à des températures variables de 30°C à 60°C pendant 30 mn.

5.2 – Stabilité au cours de la conservation

La stabilité de l'extrait coagulant au cours de la conservation à + 4°C et à -18°C a été déterminée en mesurant l'activité coagulante résiduelle de l'extrait.

Résultats & Discussion

I – Obtention de l'extrait enzymatique brut

La culture de *Mucor pusillus* est menée sur milieu solide (son de blé) à 37°C pendant 4 jours. L'extraction de l'enzyme est réalisée par addition du tampon phosphate (0,02 M ; pH 6). Après une heure d'agitation à 300 trs /mn, le contenu est filtré puis centrifugé à 10 000 g pendant 30 mn à + 4°C. Le surnageant représente l'extrait enzymatique brut dont un litre est obtenu à partir de cinq fermentations (soit 300 g de son de blé). Il est caractérisé, en moyenne, par :

- une activité coagulante de 0,34 UP /ml ;
- une quantité en protéines de 2,47 mg/ml ;
- et une force coagulante de 1/1200.

II – Purification de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*

L'objectif principal de notre étude consiste en la mise en évidence d'un protocole de purification. Pour cela, l'extrait enzymatique brut issu de la culture du *Mucor pusillus* subit plusieurs étapes de purification afin d'obtenir une coagulase pure. A cet effet, après chaque étape, l'activité coagulante totale de la protéase, la quantité totale de protéine, l'activité spécifique, le rendement en activité et le facteur de purification sont déterminés.

A fin de purifier notre coagulase, nous avons adopté le protocole de purification préconisé par Somkuti et Babel (1968) puis celui proposé par Fernandez-Lahore et al. (1998).

1 – Protocole I (Somkuti et Babel, 1968)

Après la précipitation de l'extrait enzymatique brut au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation, le culot est repris dans du tampon phosphate (0,02 M ; pH 6), dessalé sur Sephadex G-25 puis concentré avec du saccharose. Cette étape a permis, d'après les résultats illustrés par le tableau III, d'obtenir une activité de 52,07 % par rapport à l'activité initiale et de multiplier par un facteur de 3,19 l'activité spécifique de la coagulase.

Le profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100 du précipité dessalé et concentré (161,28 mg) relève deux pics d'élution (figure 5).

Le test d'activité indique que seul le premier pic est doué d'une activité coagulante, ce qui nous laisse supposer que la coagulase en question est de haut poids moléculaire. Par ailleurs, une légère augmentation de l'activité spécifique et du facteur de purification a été constatée avec un rendement de 44,54 %. De plus, la filtration sur gel a permis d'éliminer environ 94,2 % des protéines non actives.

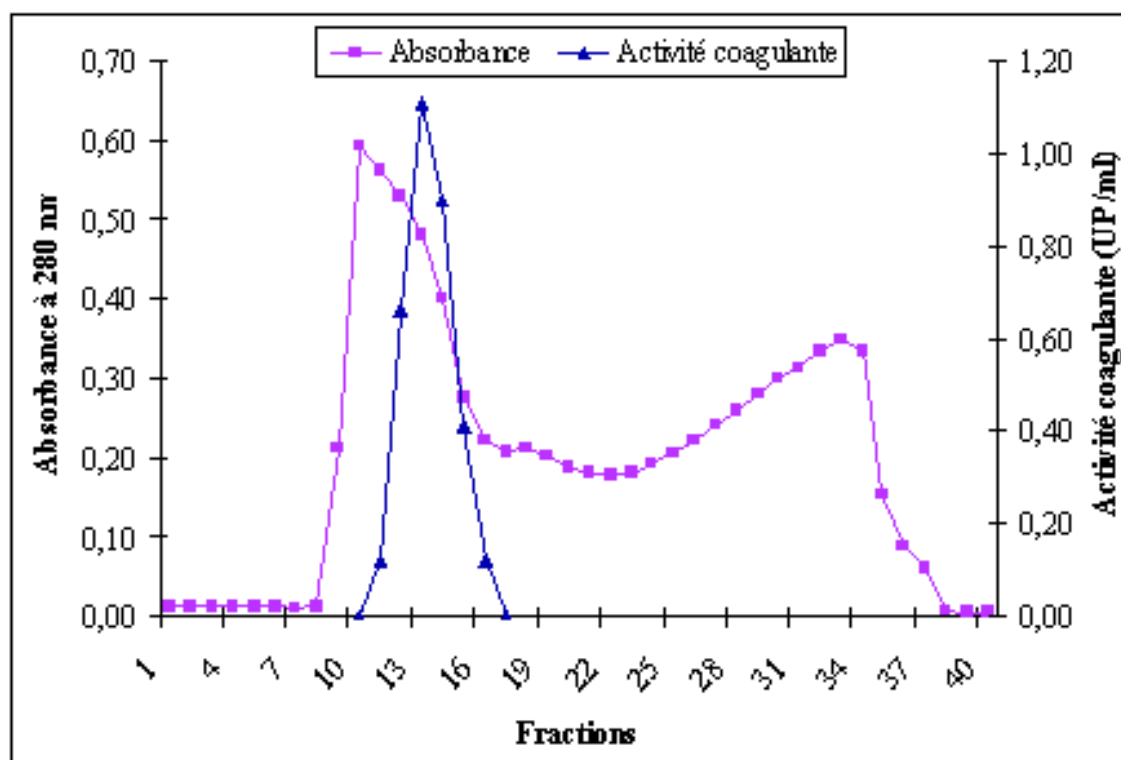


Figure 5 : Profil d'éluion sur Sephadex G-100 de l'extrait enzymatique de *Mucor pusillus* après précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation. (Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'éluion phosphate (0,02 m; ph 6), débit : 6 ml /h, Fraction de 1 ml).

Paramètres Etapas de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
E. E. B.	153	988	0,154	100	1
↓↓ (NH₄)₂SO₄ (80% de saturation)	79,68	161,28	0,494	52,07	3,19
Filtration sur gel	68,16	57,6	1,183	44,54	7,68
Echangeuse d'anions	28,8	10,8	2,666	18,82	17,31

Tableau III : Bilan de purification de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*(Protocole I).

Les résultats obtenus par Somkuti et Babel (1968), indiquent quatre pics d'éluion (dont un seul est actif) après une gel filtration avec l'élimination d'une quantité importante de

pigments colorés présente dans l'extrait enzymatique brut avec un facteur de purification, de deux fois supérieur à celui observé dans notre étude.

De même, Lenoir et al. (1979), ont pu éliminer 98 % des protéines non actives avec un rendement en activité de 50 %.

Le profil chromatographique d'échange d'anions sur QEAE- Sephadex A-50 de la fraction active issue de la filtration moléculaire, rapporté par la figure 6, montre trois pics dont un seul est actif. L'enzyme est éluée avec le gradient NaCl à une concentration de 0,35 M. Ceci suggère que notre coagulase est de nature anionique. Au cours de cette étape, nous avons enregistré une augmentation du facteur de purification soit de l'ordre de 17,31. Cependant, le rendement en activité chute à 18,82 %.

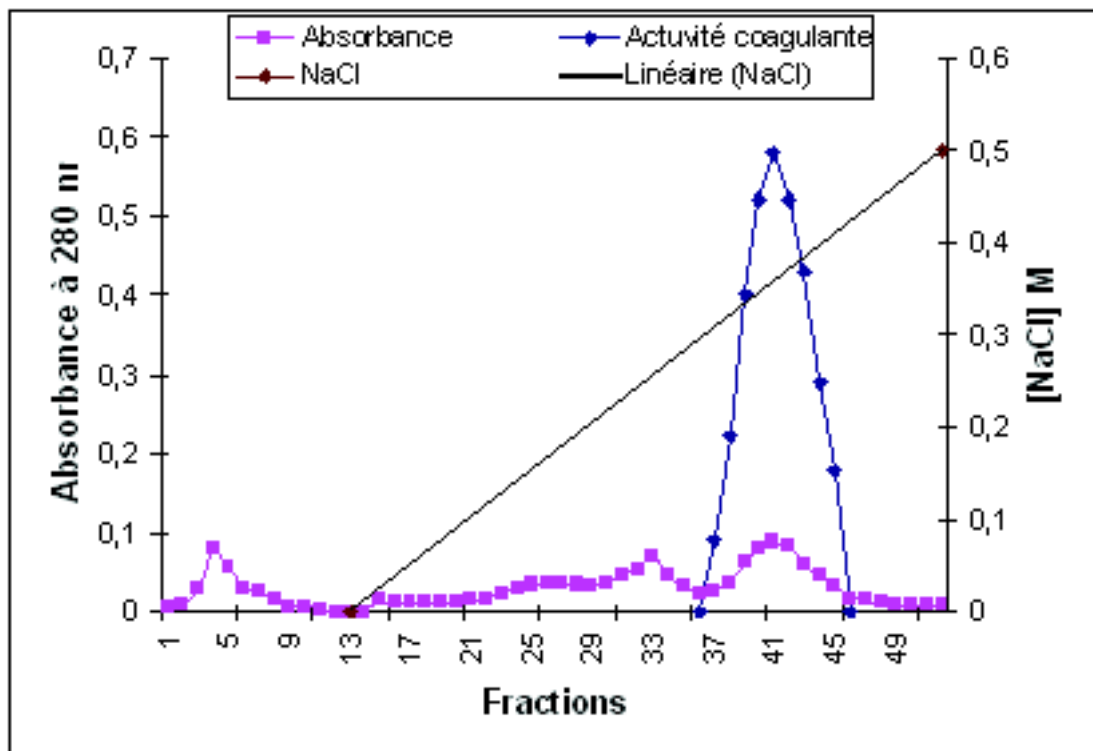


Figure 6 : Profil d'éluion sur QEAE-Sephadex A50 de la fraction active l'extrait enzymatique de *Mucor pusillus*, issu de la filtration moléculaire. (Colonne (1 x 20 cm), tampon d'éluion phosphate (0,02 M ; pH 6), Gradient NaCl 0- 0,5 m, débit : 45 ml /h, Fraction de 2 ml).

Après une échangeuse d'anions, Somkuti et Babel (1968), ont isolé une fraction enzymatique principale pour une concentration en NaCl comprise entre 0,3 et 0,4 M avec un rendement de 55 % et un facteur de purification de 34.

Dans une étude similaire portée sur la purification de la protéase du *Penicillium caseicolum*, Lenoir et al. (1979), ont obtenu un rendement de purification supérieur à 40 % tout en multipliant par un facteur de 29 l'activité spécifique de cette coagulase. En revanche, la purification de la lettuceine, menée par LoPiero et Petrone (1999), en adoptant une précipitation au sulfate d'ammonium, une filtration sur gel, une échange d'anions puis une seconde filtration sur gel, a conduit à un bilan de purification se traduisant par un rendement de 60 % et un facteur de purification de 5.

Afin de déterminer l'homogénéité de la protéine purifiée, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS est réalisée. Pour cela, plusieurs échantillons ont été utilisés à savoir : l'extrait brut, l'extrait précipité, la fraction active issue de la filtration sur gel et la fraction active issue de l'échangeuse d'anions .

Le profil électrophorétique, illustré par la figure 7, relève une succession de bandes dans le surnageant brut (A) ainsi que dans le précipité au sulfate d'ammonium (B), une seule bande dans la fraction active issue du Sephadex G-100 (C) et également une seule dans la fraction coagulante obtenue du QEAE- Sephadex A-50 (D).

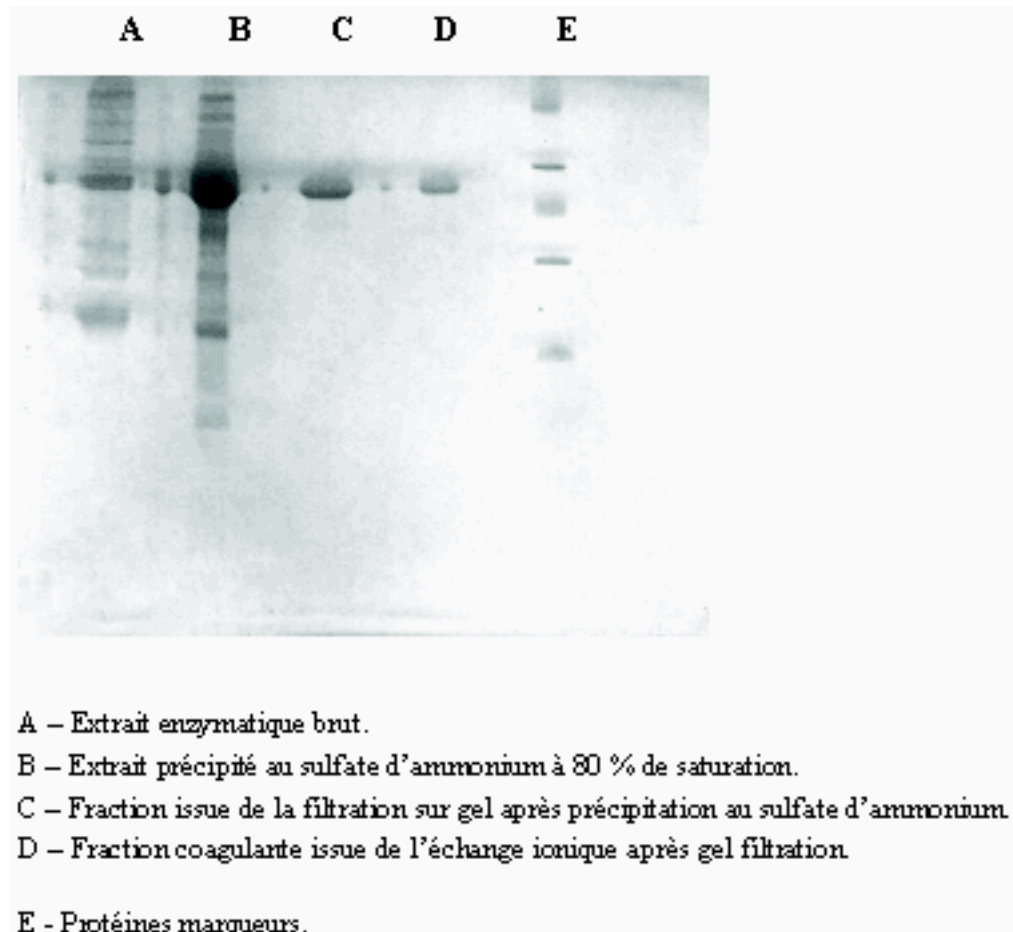


Figure 7 : Profil électrophorétique des extraits coagulants de *Mucor pusillus* (Protocole I)

Ces résultats indiquent que les mêmes bandes existent et dans le précipité et dans l'extrait brut. Ce qui explique que la précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation avait comme objectif la concentration de l'extrait brut. De plus, la filtration sur gel après précipitation a permis d'obtenir une bande homogène ce qui nous laisse conclure que l'étape d'échange d'anions n'est pas nécessaire dans notre cas. Par ailleurs, nos résultats concordent avec ceux d'autres auteurs (Somkuti et Babel, 1968 ; Lenoir et *al.*, 1979), qui ont observé une bande homogène à la fin de la purification.

2 – Protocole II (Fernandez -Lahore et *al.*, 1998)

Ce protocole comprend une ultrafiltration, une chromatographie échangeuse d'anions et une filtration sur gel. Cependant, pour des raisons de disponibilité nous avons remplacé l'ultrafiltration par une précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation. Le profil de la chromatographie sur QEAE- Sephadex A-50 du précipité au sulfate d'ammonium à 80% de saturation (161,28 mg) montre trois pics distincts (figure 8). L'activité coagulante, constatée dans le troisième pic est éluee à une concentration en NaCl de 0,35 M.

Cette étape a permis d'obtenir un facteur de purification relativement élevé voisin de 13, cependant, le rendement a chuté à 23,21 % (tableau IV). Selon l'étude de la coagulase de *Mucor pusillus* portée par Khan et al. (1979), l'échange ionique à pH 8 a révélé deux pics correspondant à deux protéases l'une est douée d'une activité coagulante très signifiante et l'autre présente une très faible activité coagulante avec un rendement de 29 %.

