

الجمهورية الديمقراطية الجزائرية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA BOUMERDES
DEPARTEMENT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

*En vue de l'obtention du diplôme
De MASTER en GENIE DES PROCÉDES*

Option : Sciences et biotransformation du lait

Thème

**Isolement des souches bactériennes à partir du sol
productrices d'enzyme coagulant le lait
(Caractérisation et purification de la protéase)**

Soutenu le : 21/06/ 2017

Présenté par: REKIK chaynez

HADDADI hadjer

Jury de soutenance:

M^{me} ANNOU.S

M^{me} TALANTIKITE.S

M^{me} BENMALEK.N

M^{me} BOUAZIZ.F

Présidente

Promotrice

Examinatrice

Examinatrice

MAA (UMBB)

MCB (UMBB)

MAA(UMBB)

MA (UMBB)

Année universitaire 2016/2017

Remerciements

Nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté pour élaborer ce modeste travail.

Nous tenons à remercier sincèrement notre promotrice Madame « TALANTIKITE » pour avoir bien voulu diriger ce travail en nous faisant part de ses connaissances, ses remarques et ses conseils.

Nous n'oublions pas de remercier les membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail. Ainsi que tous les enseignants de « MSBLA 15 ».

Nos sincères remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidé conseillé, orienté et encouragé tout au long de la genèse de ce mémoire.

MERCI.