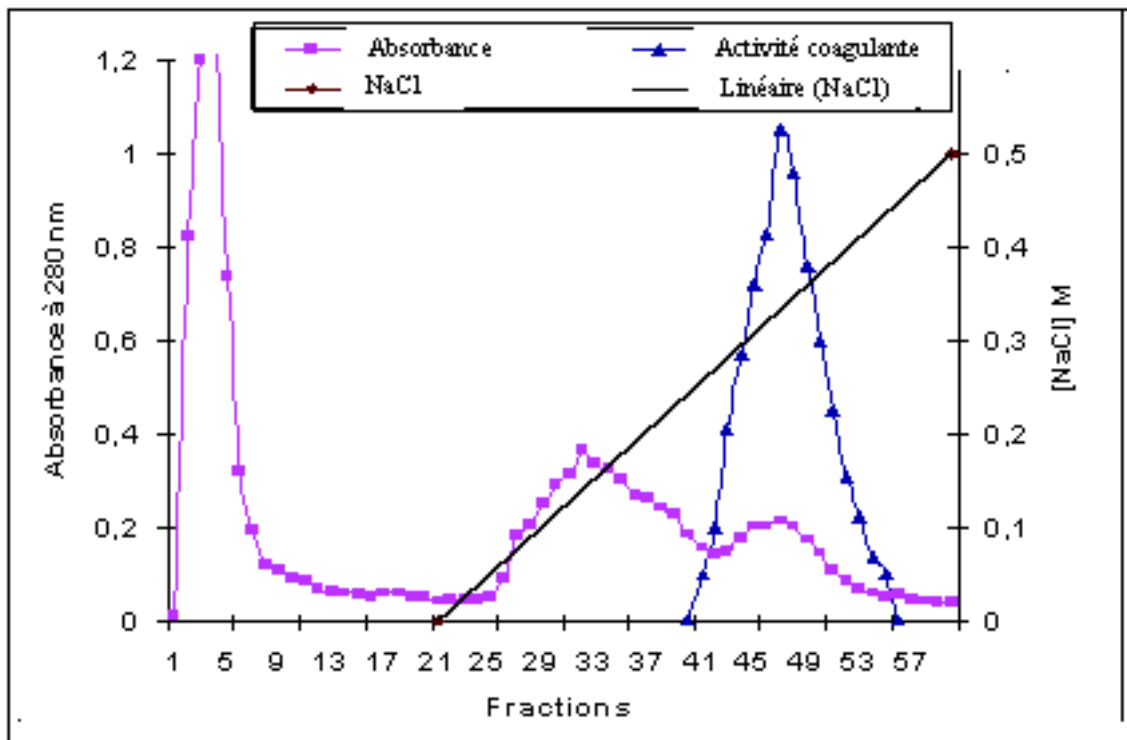


Figure 8 : Profil d'élution sur QEAE- Sephadex A- 50 de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*, après précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation. (Colonne (1 x 20 cm), tampon d'élution : phosphate (0,02 M ; pH 6), gradient NaCl : 0-0,5 M, débit : 45 ml /h, fraction : phase 1 : 3 ml, phase 2 : 2 ml).

Paramètres Etapas de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP /mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
E.E.B.	153	988	0,154	100	1
↓↓ (NH₄)₂ SO₄ à 80 % de saturation	79,68	161,28	0,494	52,07	3,19
Echangeuse d'anions	35,52	17,76	2	23,21	12,98
Filtration sur gel	15,36	4,32	3,55	10,03	23,08

Tableau IV : Bilan de purification de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus* (Protocole II).

La chromatographie d'exclusion moléculaire de la fraction active a montré deux pics d'élution dont le premier est actif (figure 9). Par ailleurs, un bon facteur de purification (soit de 23) a été obtenu avec une activité spécifique de 3,55. En revanche, le rendement en activité reste très faible (10 %) et seul 0,43 % des protéines totales ont été récupérées. En effet, la filtration sur gel de la fraction active, selon Fernandez-Lahore et al. (1999), a révélé un seul pic actif avec une activité de 76,2 % par rapport à l'initiale. Par ailleurs, la purification de la coagulase du *Mucor bacilliformis* par une ultrafiltration puis une échange d'ions a permis d'obtenir un rendement de 64 % et un facteur de purification de 15,5 (Fernandez-Lahore et al., 1998).

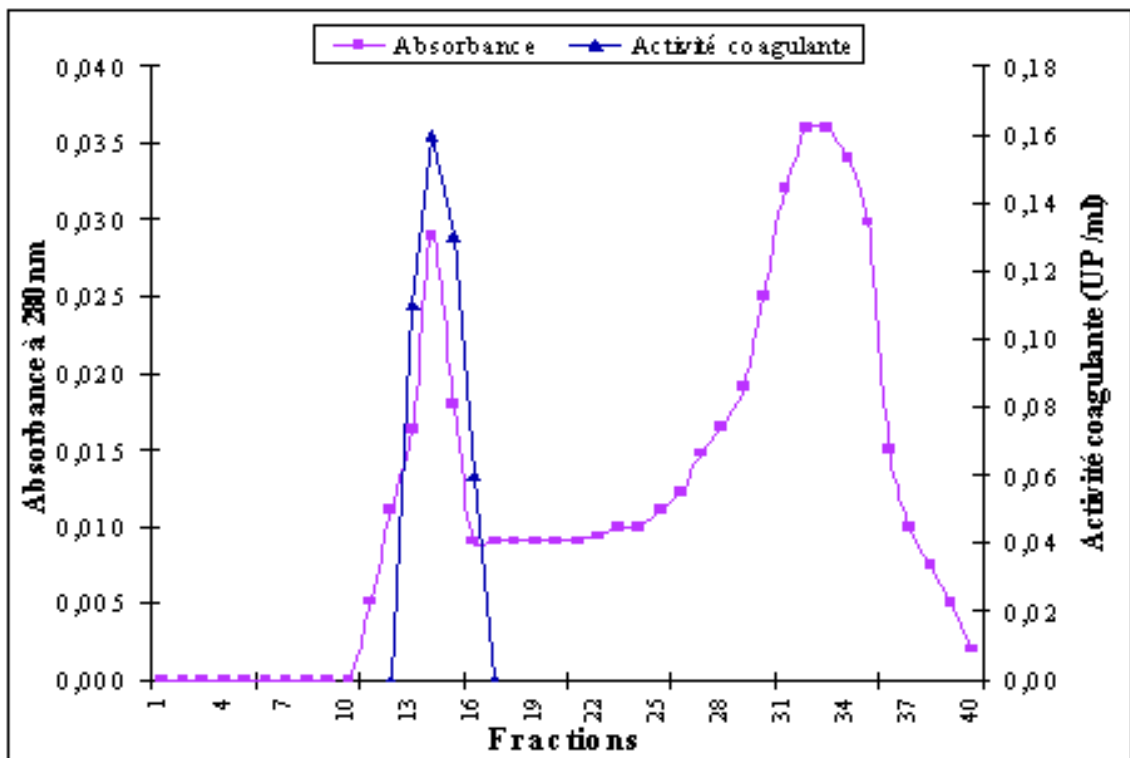


Figure 9 : Profil d'éluion sur Sephadex G-100 de la fraction active de *Mucor pusillus*, issue de l'échangeuse d'anions. (Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'éluion : phosphate (0,02 M ;pH 6), débit : 6 ml /h, fraction : 1ml).

Le profil électrophorétique, rapporté par la figure10, montre plusieurs bandes dans l'extrait enzymatique brut (A) et dans le précipité (B), une bande dans la fraction active issue de l'échange d'anions (C) et une dans la fraction obtenue par la filtration moléculaire.

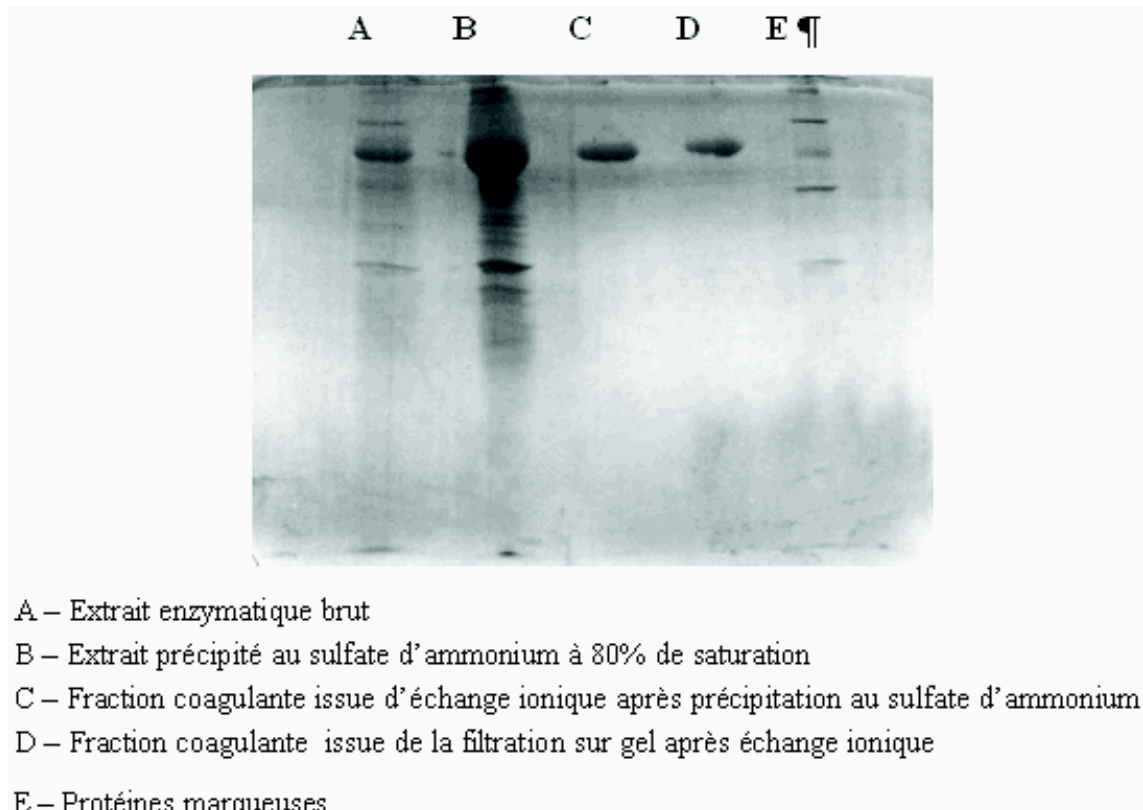


Figure 10 : Profil électrophorétique des extraits coagulants de *Mucor pusillus* (Protocole II).

En comparant les résultats obtenus par les deux protocoles, particulièrement les bilans de purification, il s'avère qu'il est plus intéressant de récupérer une quantité de 6 % des protéines du départ avec une activité de 44,54 % après gel filtration (protocole I) que d'obtenir 1,80 % des protéines totales avec un rendement de 23 % après une échangeuse d'anions (protocole II). Pour cela, le protocole « I » s'avère meilleur par rapport au second.

Par ailleurs, l'obtention de faibles rendements peut être liée à une dilution de l'enzyme au cours de la purification ou bien à une faible quantité en protéines dans l'extrait enzymatique brut.

Cependant, nous nous sommes posé une question : peut-on améliorer les rendements en activité tout en précipitant l'extrait enzymatique brut par fractionnement (pré purification) ? Pour cela, l'extrait enzymatique brut a fait l'objet d'une précipitation au sulfate d'ammonium à 40 % puis à 80 % de saturation. Le culot, récupéré après centrifugation à 10 000 g pendant 30 mn à + 4°C, est repris dans du tampon phosphate (0,02 M ; pH 6), dessalé sur Sephadex G-25 puis concentré avec du sucrose. Des résultats illustrés par le tableau V on note une importante chute d'activité de 28,53 % par rapport à l'initiale avec un facteur de purification voisin de 3.

Paramètres Etapes de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
E.E.B.	117	1012,5	0,115	100	1
↓↓ (NH₄)₂SO₄ (40 – 80 % de saturation)	39,96	140,04	0,341	28,53	2,96
Filtration sur gel	24	11.4	2,105	20,51	18,30

Tableau V : Bilan de purification de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus* (après précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium).

Cette observation ne concorde pas avec celle rapportée par d'autres auteurs qui ont adopté le principe du fractionnement par des sels. En effet, dans une étude similaire portant sur la coagulase de *Bacillus subtilis*, Matoub (2000), a noté un rendement en activité de 93,75 %. Par ailleurs, Cavalcanti et al. (2004), en fractionnant l'extrait brut d'une coagulase fongique issue de *Nocardopsis sp.* ont observé un rendement de 55 % et un facteur de purification de 7. La précipitation de l'extrait de *Rhizopus oryzae* a conduit à un rendement de 103 % ce qui est due, selon Kumar et al. (2005), à l'élimination des substances inhibitrices présentes dans la préparation enzymatique brute.

Par contre, d'autres auteurs ont enregistré de faibles rendements suite à une série de travaux de recherche portant sur la purification des coagulases végétales et animales. En effet, après une précipitation au sulfate d'ammonium à 50 % de saturation et une chromatographie d'exclusion moléculaire des rendements de l'ordre de 25 %, de 12,5 % et de 23 % ont été notés respectivement pour la coagulase des graines de melon, la pepsine ovine et la pepsine du poisson (Fernani, 2002 ; Slamani, 2002 et Machou, 2004).

Le profil chromatographique sur Sephadex G-100 du précipité fractionné au sulfate d'ammonium, rapporté par la figure 11, indique la présence de deux pics d'élution ; le premier est doué d'une activité coagulante, le second non actif présente une densité optique d'environ 0,15 et ce contrairement à celui obtenu dans la figure 4 (densité optique de 0,35). Ceci peut être interprété par le fait que l'échantillon a subi une pré purification.

Cette étape a permis de multiplier par un facteur de 18,30 l'activité spécifique de la coagulase (tableau V). Cependant, le rendement en activité reste encore faible soit de l'ordre de 20,51 %.

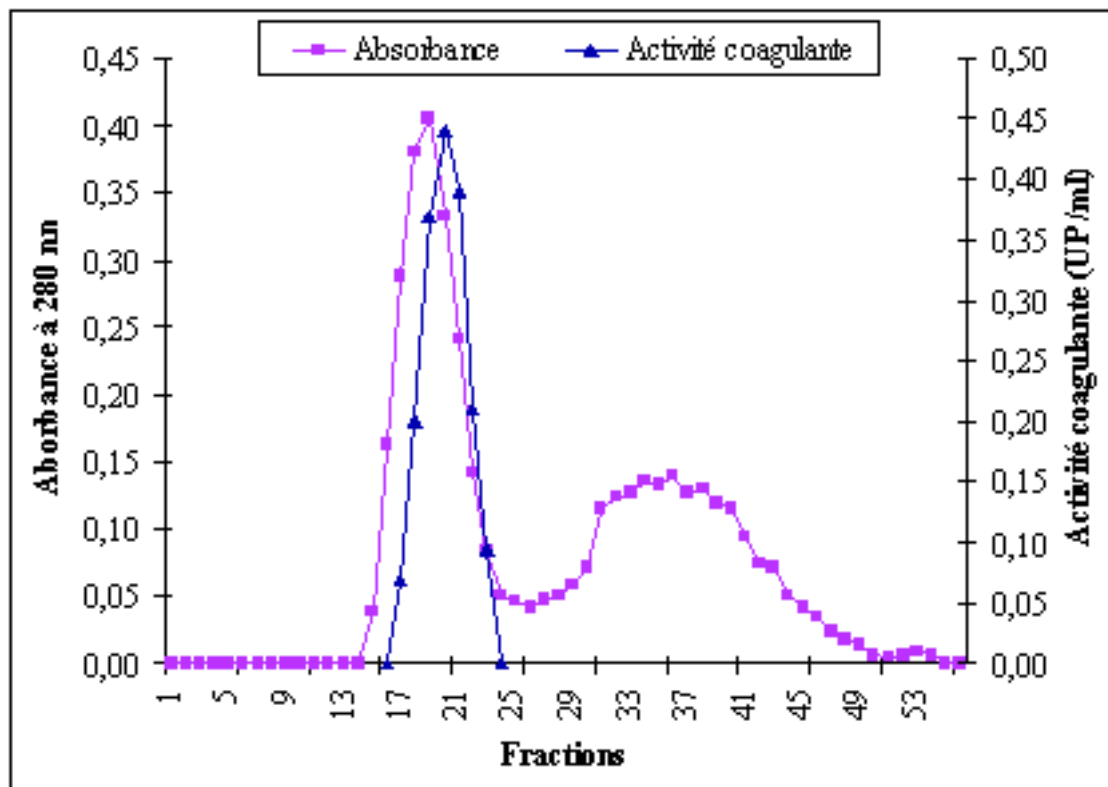


Figure 11 : Profil d'élution sur Sephadex G-100 de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*, précipité par fractionnement au sulfate d'ammonium (40-80% de saturation). (Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'élution : phosphate (0,02 M; pH 6), débit : 6 ml /h, fraction de 1 ml).

Les travaux de Khan *et al.* (1979), ont conclu que la précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (50 – 80 % de solution) suivie d'une échangeuse d'anions à pH 6 a permis de séparer la protéase coagulante de la protéase non spécifique avec un rendement de 64 % et un facteur de purification de 29. Cette séparation n'a pas été réalisée par ces mêmes auteurs en précipitant l'extrait brut à 80 % (soit un rendement de 33 %) suivie d'une échangeuse ionique à pH 8 (soit un rendement de 29 %).

La figure 12 rapporte que la fraction active issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire (après fractionnement au sulfate d'ammonium) est homogène. Ce résultat est noté par plusieurs auteurs (khan *et al.*, 1979 ; Cavalcanti *et al.*, 2004 ; Kumar *et al.*, 2005). Par ailleurs, le profil électrophorétique de l'extrait enzymatique brut, du précipité par fractionnement (40 – 80 %) et du précipité à 80 % de saturation ne montre aucune différence entre ces trois échantillons (figure 12). Ceci suggère que le fractionnement au sulfate d'ammonium n'est pas préconisé dans notre cas.



Figure 12 : Profil électrophorétique des extraits coagulants de *Mucor pusillus* (deux étapes de purification).

- A – Extrait enzymatique brut
- B – Extrait précipité au sulfate d’ammonium (40 – 80 % de saturation)
- C – Fraction issue de la gel filtration après précipitation fractionnée
- D – Marqueurs de protéines

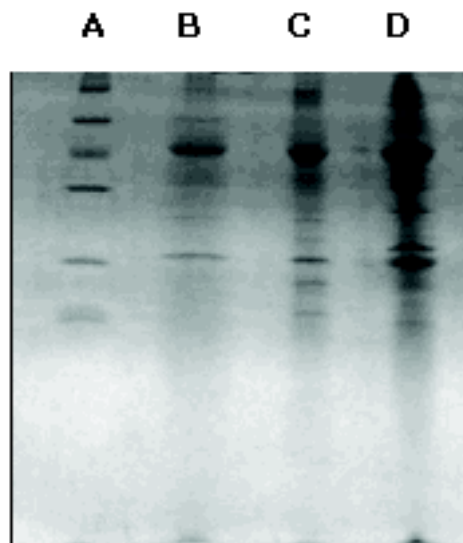


Figure 13 : Profil electrophorétique des extraits coagulants de *Mucor pusillus* (extrait brut ‘B’, précipité 40-80% de saturation ‘C’et précipité à 80% de saturation ‘D’).

Bien que ce protocole a permis d’avoir un facteur de purification considérable, cependant, le rendement en activité reste très faible. Ceci est peut être lié, comme on l’a supposé précédemment, soit à une perte en enzyme, à sa dilution ou alors à la faible concentration en enzyme de l’extrait brut. Pour cela, nous avons pensé à lyophiliser le surnageant de la culture de *Mucor pusillus*. L’extrait coagulant brut lyophilisé a fait objet d’un côté d’une filtration sur gel et d’un autre côté d’une échangeuse d’anions.

Le profil chromatographique sur Sephadex G-100 de l’extrait enzymatique brut lyophilisé (125 mg) indique deux pics d’élution dont le premier est actif (figure 14). La fraction

active représente 2,64 % des protéines appliquées. Cette étape a permis d'éliminer environ 97 % des protéines non actives et d'améliorer le rendement en activité (55,13 %) tout en multipliant par un facteur de 20,88 l'activité spécifique de la coagulase (tableau VI).

L'étude menée par Slamani (2002), portant sur la purification de la pepsine ovine a révélé une fraction active avec un rendement de 59,40 % avec un facteur de purification de 12,77.

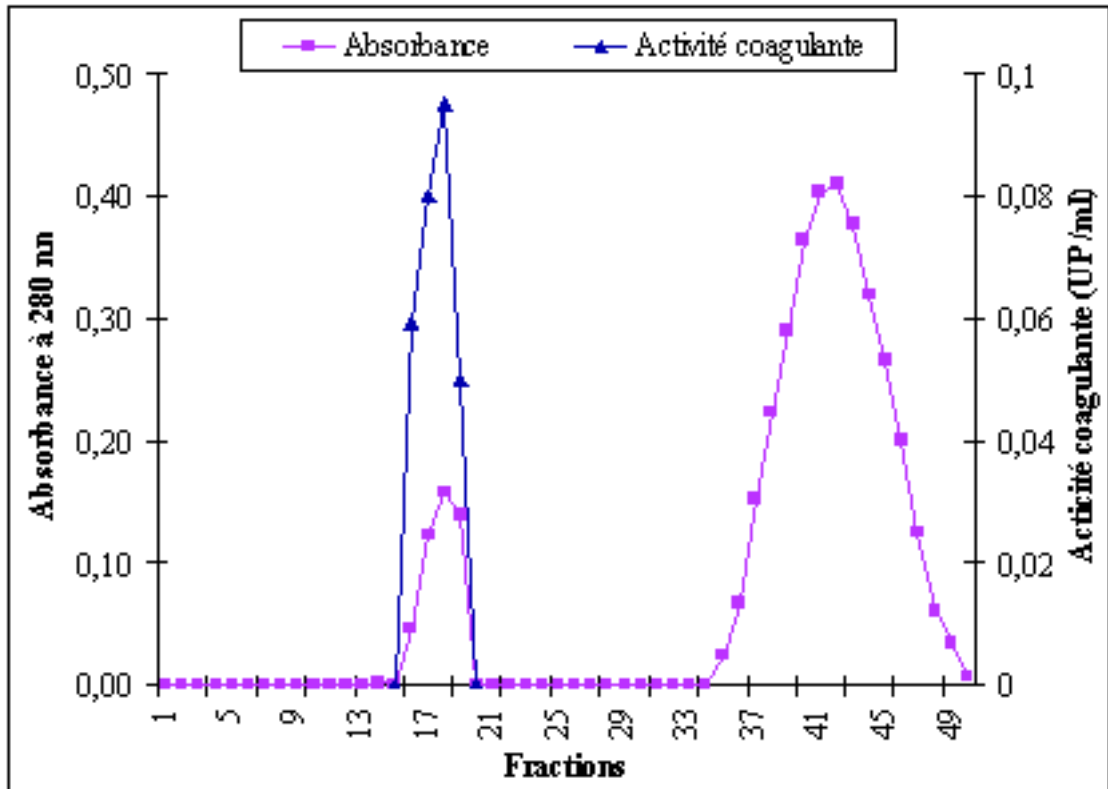


Figure 14 : Profil d'éluion sur Sephadex G-100 de l'extrait coagulant brut lyophilisé de *Mucor pusillus* Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'éluion : phosphate (0,02 M ; pH 6), débit : 6 ml /h, fraction : 1 ml).

Paramètres	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP / mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Etapas de purification					
E.E.B. lyophilisé	27,75	125	0,222	100	1
Filtration sur gel	15,30	3,30	4,636	55,13	20,88

Tableau VI : Bilan de purification de l'extrait brut lyophilisé de *Mucor pusillus* (filtration sur gel).

Le profil électrophorétique montre que la fraction active issue de la filtration sur gel est homogène (figure15).

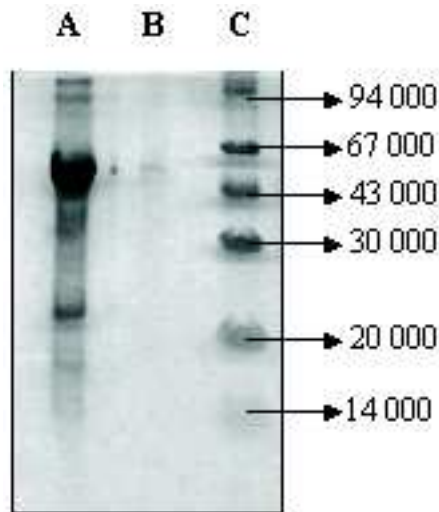


Figure 15 : Profil électrophorétique des extraits de *Mucor pusillus* (extrait brut lyophilisé 'A' et la fraction active issue de la filtration sur gel 'B').

L'extrait enzymatique brut lyophilisé (125 mg) appliqué sur une échangeuse d'anions a donné un profil chromatographique sur QEAE- Sephadex A-50 relevant trois pics distincts (figure 16). L'activité coagulante est concentrée en un seul pic. Par ailleurs, l'enzyme est éluée à une concentration en NaCl de 0,26 M.

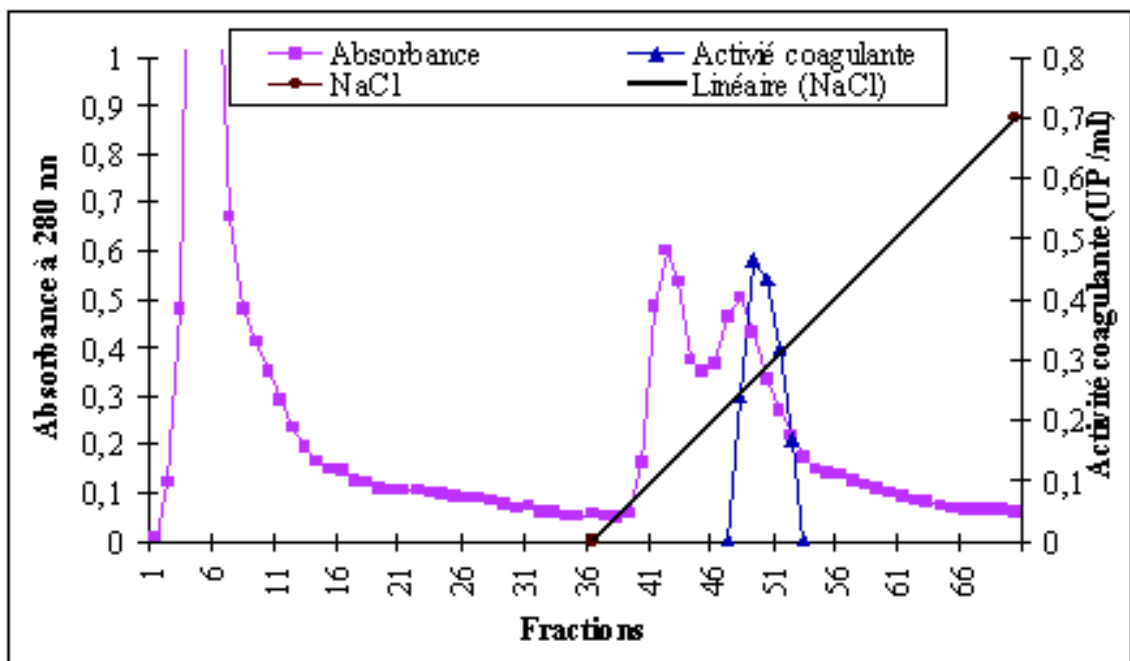


Figure 16 : Profil d'éluion sur QEAE- Sephadex A-50 de l'extrait brut lyophilisé de *Mucor pusillus* (Colonne (1 x 20 cm), tampon d'éluion : phosphate (0,02 M ; pH 6), gradient NaCl : 0 – 0,7 M, débit : 45 ml /h, fraction : 3 ml).

Le tableau VII rapporte un rendement en activité de 59,45 % avec un facteur de purification de 6,75.

Paramètres Etapes de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
E.E.B. lyophilisé	27,75	125	0,222	100	1
Echange d'anions	16,5	11	1,5	59,45	6,75
Filtration sur gel	2,1	0,525	4	7,56	18,01

Tableau VII : Bilan de purification de l'extrait brut lyophilisé de *Mucor pusillus* (échangeuse d'anions + filtration sur gel).

La fraction coagulante est éluée sur Sephadex G-100. Les résultats, rapportés par la figure 17, indiquent deux pics d'éluion dont le premier est actif. Cette fraction enzymatique principale présente une activité de 7,56 % par rapport à l'initiale et seul 0,42 % des protéines du départ sont récupérées.

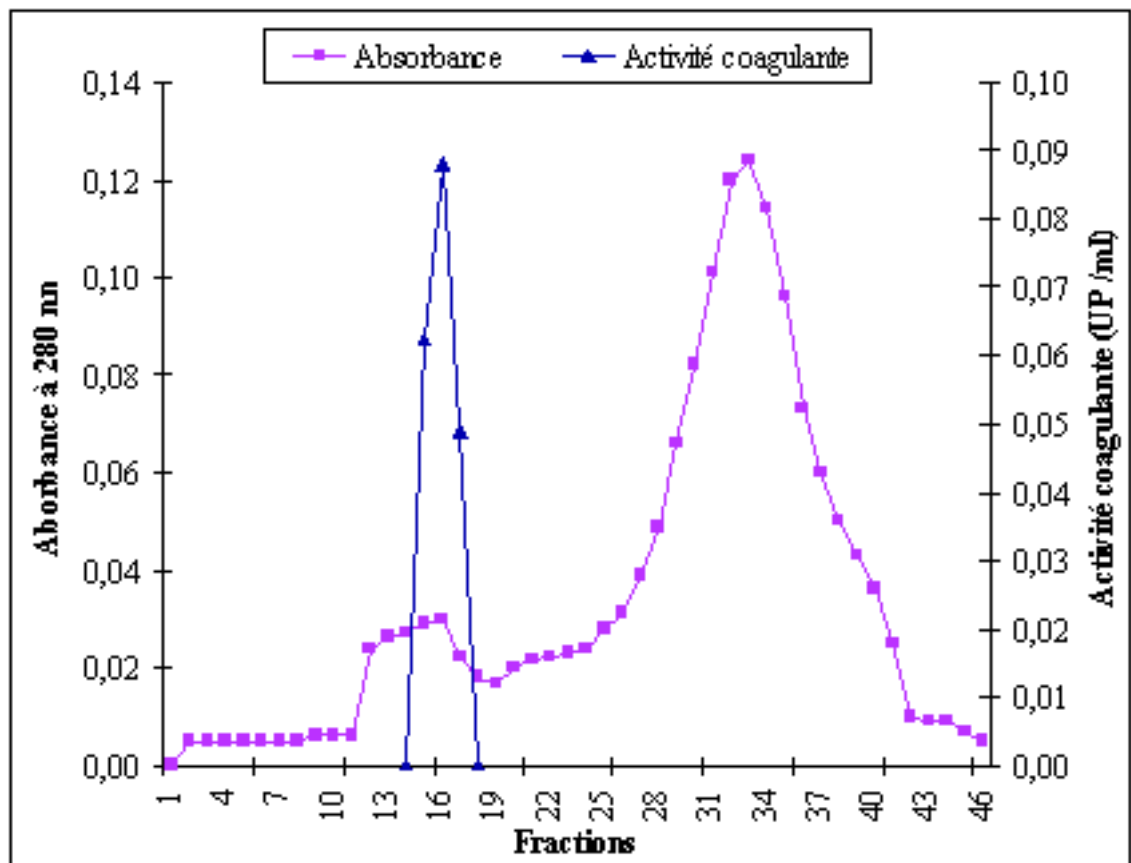


Figure 17 : Profil d'éluion sur Sephadex G-100 de la fraction active issue de la chromatographie échangeuse d'anions de l'extrait brut

lyophilisé de *Mucor pusillus*. (Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'éluion : phosphate (0,02 M ; pH 6), débit : 6 ml /h, fraction : 1 ml).

Les résultats de l'analyse électrophorétique, illustrés par la figure 18, montrent que la fraction active issue de l'échangeuse d'anions est composée de deux bandes, ce qui explique son hétérogénéité. En revanche, la filtration moléculaire a permis d'éliminer la seconde bande dont le poids moléculaire est voisin de 20 000 Da, et donne, de ce fait, une seule bande homogène.

A partir de ces résultats, il ressort que l'échange ionique, comme seule technique de purification, ne permet pas de purifier totalement l'extrait enzymatique brut.

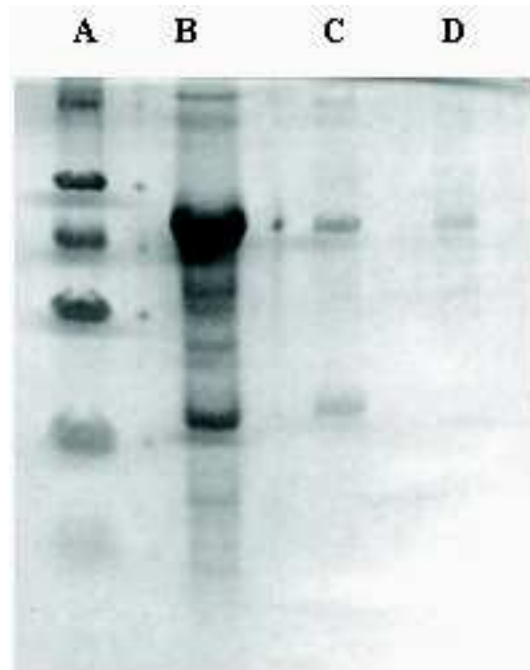


Figure 18 : Profil électrophorétique des extraits coagulant de *Mucor pusillus* (extrait brut lyophilisé 'B', la fraction active issue de l'échangeuse d'anions 'C' et la fraction active issue de la filtration sur gel 'D').

L'étude menée par Preetha et Boopathy (1997), sur la coagulase du *Rhizomucor miehei* a permis d'obtenir un rendement en activité de 68 % après l'échangeuse d'anions avec quatre bandes électrophorétiques, la chromatographie d'affinité a révélé une seule bande homogène avec un rendement de 22 % et un facteur de purification de 6,7. Selon ces mêmes auteurs, les pigments colorés associés aux protéines enzymatiques sont éliminés au cours de la purification. Une perte considérable en rendement a été constatée par Belyauskaite et al. (1980), en purifiant les protéases obtenues de la culture du *Mucor renninus*. En effet, trois fractions ont été obtenues dont deux sont douées d'une activité protéolytique et une seule contenant une activité coagulante. Cette dernière a donné une bande homogène avec une activité de 13,9 % par rapport à l'initiale.

Par ailleurs, selon Bengana (2001), l'extrait enzymatique brut, provenant des caillottes de bovins adultes, a été séparé sur DEAE- cellulose A-50 en deux fractions : la chymosine, qui représente 12 % de l'activité totale, est éluée à 0,3 M en NaCl et la pepsine, qui représente 88 % de l'activité totale, est éluée à 0,5 M de NaCl.

3- Détermination du poids moléculaire

La détermination du poids moléculaire a été réalisée par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100 et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, en présence de sodium dodecyl sulfate (S.D.S.).

L'évaluation approximative de la masse moléculaire a été réalisée par l'élution des protéines à poids moléculaire connu (BSA : 67 000 Da, pepsine : 35 000 Da et trypsine : 23 800 Da), sur Sephadex G-100 dans les mêmes conditions que notre coagulase purifiée (figure 3, annexe 4). Le volume d'élution de l'enzyme correspond à 12 ml (figure 5, annexe 4).

Grâce à une courbe étalon (figure 4, annexe 4) du logarithme du poids moléculaire des protéines marqueuses en fonction du volume d'élution, nous avons pu estimer le poids moléculaire de la protéase étudiée à 48 000 Da.

La migration électrophorétique de la coagulase étudiée est réalisée parallèlement à celle des marqueurs à poids moléculaire connu (Phosphorilase : 94 000 Da, sérum albumin bovin : 67 000 Da, ovalbumine : 43 000 Da, anhydrase carbonique : 30 000 Da, trypsine inhibiteur : 20 000 Da et lactalbumine : 14 000 Da).

Le profil électrophorétique représenté par la figure 15 montre que la fraction active étudiée fait apparaître une seule bande homogène.

D'après la courbe étalonnage obtenue avec les marqueurs à poids connu et séparés dans les mêmes conditions illustrée par la figure 6 (annexe 5), la masse moléculaire de la fraction coagulante est de l'ordre 49 000 Da.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux rapportés par la littérature. Selon Areces et al. (1992) cité par Fernandez-Lahore et al. (1999), les protéases fongiques sont caractérisées par un poids moléculaire variant de 32 000 à 34 000 Da. Ce résultat est confirmé par certains auteurs (Belyauskaite et al., 1979 ; Lenoir et al., 1979 ; Fernandez-Lahore et al., 1999 et Kumar et al., 2005), en étudiant respectivement les coagulases purifiées de *Mucor renninus*, *Penicillium caseicolum*, *Mucor sp.* et *Rhizopus oryzae*.

En revanche, d'autres travaux ont signalé des masses moléculaires un peu plus élevées. En effet, Preetha et Boopathy (1997), ont indiqué un poids de 40 000 Da pour la coagulase de *Rhizomucor miehei*. La même masse a été estimée pour l'enzyme de *Bacillus* (Safarik, 1984 ; Chemlal, 1998) et de *Mixococcus xanthus* (Poza et al., 2003).

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 37 000 Da (Fox et Whitaker, 1977 ; Slamani, 2002 et Machou, 2004). 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. Par ailleurs, des poids moléculaires de l'ordre de 67 000 Da et de 62 000 Da ont été rapportés pour la coagulase des graines de melon (Fernani, 2002) et de l'artichaut (Llorente et al., 2004).

III – Caractérisation de l'extrait fongique purifié et de la présure

1 – Influence de la température

La détermination de la température optimale d'activité des préparations coagulantes a été réalisée en mesurant le temps de coagulation à différentes températures du lait allant de 25°C à 65°C.

La figure 19, rapporte un comportement différent des enzymes étudiées. L'optimum d'action pour la coagulase purifiée du *Mucor pusillus* et de la présure animale est, respectivement, obtenu aux températures du lait égales à 50°C et 42°C. Au delà de ces températures, on note une baisse d'activité pour les deux coagulases. Par ailleurs, l'extrait coagulant fongique, comparé à la présure animale, se montre encore actif à 60°C. A cette température, la présure est complètement détruite.

L'influence de la température sur le temps de prise résulte de trois effets : la thermosensibilité de l'enzyme coagulante (la présure commence à se dénaturer à 35°C et est totalement dénaturée à 65°C), la vitesse de la réaction enzymatique (phase primaire : $Q_{10} = 2$) et surtout la vitesse d'agrégation (phase secondaire : $Q_{10} = 12$) (Mietton et al, 1994).

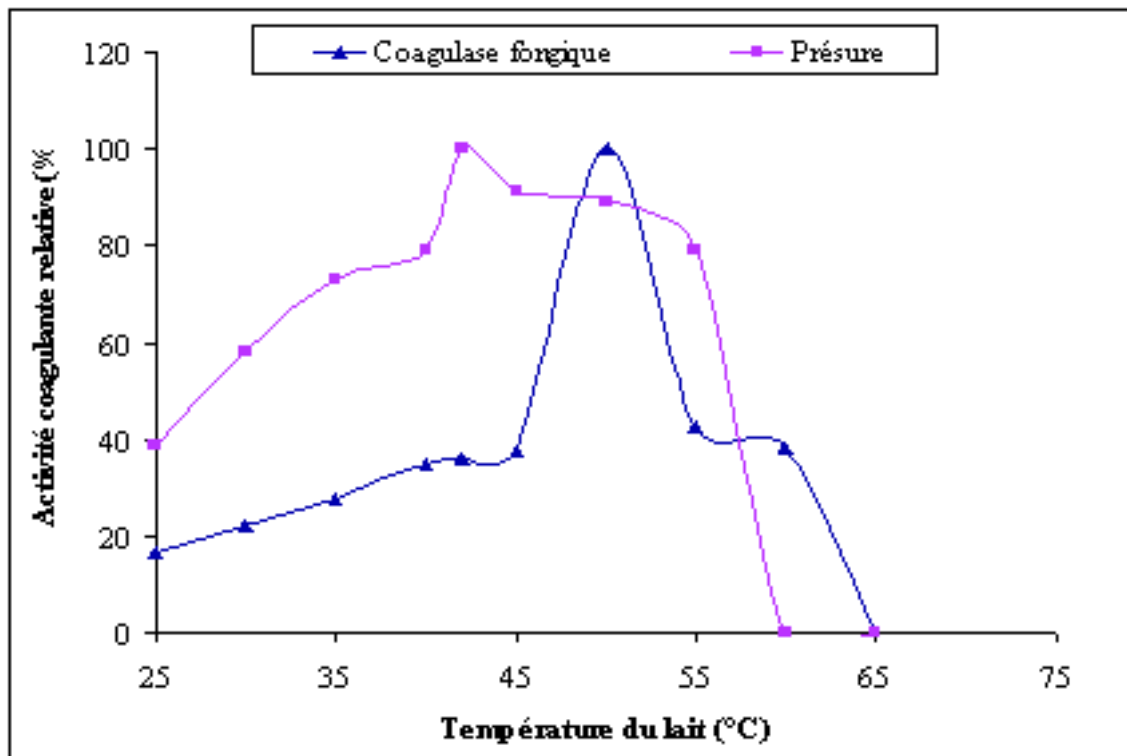


Figure 19 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante.

Selon Garnot et Martin (1980), la présure présente une activité coagulante optimale à une température voisine de 40°C. Les études portant sur la coagulase de *Mucor pusillus* ont rapporté un optimum thermique de 55°C (Somkuti et Babel, 1968 ; Iwasaki et al., 1979 ; Maheshwari et al., 2004). Ce même résultat a été obtenu par Cavalcanti et al. (2004) pour la protéase coagulante de *Nocardioopsis sp.* Par ailleurs, l'enzyme sécrétée par *Rhizopus oryzae*, présente, selon Kumar et al. (2005), un optimum thermique de 60°C, température optimale d'action des enzymes de *Bacillus* (Madsen et Qvist, 1997 ; Matoub, 2000). Plus récemment, Goursaud (1999), a indiqué une température optimale d'action de 52°C à 62°C pour les préparations fongiques coagulantes de *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* et *Endothia*

parasitica. Belhamiche (2001), en caractérisant l'extrait enzymatique brut de la souche en question, a noté que l'activité augmente progressivement entre 30°C et 60°C et rapidement entre 60°C et 70°C.

Par ailleurs, la pepsine de poulet, étudiée par Morsli (1996), présente une température optimale de 40°C. Dans une étude similaire, Bengana (2001) a rapporté une activité optimale à 45°C pour la chymosine et la pepsine. Toutefois, plusieurs travaux réalisés sur les coagulases végétales ont rapporté des optimums thermiques très élevés (Mouzali, 2001 ; Bruno et al., 2002 ; Fernani, 2002 ; Lo Piero et al., 2002).

La température est en général plus élevée pour les enzymes de microorganismes et de végétaux par comparaison aux protéases animales. De telles enzymes sont, selon Alais (1984), favorisées. En effet, l'avantage de ces enzymes réside en leur capacité d'activer le processus technologique de fabrication de fromages, dans le cas où la coagulation nécessiterait des températures élevées, juste après la pasteurisation où l'on fixe des valeurs de températures supérieures à 50°C.

2 – Influence de pH du lait

L'effet du pH du lait sur l'activité coagulante est illustré par la figure 20. Les deux préparations enzymatiques étudiées présentent un comportement analogue vis à vis du pH du lait. Une activité relativement importante est constatée à pH 5 ; au delà de cette valeur, l'activité diminue. A pH 7, l'activité de la coagulase fongique étudiée et de la présure animale, ne représente que 2,65 % et 2,4 % respectivement. Ces deux préparations sont complètement inactivées à pH 7,2.

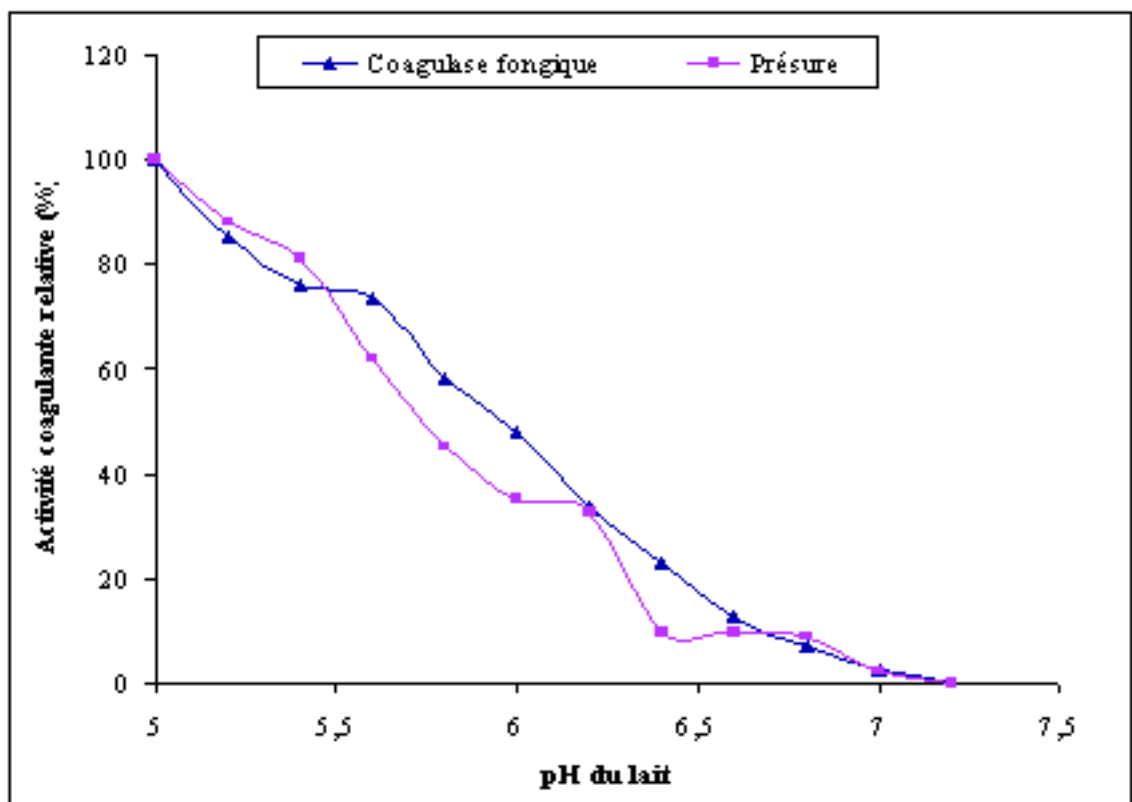


Figure 20 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante.

L'abaissement du pH de 7 à 5,2 provoque la diminution du temps de coagulation (Ramet, 1990 ; Najera et al., 2003). En effet, l'acidification du lait favorise la réaction d'agrégation par suite à la diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges négatives et à la libération d'ions calcium.

Selon Iwasaki et al. (1979), le pH optimum de la coagulase du *Mucor pusillus* est de 3,5 en utilisant de la caséine comme substrat. La même constatation a été rapportée par Belyauskaite et al. (1980) pour la protéase du *Mucor renninus* testée sur de l'hémoglobine.

Cependant, les travaux de Somkuti et Babel (1968) puis ceux de Khan et al. (1979) ont rapporté un pH optimum de 3,8. Les enzymes fongiques, selon Fernandez-Lahore et al. (1999), se caractérisent par un pH optimum d'action entre 2,5 et 5,5. En revanche, l'optimum d'hydrolyse de la caséine par la chymosine est compris, selon Mietton et al. (1994), entre pH 5,4 et pH 5,7 tandis qu'il se situe entre 2 et 3 pour la pepsine. Par ailleurs, la pepsine de poisson (*Munida*) a une activité optimale entre pH 6,5 et 7,5 (D'Ambrosio et al., 2003). Garnot et Martin (1980) ont rapporté un pH optimum de 5,8 pour la présure animale.

Par ailleurs, l'activité optimale de la coagulase extraite à partir de l'artichaut se situe entre pH 4,5 et 5,5 (Llorente et al., 2004), par contre, celle de la broméline est de 8,5 (Bruno et al., 2002).

En définitif, l'effet du pH du lait sur l'activité coagulante des enzymes est fortement dépendant de leur origine et de la nature du substrat

3 – Influence de la concentration en CaCl_2

L'influence du calcium sur l'activité coagulante de la protéase du *Mucor pusillus* comparée à la présure animale, a été étudiée en faisant varier sa concentration dans le lait de 0,00 M à 0,05 M.

Les résultats indiqués par la figure 21 montrent que l'activité coagulante augmente avec la concentration en CaCl_2 du lait. L'optimum d'activité pour les deux préparations coagulantes est obtenu pour une concentration de 0,02 M. Au delà, l'activité baisse par un effet inhibiteur de l'ion calcium. Cet effet est plus marqué avec l'extrait coagulant purifié de *Mucor pusillus*.

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, 1990). En effet, Cette addition provoque, selon Najera et al. (2003), une diminution du temps de coagulation. Cependant, pour une concentration élevée en CaCl_2 , le temps de coagulation tend à augmenter.

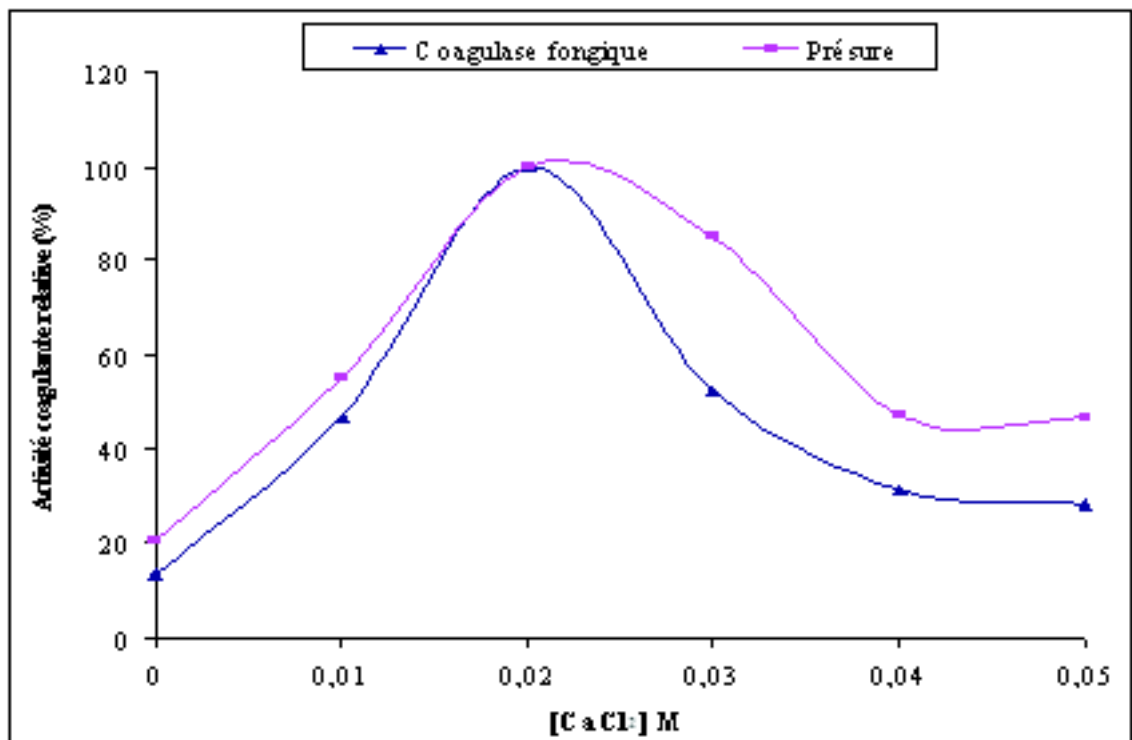


Figure 21 : Effet de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante.

L'activité optimale de l'extrait enzymatique brut de la souche fongique étudiée, selon Belhamiche (2001), a été constatée pour une concentration en CaCl_2 de 0,04 M.

D'après les résultats obtenus par Preetha et Boopathy (1997), aucune différence de sensibilité de la protéase de *Rhizomucor miehei* par rapport à la présure n'a été constatée.

Par ailleurs, dans une étude similaire de la coagulase de *Bacillus subtilis*, Chemlal (1998), a obtenu une concentration optimale de 0,05 M. Par contre, Matoub (2000), a rapportée une activité optimale de la coagulase purifiée à une concentration de 0,02 M.

Lors d'une étude de quelques plantes locales et d'une coagulase de poulet, Morsli et al. (1985) et Morli (1996), ont indiqué une concentration du lait en CaCl_2 de l'ordre de 0,02 M pour l'ensemble des préparations coagulantes. Ce résultat a été confirmé par Garnot et Martin (1980) pour la présure animale. En revanche, la pepsine ovine présente une activité coagulante optimale à une concentration en CaCl_2 de 0,06 M (Slamani, 2002).

Par comparaison à la présure animale, les enzymes de *Mucor* sont très sensibles aux variations de la teneur en calcium (Iwasaki et al, 1979 ; Anstrup, 1980).

4 – Influence de la concentration en extrait enzymatique

L'activité des extraits coagulants, en fonction de la concentration en extrait, a été estimée en mesurant le temps de coagulation pour des concentrations variables de 0,06 mg /ml à 0,3 mg /ml.

Les résultats rapportés par la figure 22 montrent que l'activité coagulante des deux extraits augmente quand la concentration en enzyme augmente. Cependant, dans l'intervalle des concentrations allant de 0,25 à 0,3 mg /ml, on note un palier de saturation

en enzyme et ce pour la coagulase fongique contrairement à la présure animale. Toutefois, Garnot et Martin (1980) et plus récemment Goursaud (1999), ont montré que l'activité coagulante de la présure croît linéairement en fonction de la concentration en enzyme, lorsque celle-ci est faible ce qui correspond aux doses employées en fromagerie.

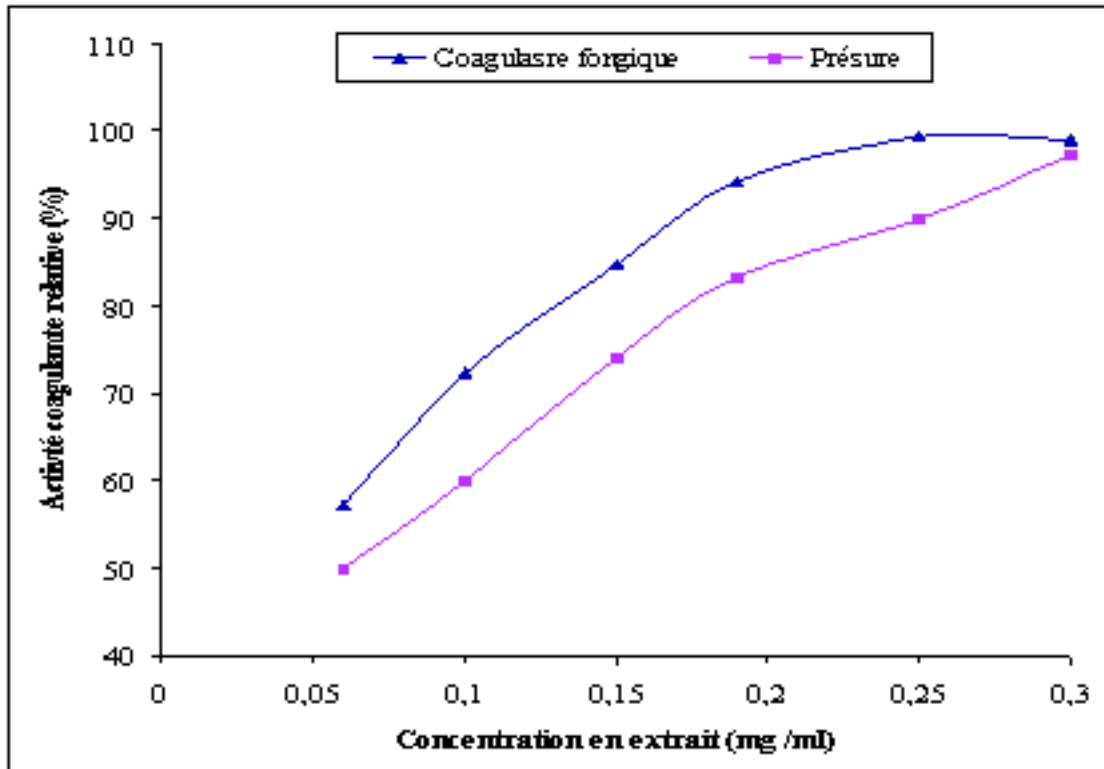


Figure 22 : Influence de la concentration en extrait coagulant sur l'activité coagulante.

5 – Etude de la stabilité de l'extrait

5.1 – Stabilité thermique

La stabilité thermique de l'extrait fongique purifié, comparé à la présure, a été étudiée en le maintenant pendant 30 mn à des températures allant de 30°C à 65°C.

Les résultats illustrés par la figure 23 indiquent que l'activité de la coagulase de *Mucor pusillus* est relativement stable dans l'intervalle de température compris entre 30°C et 50°C. Par contre, la présure animale exprime déjà à 45°C une baisse d'activité.

Pour des températures supérieures à 50°C, la protéase fongique présente une baisse d'abord progressive de son activité coagulante (à 55°C) puis rapide (à 60°C) ; températures pour lesquelles la présure animale est complètement détruite pour effet de dénaturation de la structure de l'enzyme.

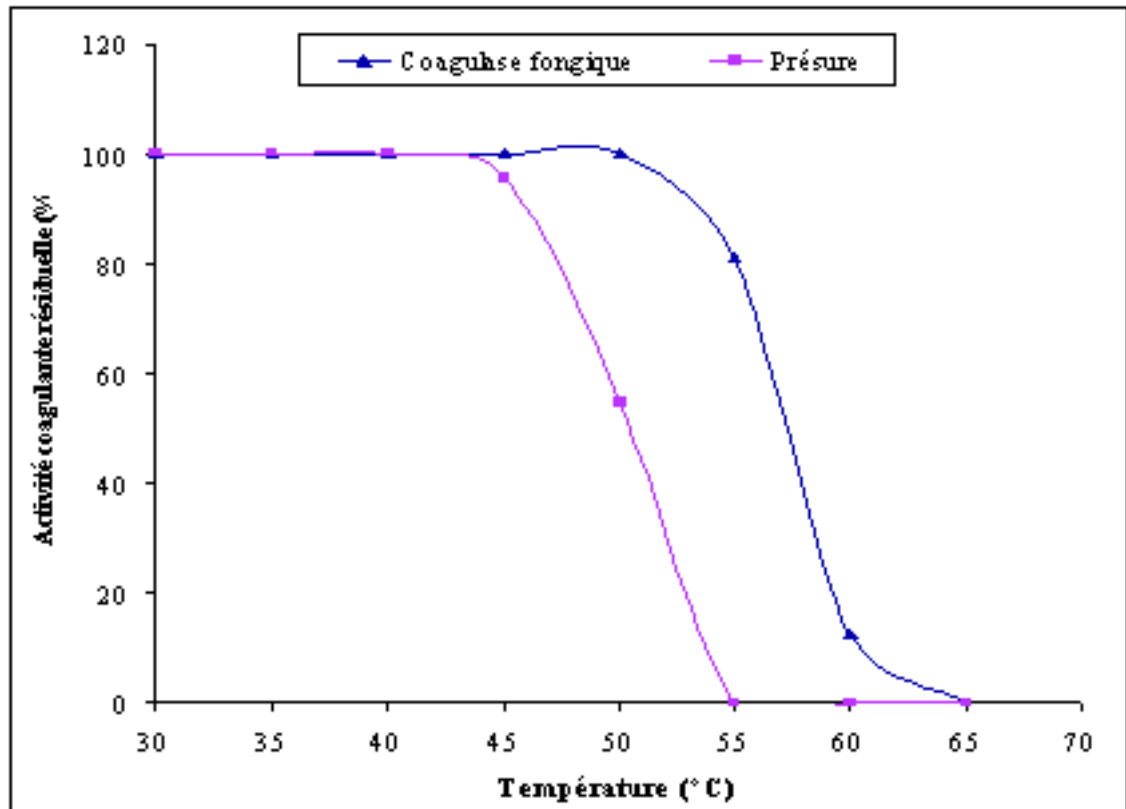


Figure 23 : Stabilité thermique de l'extrait purifié du *Mucor pusillus* et de la présure.

Les résultats obtenus par Belhamiche (2001), ont rapporté une stabilité thermique de l'extrait enzymatique brut de *Mucor pusillus* aux températures inférieures de 45°C.

Selon Alais (1984), quand la température s'élève au dessus de 50°C, la dénaturation de la présure devient sensible ; les enzymes fongiques sont plus résistantes au chauffage ce qui explique que la température optimale de la coagulation soit plus élevée. Effectivement, les travaux de Somkuti et Babel (1968) et ceux de Preetha et Boopathy (1997), ont indiqué une température d'inactivation de 65°C pour la coagulase du genre *Mucor*. En revanche, l'inactivation thermique de la protéase de *Rhizopus oryzae*, rapportée par Kumar et al. (2004), a lieu à 72°C.

Matoub (2000), a indiquée une stabilité thermique d'une coagulase produite par une souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée LC33 comprise entre 30°C et 50°C, et cela pour une durée d'exposition de 30 mn. Par ailleurs, Morsli (1996), a noté une grande stabilité thermique des coagulases végétales (artichaut, figuier), par comparaison à celle d'origine animale. La pepsine ovine est relativement stable pour des températures inférieures à 50°C (Slamani, 2002). Selon Machou (2004), la stabilité de la pepsine de poisson se situe dans l'intervalle des températures compris entre 30°C et 40°C.

En général, les coagulases microbiennes et végétales se montrent plus stables aux températures plus élevées que la présure animale.

5.2 – Stabilité à la conservation à + 4° C et à – 18°C

L'étude de la stabilité au cours de la conservation a été réalisée par l'entreposage de l'extrait purifié de *Mucor pusillus* à + 4°C et à -18°C. L'activité coagulante résiduelle, exprimée en pourcentage par rapport à l'activité coagulante initiale, a été évaluée périodiquement.

Les résultats, illustrés par la figure 24, indiquent une baisse d'activité à partir de 21 jours de conservation à + 4°C. Au bout de 28 jours, l'activité résiduelle de l'extrait coagulant purifié est de 82,1 %. Au-delà, l'activité coagulante continue à baisser progressivement. Cependant, l'extrait purifié de *Mucor pusillus* ne montre aucune baisse d'activité, à -18°C, au bout de 56 jours ; à 70 jours, l'enzyme perd 23,38 % de son activité initiale.

Selon les résultats obtenus par Belhamiche (2001), une baisse d'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la souche étudiée est enregistrée au bout de 21 jour de conservation à + 4°C avec une activité résiduelle de 37 % le 28^{ème} jour de stockage. Par ailleurs, Chemlal (1998), a rapporté que l'extrait brut de *Bacillus coagulans* est stable pendant les cinq jours de conservation. En revanche, Matoub (2000), a indiquée une activité résiduelle de 73 % à + 4° C au bout de 30 jours de conservation. Au-delà, l'activité reste stable.

Dans une étude similaire portant sur la pepsine de poisson, Machou (2004), a noté une baisse d'activité de 50 % à -18° C au bout de 45 jours de conservation. Par contre, les études antérieures de conservation menées par Morsli (1996), Mouzali (2001) et Fernani (2002) sur les protéases coagulantes de l'artichaut, du figuier, du poulet, du cardon et des graines de melon, ont montré que l'activité de ces coagulases reste stable au cours de la durée de stockage de plus de trois mois à -18° C.

En général, les enzymes conservées à + 4°C gardent une activité résiduelle qui dépend de l'origine et de la pureté des extraits. De plus, elles se conservent mieux aux basses températures (congélation). Néanmoins, ce procédé est plus coûteux pour une enzyme industrielle.

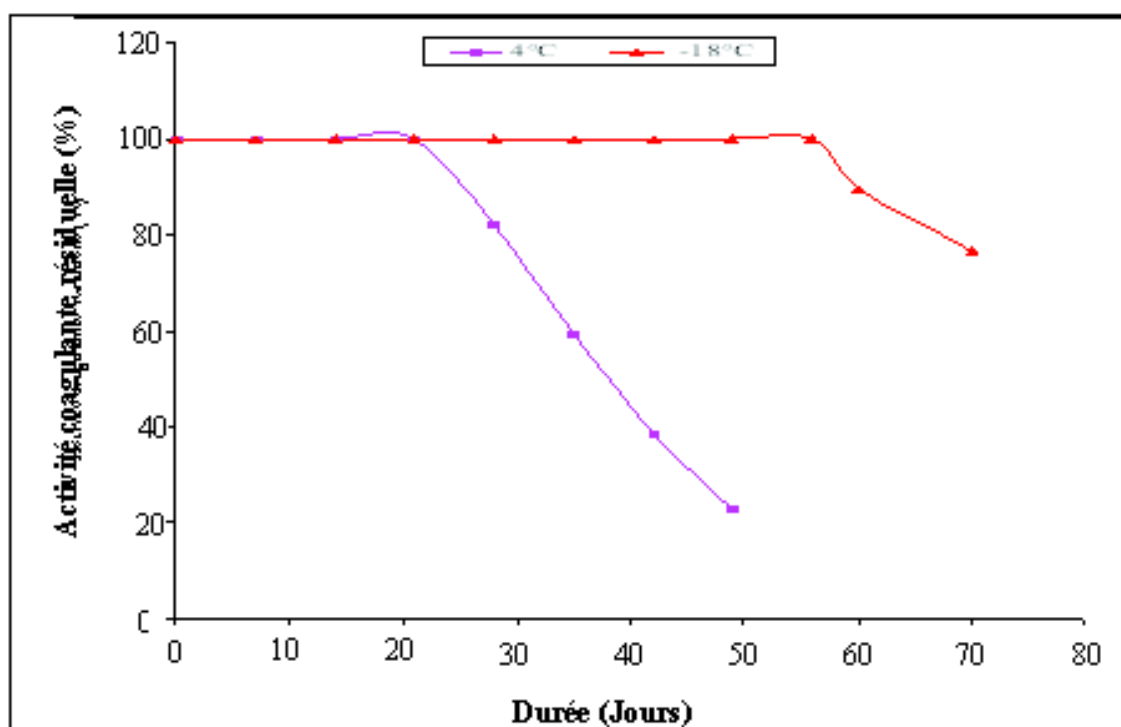


Figure 24 : Stabilité de l'extrait purifié au cours de la conservation.

6 – Activité protéolytique

L'évolution de l'azote non protéique au cours de l'hydrolyse enzymatique a été rapportée par la figure 25.

Les résultats obtenus montrent que l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut évolue fortement avec la durée de contact enzyme-substrat par rapport à l'extrait purifié et à la présure animale. On distingue deux phases pour l'extrait brut ; la première durant laquelle une forte augmentation du taux de l'azote non protéique (entre 10 à 90 mn de contact). Ce résultat laisse supposer qu'il y a eu hydrolyse des protéines et libération des acides aminés libres et des peptides de faible poids moléculaire. La seconde phase correspond à un palier durant laquelle la protéolyse générale est relativement stable (90 – 180 mn d'incubation).

Par ailleurs, le taux de dégradation de la caséine évolue faiblement avec la durée d'incubation pour la présure. Par contre, la protéolyse de l'extrait enzymatique purifié évolue rapidement pour atteindre un maximum au bout d'une heure d'incubation, au delà, elle diminue.

L'activité excessive de l'extrait coagulant brut du *Mucor pusillus*, par comparaison à la présure, est probablement due à l'action non spécifique de la protéase fongique envers les autres caséines du lait (α_S , β , δ caséines) et cela en plus de leurs actions spécifiques d'hydrolyse envers la κ -caséine.

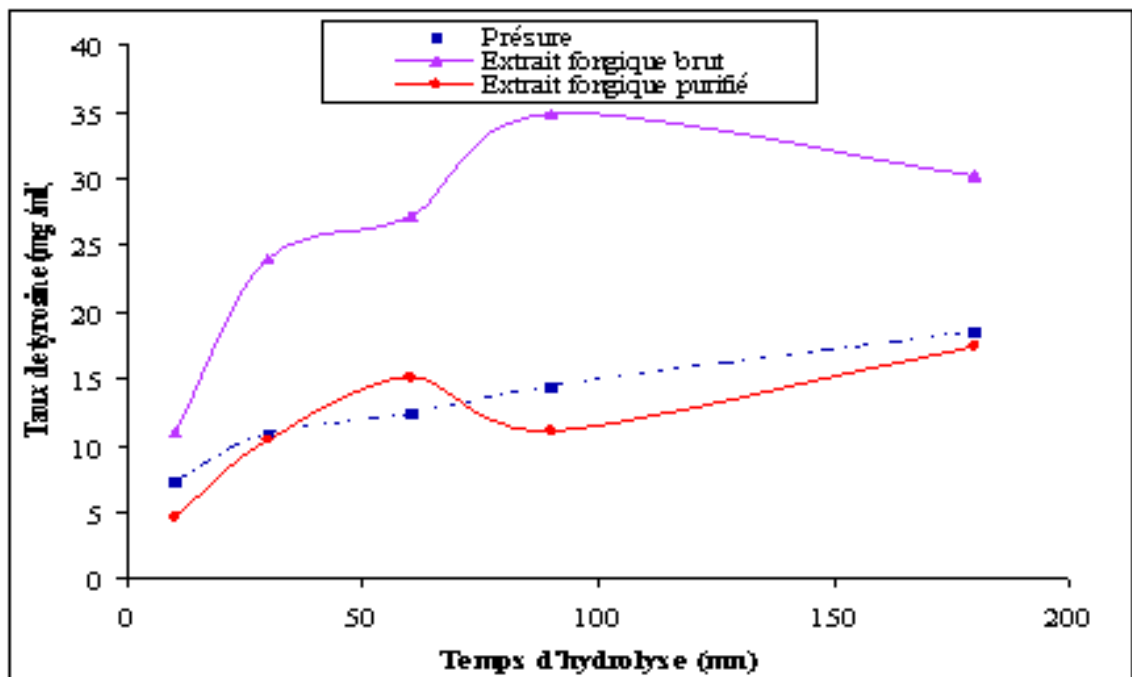


Figure 25 : Activité protéolytique des échantillons étudiés

Les enzymes microbiennes et végétales manifestent une forte activité protéolytique par comparaison aux protéases d'origine animale. En effet, selon certains auteurs en l'occurrence Alais (1984) et plus récemment Krause et *al.* (1998), les enzymes fongiques ont une activité plus grande que celle de la présure et de la pepsine. Par ailleurs, suite à une série de travaux de recherche portant sur les coagulases végétales, il a été conclu que ces enzymes développent une production importante d'hydrolysats de caséine (Morsli, 1996 ; Fernani, 2002 et Mouzali, 2002).

En général, les coagulases doivent développer une activité faible de protéolyse générale capable de se manifester sur toutes les protéines du lait pendant l'affinage, car si celle-ci est excessive, elle entraîne une diminution du rendement fromager.

Conclusion Générale

L'objectif de notre étude est de contribuer à une meilleure connaissance d'une protéase coagulant le lait, issue de la culture de la souche de *Mucor pusillus*.

Les résultats montrent que l'extrait enzymatique brut, obtenu à partir de la culture en surface de *Mucor pusillus*, est caractérisé par une force coagulante de 1 /1200.

Plusieurs protocoles de purification ont été appliqués. Il a été conclu que l'étape du fractionnement au sulfate d'ammonium (40 - 80 % de saturation) de l'extrait enzymatique brut de la souche fongique étudiée n'est pas préconisée. En effet, une chute importante de l'activité coagulante a été constatée (28,53 %) avec un facteur de purification voisin de 3. De plus, l'étude électrophorétique sur SDS- PAGE ne montre aucune différence entre l'extrait précipité par fractionnement et celui précipité directement à 80 % de saturation. Par ailleurs, la chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100 de l'extrait enzymatique brut lyophilisé a permis d'obtenir un meilleur rendement de l'ordre de 55,13 tout en multipliant par un facteur de 20,88 l'activité spécifique de la coagulase.

La purification par électrophorèse sur SDS-PAGE de la fraction coagulante purifiée relève une seule bande homogène de poids moléculaire de l'ordre de 49 000 Daltons.

En outre, les conditions optimales d'activité de l'enzyme purifiée sont déterminées. L'activité coagulante est maximale à un pH de 5, à une température de 50°C et à une concentration en CaCl₂ du lait de 0,02 M. Les résultats montrent par ailleurs, que l'enzyme est caractérisée par une activité coagulante relativement stable dans un intervalle de 30°C à 50°C pendant 30 mn. En revanche, l'entreposage à une température de - 18°C pendant 56 jours permet une meilleure conservation.

A ce stade de l'étude, les résultats mettent en évidence la possibilité d'obtenir une protéase coagulante à partir de *Mucor pusillus* dont les caractères classiques, exception faite pour la température, sont relativement analogues à ceux de la présure traditionnelle.

En perspective, il s'agit de compléter ce travail par une étude approfondie qui portera sur divers aspects en l'occurrence :

- Sélection de souches fongiques productrices de protéases coagulant le lait ;
- Optimisation de leurs paramètres de synthèse de protéases ;
- Essai de fabrication de fromage avec les extraits coagulants de *Mucor pusillus* ;
- Etude socio-économique de production de l'agent coagulant.

Références bibliographiques

- Abd-El-Rahman A.M., Madkor S.A., Shalabi S.I. et Mettwall N.H., 1990** : Rabbit pepsin as a rennet substitut. I- Extraction, purification, and characterization of the enzyme. *Minia. J. Agric. Res. And Dev.*, 12 (3): 1685- 1702.
- Agboola S., 2002** : Cheesemaking from ultrafiltered milk using plant rennet. *Austrian journal Dairy technology*, 57, 2, p.143.
- Aikawa J., Yamashita T., Nishiyama M et Horinouchi S., 1990** : Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of *Mucor* rennin, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, produced by recombinant yeast. *J. Biol. Chem.*, 265 (23) : 13955 – 13959.
- Alais C., 1984** : Sciences du lait. Principe des techniques laitières. Ed. Sepaic, Paris, 4^{ème} Ed., 68.
- Alais C. et Linden G., 1997** : Abrégé de biochimie alimentaire. Ed. Masson, Paris, 248 p.
- Anifantakis E.M. et Kandarakis J.G., 1983** : Utilisation de la pepsine bovine en fabrication de fromage Feta fait à partir du lait de brebis. *Le lait*, 63 : 416 – 424.
- Anstrup K., 1980** : Proteinases. In: microbial enzymes and bioconversions. Ed. Rose A.H. Academic Press, 93-108.
- Ball I. K., 2000**: Caractérisation de la coagulase extraite du latex du figuier *Ficus carica* L. Mémoire ingénieur agronome, I.N.A., EL Harrach.
- Beldarrain A., Acosta N., Montesinos R., Mata. M. and Cremata J., 2000**: Characterization of *Mucor pusillus* rennin expressed in *Pichia pastoris* : enzymic, spectroscopic and calorimetric studies. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31 : 77- 84.
- Belhamiche N., 2001** : Extraction et caractérisation d'une protéase coagulante de *Mucor pusillus*. Mémoire ingénieur agronome, I.N.A., El Harrach.
- Belyauskaite I.P., Palubinskas V.J., Ancheuko O.E., Vesa V.S., and Glemzha A.A., 1980** : Purification and some properties of the extracellular acid proteases from *Mucor renninus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 2 : 37- 44.
- Bengana M., 2001** : Caractérisation des enzymes protéolytiques (Pepsine/chymosine) isolées à partir des caillettes de bovins adultes. Thèse Magister, Sciences alimentaires, I.N.A., El- Harrach.
- Brule G. et Lenoir J., 1990** : Les mécanismes généraux de la transformation du lait en fromage. In : Fromage. Coord. Eck, Ed.Tech. et Doc. Lavoisier, Paris, 1 – 21.
- Bruno M.A., Pardo M.F., Caffini N.O. et Lopez L.M.I., 2002** : Purification of a new *hieronymi* endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia* Mez (Bromeliaceae). *Acta Farm. Bonaerense*, 21 (1) : 51 – 56.
- Cavalcanti M.T.H., Teixeira M.F.S., Lima Filho J.L., and Porto A.L.F., 2004** : Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardioopsis* sp. *Bioresource Technol.*, 93 : 29-35.

- Chemlal R., 1998** : Caractérisation et purification partielle de coagulases de *Bacillus subtilis* S₃ et *Bacillus coagulans* LC.23.2. Mémoire Ing. Génie Biol., INS, USTHB, Bab Ezzouar.
- Collin J.C., Grappin R. et Legraet Y., 1977** : Etude de la méthode de mesure, selon Berridge, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. Rev. Lait. Franç., 355 : 389- 394.
- Cuvellier G.F., 1999** : Production des enzymes. In : Biotechnologie. Goor. Scriban R., 5^e ed., 345 – 363.
- D'Ambrosio A., Rossano R., Ungaro N., and Riccio P., 2003**: Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida*. J. Mol. Catalys. B : Enzymatic 22 : 145-150.
- Fadyloglu S., 2001** : Immobilization and characterisation of ficin. Nahrung / Food, 45(2): 143-146.
- Fernandez-Lahore H.M., Fraile E.R. et Cascone O., 1998**: Acid protease recovery from a solid – state fermentation system. J. Biotech., 62: 83 – 93.
- Fernandez-Lahore H.M., Andery R.M., Fraile E.R., Biscoglio de Jimenez M., Pirpignani L., Machalinsh C. and Casone O., 1999**: Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid – state cultures. J. Dairy Sci., 83: 584 – 602.
- Fernani L., 2002** : Obtention et caractérisation d'une protéase coagulant le lait à partir de graines de melon (*Cucumis melo* L.). Mémoire de Magister, Génie alimentaire, Faculté des Sciences de l'ingénieur, Boumerdes.
- Foltmann B., Pedersen V.B., Kauffman D. and Wybrandt G., 1979**: The primary structure of calf chymosin. J. Biol., 254 (17): 8447 – 8456.
- Fox P.F. et Whitaker J.R., 1977** : Isolation and charaterization of sheep pepsin. Biochem. J., 161 : 389 – 398.
- Garnot P. et Martin P., 1980** : Présure, composition, activité, son rôle en fromagerie. Technique Laitière 930 (3) : 27- 30.
- Goursand J., 1999** : Réacteurs traditionnels à enzymes libres : cas de l'industrie laitière. In: Biotechnologies. Coord. Scriban R., 5^{ème} ed.: 365 – 401.
- Green M.L. et Stackpole A., 1975**: The preparation and assesment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase-swine pepsine mixture for Cheeddar cheese-making. J. Dairy res., 42: 297 – 312.
- Green M.L., 1977**: Review of the progress of science : milk coagulants. J. Dairy res., 44: 159 – 188.
- Haard N.F., Schamsuzzaman K., Brewer P. et Arunchalam K., 1982** : Enzymes from marine organisms as rennet substitutes. In : Utilisation des enzymes en technologie alimentaire. Ed. Dupuy P. Tech. et Doc., Lavoisier, Paris, 237 – 241.
- Iwasaki S., Tamura G. et Arima K., 1979** : Milk clotting enzyme from microorganisms. Part II – the enzyme production and the properties of crude enzyme. Agr. Biol., 31 (5): 546 – 551.

- Jarmul I., Reys A., Poznanski S. et Zelazowska H., 1982** : Utilisation du mélange de la pepsine avec la préparation microbienne "Fromase" dans la fabrication des fromages Edam et Kortowski. *Le lait*, 62 : 75 – 86.
- Kamoun P., 1998** : Appareils et méthodes en biochimie. Ed. Flammarion Médecine sciences, 374 p.
- Kaneda M. et Tominaga N., 1975**: Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *J. Biochem. (Tokyo)*, 78(6): 1287 – 1296.
- Khalid M., Shammet R.J., Brown T. et Mc. Mahon D. (1992)**. Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on k-casein. *J. Dairy sci.*, 75 (6): 1287 – 1296.
- Khan M.R., Blain J.A. et Patterson J.D.E., 1979** : Extracellular protease of *Mucor pusillus*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 37 (4) : 719 – 724.
- Khan M.R., Blain J.A. et Patterson J.D.E., 1983** : Partial purification of *Mucor pusillus* intracellular protéases. *Appl. Envir. Microbiol.*, 45 (1) : 94 – 96.
- Krause W., Patzsh M., Hassan Z.M.R. et Haufe T., 1998**: Substrate and binding specificity of aspartic protease with milk clotting properties. *Nahrung* 42, Nr. 3/4: 162-165.
- Kumar S., Sharma N.S., Saharan N.R., and Singh R., 2005**: Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae* : purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40: 1701-1705.
- Lemieux L. et Simard R.E., 1991** : Better flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development. *Le lait* 135 : 503 – 504.
- Lenoir J., Auberger B. et Gripon J.C., 1979** : Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. III. Caractérisation d'une protéase acide. *Le lait* 585 – 586 , 244 – 268.
- Lenoir J., Remeuf, et Schneid N., 1985** : Le lait de fromagerie. In : Eck A. et Gillis J.C. *Le fromage de la science à l'assurance- qualité*. 3^e ed. Tec. Et Doc. Lavoisier.
- Ll oriente 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.
- Levadoux W., Johnson M. et Ander G., 1989**: Monitoring the degradation of commercial microbial rennet preparations. *J. Dairy Sci.*, 72 (3):627 – 634.
- Linden G. et Lorient P., 1994** : Biochimie agro-industrielle : valorisation alimentaire de la production agricole. Ed. Masson, Paris, Milan, Barcelone, 141-163.
- Lopez M.B., Jordan M.J., Hellin P. et Laencina J., 1996**: Technological suitability of different rennets and coagulant enzymes applied in Murciano-Granadina goat milk. International Dairy Federation,
- Lo Piero A.R. et Petrone G., 1999**: Purification and partial characterization of an ATP-hydrolysing serine protease from lettuce leaves. *Phytochem.*, 51 : 349 – 356.
- Lo Piero A.R., Petrone G. et Puglisi I., 2002**: Characterization of «lettucine », a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk-clotting. *J. Agric. Food. Chem.*, 50 (8): 2439 – 2443.

- Lowry O.H., Rosenbrough N.J.; Farr A.I. et Randall R.J., 1951:** Protein measurement with the Follin phenol reagent. J. Biol. Chem., N°193 : 265- 275.
- Luquet F.M., 1985 :** Lait et produits laitiers. Vache. Brebis. Chèvre. T2. Ed. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris.
- Macedo Q., Faro C.J. et Pires E.M., 1993 :** Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine k-casein. J. Agric. Food Chem.41: 1535- 1540.
- Macedo I.Q., Faro C.J. et Pires E.M., 1996 :** Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardosin *Cynara cardunculus* L.: action on bovine #_S and # caseine and comparaison with chymosin. J. Agric. Food Chem.,44 : 42- 47.
- Machou Dj., 2004 :** Extraction et purification de protéases coagulants le lait en vue de leur substitution à la présure traditionnelle : Essai d'obtention d'une protéase issue d'estomac de poisson (*Seriola dumerili*). Mémoire de Magister. Génie alimentaire. Faculté des Sciences de l'ingénieur. Boumerdes.
- Madsen J.S. and Quist K.B., 1997:** Hydrolysis of milk protein by a *Bacillus licheniformis* protease specific for acidic aminoacid residues. J. Food Sci., 62 (3) : 579-582.
- Maheshwari R.Bharadwaj G. et Bhat M.K., 2000:** Thermophilic fungi : their physiology and enzymes. Microbiol. Molec. Biol. Rev., 64 (3) : 461 – 488.
- Mahon M.C. et Brown R.T., 1985 :** Chymosine, présure, protéase microbienne et pepsine. Effet du type d'enzyme sur la coagulation du lait. J. Dairy Sci., 68 (3): 628- 632.
- Martin P., Collin J.C., Carnot P., Ribadean B., Dumas et Macquot G., 1982 :** Méthodes d'analyse quantitative des extraits de présure et de pepsine bovine “ détermination des teneurs en enzymes actifs” in use of enzymes in food technology. Dupy P. Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier. Symposium Intern. Versailles, 287- 289.
- Martin B. et Coulon J.B., 1995 :** Milk production and characteristics. 1- Influence of milk production conditions on herd milk coltting ability. Le lait, 75(3) :61 – 68.
- Martin L.A.P., Pestana De Vasconcelos M.M. et De Sousa R.B., 1996 :** Thistle (*Cynara cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization.Lait, 76: 473 – 477.
- Mathieu J., 1998 :** Initiation à la physico-chimie du lait. Ed. Tech. Et Doc. Lavoisier, Paris, 220 p.
- Matoub L., 2000 :** Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Mémoire de Magister. Sciences alimentaires. I.N.A. El-Harrach.
- Mc Mahon D.J. et Brown R.J., 1984:** Effects of calcium, phosphate and bulk culture media on milk coagulation properties. J. Dairy Sci., 67: 499 – 512.
- Mietton B., Dermazeaud M., Deroissart H. et Weber F., 1994 :** Transformation du lait en fromage. In : Bactéries lactiques. T2. Coord. Deroissart H. et Luquet F.M. Ed. Lorica.

- Morsli A., Bellal M.M. et Ammouche A., 1985** : Etude du pouvoir coagulant de quelques plantes locales. Annales de l'I.N.A. El-Harrach, 9 :63- 84.
- Morsli A., 1996** : Recherche sur les activités protéasiques de l'extrait de *Cynara scolymus*, du latex de *Ficus carica* et du pro ventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Thèse de Magister. Sciences alimentaires. I.N.A. El-Harrach.
- Morsli A., Acherar A. et Bellal M.M., 2000** : Recherche de succédanés de la présure utilisés dans la fabrication de fromages traditionnels en Algérie. Symposium international sur la filière lait en Méditerranée. Hammamat. Tunis. Tunisie.
- Mouzali L., 2001** : Extraction enzymatique et caractérisation de l'agent coagulant de la fleur de cardon sauvage (*Cynara cardunculus* L.). Mémoire de Magister. Sciences alimentaires. I.N.A. El-Harrach.
- Munoz R., Garcia J. L., Carrascosa A. V., and Go n zalez R., 2004** : Cloning of the authentic bovine gene encoding pepsinogen A and its expression in microbial cells. Appl. Envir. Microb., 70 (5) : 2588-2595.
- Nàjera A.I., Renobales M., and Barron L.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.
- Noor-Develiet P.E., Gist-Brocades N.N. et Delft N.C.D., 1983** : Les enzymes alimentaires : utilisation et innocuité. Microbiol. Alim. Nut., 1 : 1 – 5.
- Nouani A., Belkhodja R., Machou D., Fernani L. et Bellal M.M., 2002** : Recherche et caractérisation de quelques succédanés de présure en vue de leur utilisation dans la technologie fromagère. 1^{er} Séminaire international sur la qualité et la sécurité dans le secteur agroalimentaire. Blida 13 et 14 Mai.
- Öner M.D. et Akar B., 1993**: Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in Gaziantep cheese production. Lebensm.Wiss.U- Technol., 26 : 318 – 321.
- Preetha S. and Boopathy R., 1997**: Purification and Characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. W.J. Microb. Biotechn. 13: 673-678.
- Poza M., Sieiro C., Carreira L. and Barros-Velazquez J., 2003**: Production and characterization of the milk-clotting protease of *Mixococcus xanthus* strain 422. J. Ind.Microbiol.Biotechnol., 30: 691- 698.
- Ramet J.P., 1981** : Study of technological properties of a new thermosensitive coagulant of *Mucor miehei*. Marscall Italian and Specialty cheese seminars.
- Ramet J.P., 1990** : Les agents de transformation du lait. In: Fromage. Coord. Eck A. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris : 101 – 105.
- Rao M.B., Tanksal M., Ghtage M.S. et Deshpande V.V., 1998**: Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. Microbio. Mol. Biol. Rev., 62 (3): 597 – 635.
- Rapport des Statistiques du Commerce Extérieur, 2001** : Importation de présures et de ses concentras

- Reps A., Poznanski S., Babichowski A. et Jedrychowski L., 1979** : Propriétés des substituts de présure fabriqués à partir de *Mucor miehei*. Le lait, 580 – 582, 1 –
- Safarik I., 1984**: Rapid isolation of microbial proteases. J. chromatography, 298: 531-533.
- Schorcsh C., Jones M.G. et Norton T., 2002**: Micellarcaséin gelation at high sucrose content. J. Dairy Sci., 85: 3155 – 3163.
- Silva S.V. et Malcata F.X., 1998**: Proteolysis of ovine casein by cardosin A., an aspartic acid proteinase from *Cynara cardunculus* L. Le lait 78: 513 – 519.
- Smeets S.R., 1995**: Enzyme coagulation. Dairy technology paper, 5 (2): 14 – 16.
- Slamani R., 2003** : Optimisation d'une méthode d'extraction de la pepsine ovine. Essai de purification et de caractérisation. Mémoire de Magister. Sciences alimentaires INA. El-Harrach.
- Somkuti G.A. et Babel F.J., 1968**: Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. J. Bact., 95 (4) : 1407 – 1414.
- Sousa M.J. et Malcata F.X., 1997**: Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical, and proteolysis characteristics of ovine cheese. J. Agric. Food chem. 47 (1): 74 – 81.
- Sternberg M., 1976** : Microbial rennets. In: advances in applied microbiology. Ed. Perlman D. Academic Press.
- Tarodo de la Fuente B., Lablee J. et Quq J.L., 1999** : Le lait, coagulation et synérèse. Industries Alimentaires et Agricoles, 116 : 19 – 26.
- Terrien M. et Fournier J., 1998** : Chimie du petit déjeuner. Ed. Nantes. Culture et techniques, 304 p.
- Uchikoba T. et Kaneda M., 1996**: Milk-clotting activity of Cucumisin, a plant serine protease from melon fruit. Appl. Biochem. Biotechn., 56 : 325 – 330.
- Vioque M., Gomez R., Sanchez E., Mata C., Tajada L. et Fernandez-salguero J., 2000** : Chemical and microbiological characteristics of Ewes'milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara condunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. J. Agric. Food Chem., 48: 451 – 456.
- Zhao J., Chen S. et Agboola S.O., 2003**: Effect of starter culture on the biochemical and sensory properties of ovine cheese manufactured with a plant coagulant. Australian J. of Dairy Techn. 58 (2), p. 219.

ANNEXES

Liste des abréviations

B.S.A. D. E. A. E. E.E.B. Log (Ve) P. A. G. E. P.S.A. Q. E. A. E. Rf S. D. S. T.E.M.E.D. US	: Bovine sérum albumine : Diethyl-amino ethyl : Extrait enzymatique brut : Logarithme du volume d'élution : Polyacrylamide gel electrophoresis : Persulfate d'ammonium : Quaternary-amino-ethyl : Rapport frontal : Dodecyl Sulphate de sodium : N, N,N', N' - tetramethylenediamine : Unité Soxhlet
US /ml	:Unité Soxhlet par millilitre
UP	: Unité de présure
UP /ml	: Unité de présure par millilitre
Ve	: Volume d'élution
↓↓ (NH ₄) ₂ SO ₄	: Précipitation au sulfate d'ammonium

Annexe 1

Préparation du substrat de Berridge

* Le substrat de Berridge est préparé par addition de 12 g de lait écrémé à 100 ml de solution de CaCl₂ à 0,01M. Après 30 mn d'agitation lente, le pH est ajusté à 6,4. La température du lait est ramenée à 35°C afin de mesurer le temps de coagulation qui correspond à l'apparition des premiers flocons sur la paroi interne du tube dans les conditions de réaction.

Annexe 2

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

Solutions

- Solution alcaline (A) : Soude caustique (NaOH) (2 g /500 ml) Carbonate de sodium	500 ml 10g
- Solution cuivrique (B) : Sulfate de cuivre 5 H ₂ O (0,32 g / 100 ml) Tartrate de sodium et de potassium (1 g / 100 ml)	2 ml 2 ml
- Solution (C) : Solution (A) Solution (B)	50 ml 1 ml
- Solution (D) : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1 / 2.	

Méthodes de mesure

*** 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.

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

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

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

Laisser incuber 20 mn à 35°C.

*** Conditions d'hydrolyse**

Ajouter 1 ml de la solution enzymatique à 1 ml de la solution de caséine à 2 % (P/ V) dans le tampon citrate de sodium pH 5,2.

Incuber pendant 10,30, 60, 90 et 180 mn. à 35°C.

Après incubation, ajouter 5 ml de T.C.A. (12 %) (P/V).

Laisser reposer 15 mn.

Filtrer à travers du papier filtre.

*** Préparation de l'échantillon**

- A 1 ml du filtrat, ajouter 5 ml de la solution (C) puis mélanger.

- Incuber pendant 10 mn à 35°C.

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

- Incuber à 35°C pendant 20 mn.

*** Préparation du blanc**

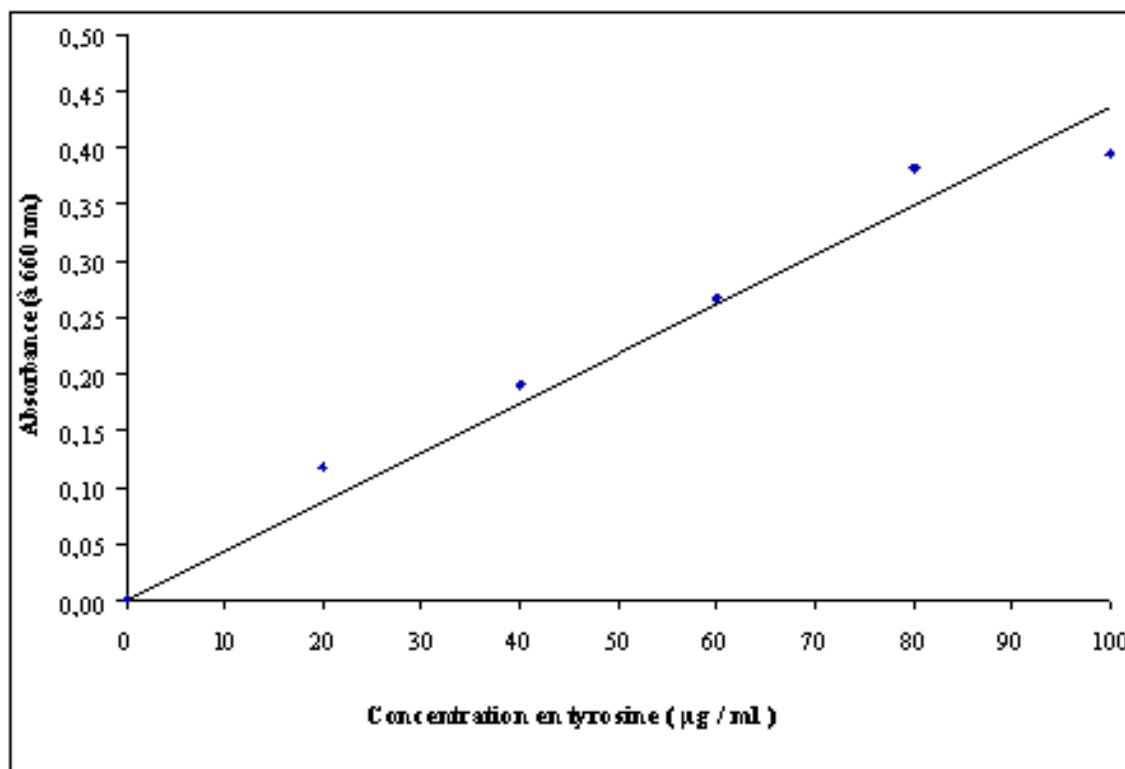
A 1 ml de la solution caséinique sont ajoutés 5 ml du T.C.A. (12 %).

Ajouter enfin 1 ml de la solution enzymatique.

*** Lecture de l'absorbance**

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

Figure 1 : Courbe étalon de la tyrosine.



Annexe 3

Dosage des protéines (Lowry et *al.*, 1951)

Solutions

- Solution (A) : 5 % Na_2CO_3
- Solution (B) : 0,5 % Cu SO_4 , 5 H_2O in 1 % sodium-potassium tartrate
- Solution (C) : 50 ml (A) + 2 ml (B) (à préparer immédiatement)
- Solution (D) : NaOH (1 N)
- Solution (E) : Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 1 / 2.

Méthode de mesure

- Courbe étalon de B.S.A.

Préparer des solutions diluées de concentrations croissantes : 25, 50, 75, 100, 150 et 200 $\mu\text{g/ml}$ à partir d'une solution- mère de B.S.A. (200 $\mu\text{g/ml}$). Le tube témoin contient 0,5 ml d'eau distillée.

Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D) puis 2,5 ml de la solution (C).

Laisser reposer pendant 10 mn.

Ajouter 0,5 ml de la solution (E).

Incuber pendant 30 mn. à l'obscurité.

- Lecture de l'absorbance

La lecture de la densité optique est effectuée à 750 nm après avoir étalonner le spectrophotomètre avec le témoin.

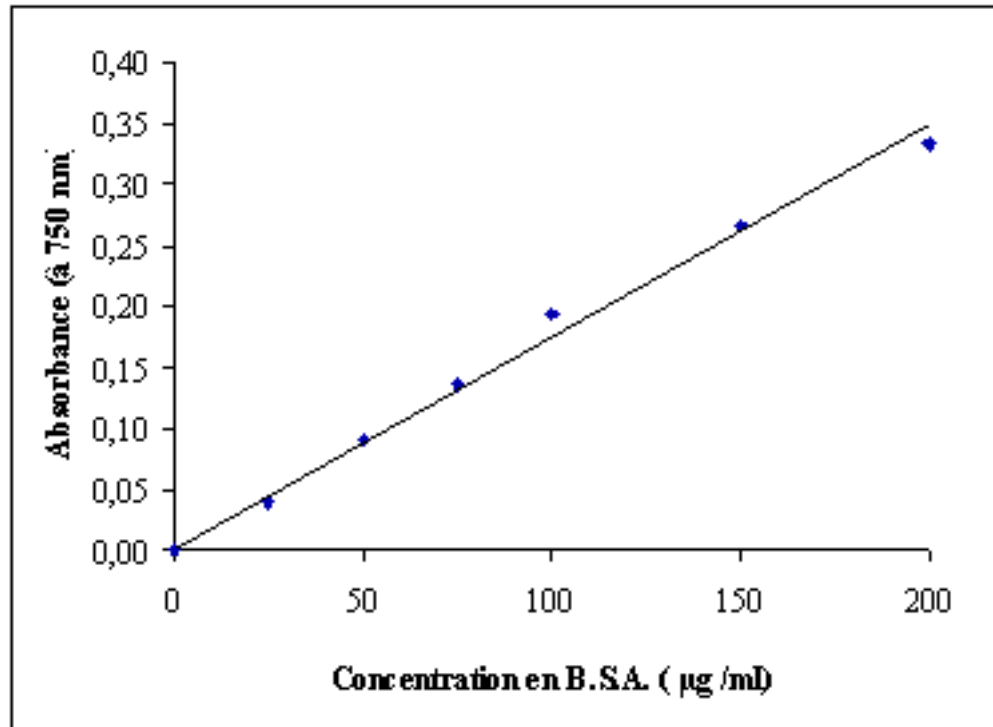


Figure 2 : Courbe étalon de la B.S.A.

Annexe 4

Étalonnage de la colonne Pharmacia (1 x 60 cm) avec des protéines standards

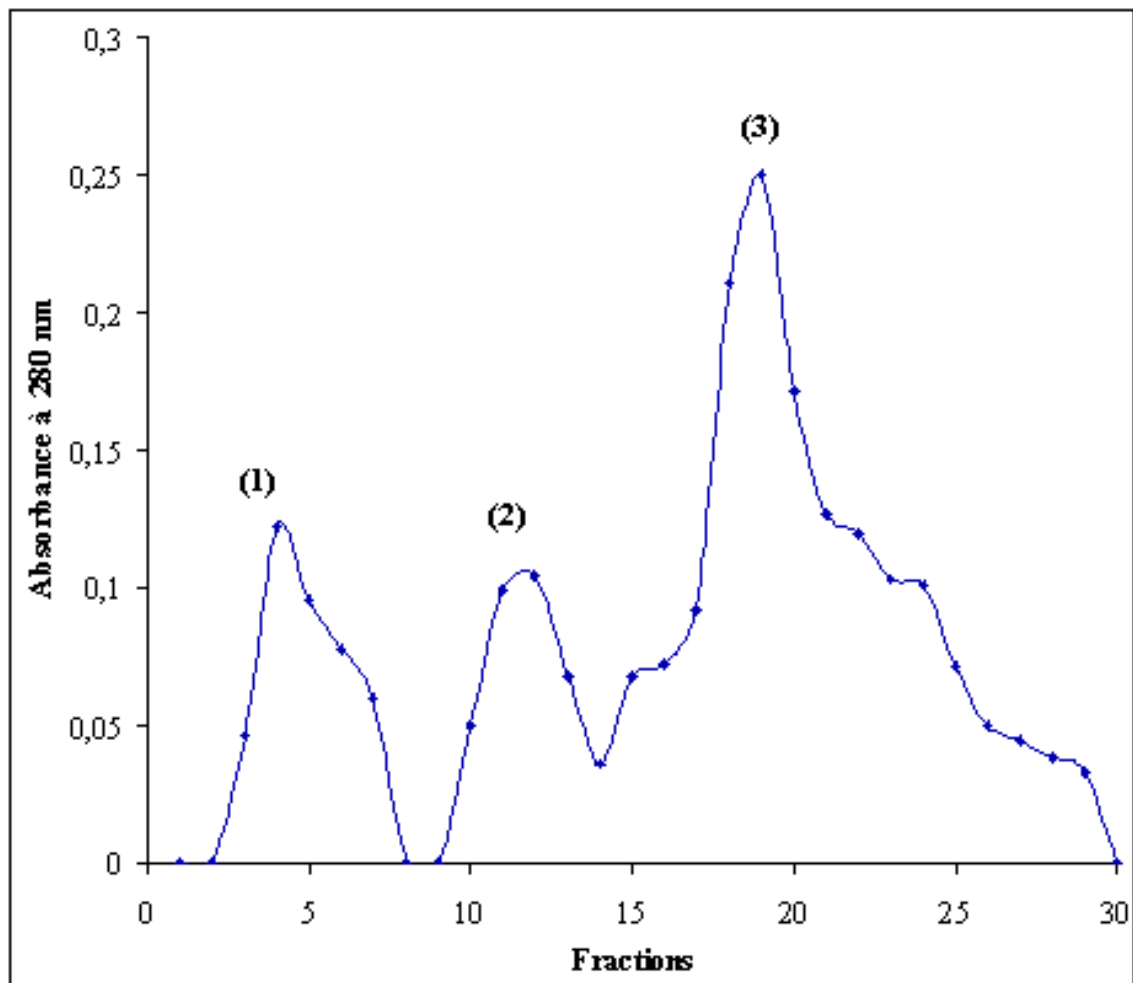


Figure 3 : Profil d'éluion sur Sephadex G-100 de marqueurs de protéines de poids moléculaires : (1) B.S.A. : 67 000 Da, (2) pepsine : 35 000 Da, (3) trypsine : 23 800 Da. Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'éluion : phosphate (0,02 M ; pH 6), débit : 2 ml / h, fraction : 1,5 ml.

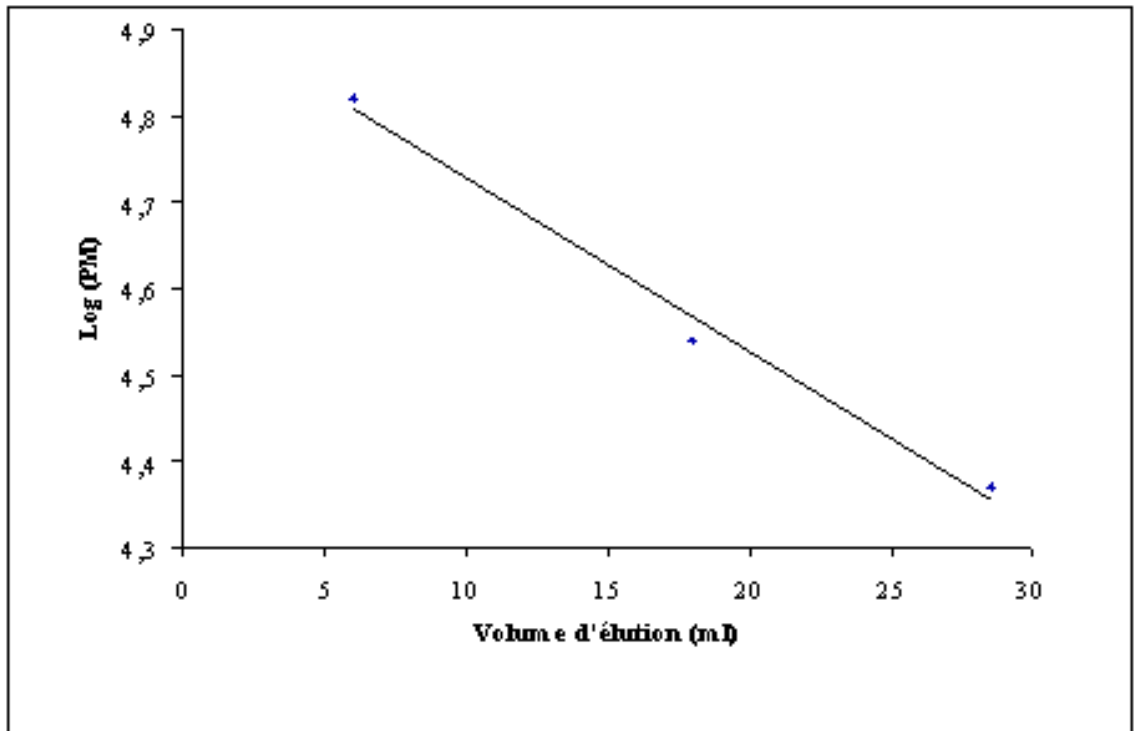


Figure 4 : Courbe étalon des protéines marqueuses : $\text{Log}(PM) = f(Ve)$

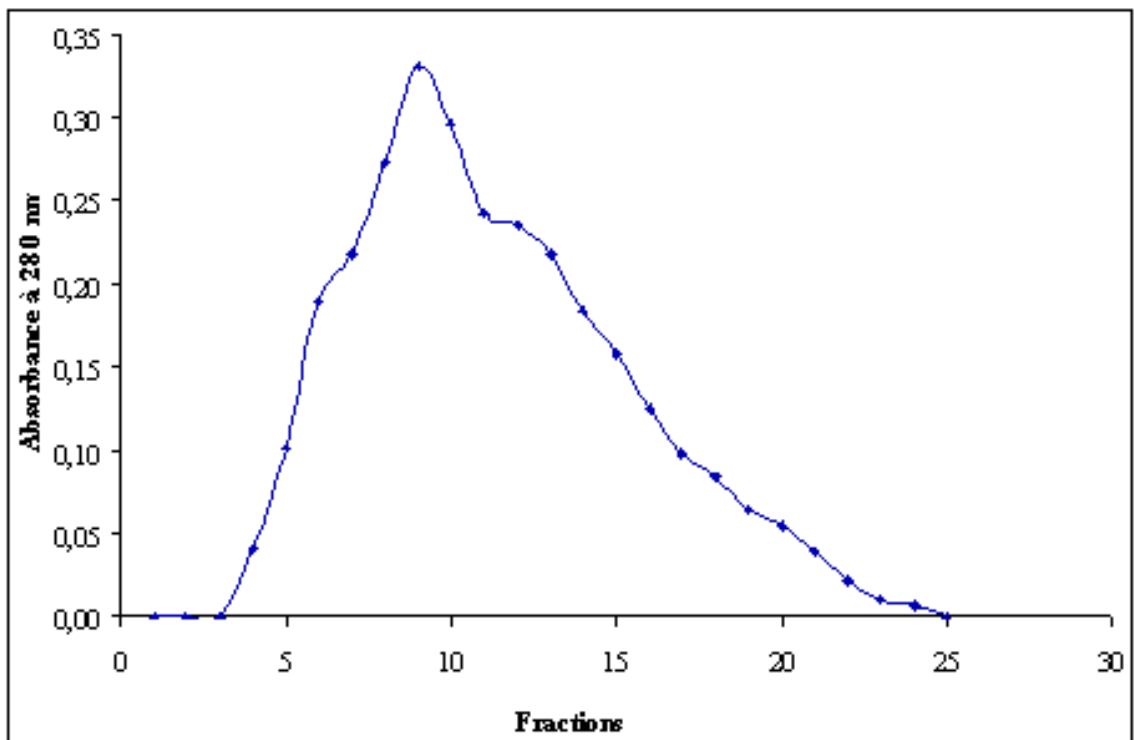


Figure 5 : Profil d'élution de la coagulase purifiée de *Mucor pusillus* sur Sephadex G-100, colonne Pharmacia (1 x 60cm), tampon d'élution : phosphate (0,02 M ; pH 6), débit : 2 ml / h, fraction : 1,5 ml.

Annexe 5

Solutions		Remarques
Solution acrylamide / bis-acrylamide		
Acrylamide	3 g	La solution est dégazée puis filtrée. Elle se conserve à +4°C.
Bis-acrylamide	0,08 g	
Eau distillée	10 ml	
Tampou Tris-HCl 1,5 M ; pH 8,8		
Tris base	18,224 g	Agiter quelques minutes puis filtrer. Garder à température ambiante (flacon brun). Ajuster le pH à 8,8 avec du HCl 4 N.
S.D.S.	0,2 g	
Eau distillée	80 ml	
Eau distillée Q.S.P.	100 ml	
Tampou Tris-HCl 0,5 M ; pH 6,8		
Tris base	6,048 g	Agiter quelques minutes puis filtrer. Garder à température ambiante (flacon brun). Ajuster le pH à 6,8 avec du HCl 4 N.
S.D.S.	0,4 g	
Eau distillée	80 ml	
Eau distillée Q.S.P.	100 ml	
Tampou échantillon pH 6,8		
Solution (A) - (stock)		
Tris-HCl 0,5 M ; pH 6,8**	1,65 ml	Solution à stocker à +4°C
E.D.T.A. pH 7,5	120 µl	
Saccharose	4,3 g	
Bleu de Bromophénol	120 µl	
Eau distillée Q.S.P.	20 ml	
Solution (B)		
Solution (A)	900 µl	estemporadement
S.D.S. (10%)	200 µl	
Bleu de Bromophénol	80 µl	
Tampou Tris-HCl 0,5 M ; pH 6,8**		
Tris base	6,048 g	Ajuster le pH à 6,8 avec du HCl 4 N
Eau distillée	80 ml	
Eau distillée Q.S.P.	100 ml	
Tampou de migration pH 8,3 (solution stock 10 fois concentrée)		
Tris base	3,03 g	Ajuster le pH à 8,3 avec HCl 4 N
Glycine	14,42 g	
S.D.S.	1 g	
Eau distillée Q.S.P.	100 ml	
Gel de séparation 12 %		
Acrylamide / bis-acrylamide (30%)	2,75 ml	Le P.S.A. et le T.E.M.E.D. sont ajoutés en dernier. La polymérisation se fait à température ambiante.
Tris base 1,5 M ; pH 8,8	1,25 ml	
Eau distillée	1,3 ml	
P.S.A. (10%)	25 µl	
T.E.M.E.D.	5 µl	
Gel de concentration 5 %		
Acrylamide/bis-acrylamide (30%)	0,375 ml	Le P.S.A. et le T.E.M.E.D. sont ajoutés en dernier. La polymérisation se fait à température ambiante.
Tris base 0,5 M ; pH 6,8	1 ml	
Eau distillée	2,25 ml	
P.S.A. (10%)	40 µl	
T.E.M.E.D.	10 µl	
Solution de fixation		
T.C.A. à 12%	12 g	
Eau distillée	100 ml	
Solution de coloration au bleu de Coomassie		
Bleu de Coomassie R.250	0,415 g	Agiter, filtrer et conserver à température ambiante.
Méthanol	250 ml	
Acide acétique	50 ml	
Eau distillée	250 ml	
Solution de décoloration		
Méthanol	250 ml	Conserver dans un flacon brun à température ambiante.
Acide acétique	50 ml	
Eau distillée	250 ml	
Muqueux		
PM:		
Phosphorylase	94 000 Da	
Bovin serum albumin	67 000 Da	
Ovalbumine	43 000 Da	
Carbonic anhydrase	30 000 Da	
Trypsine inhibiteur	20 000 Da	
α-Lactalbumine	14 000 Da	

Electrophorèse en conditions dénaturantes (P.A.G.E.- S.D.S.)

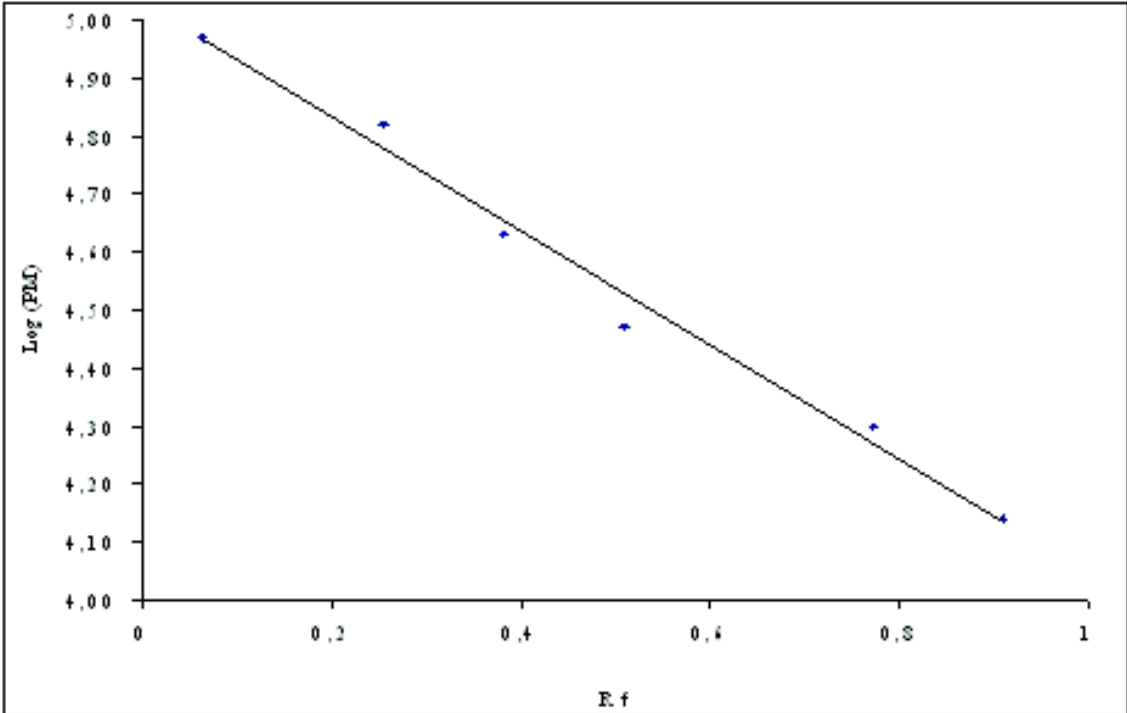


Figure 6 : Courbe étalon des protéines marqueuses : $\text{Log}(PM) = f(Rf)$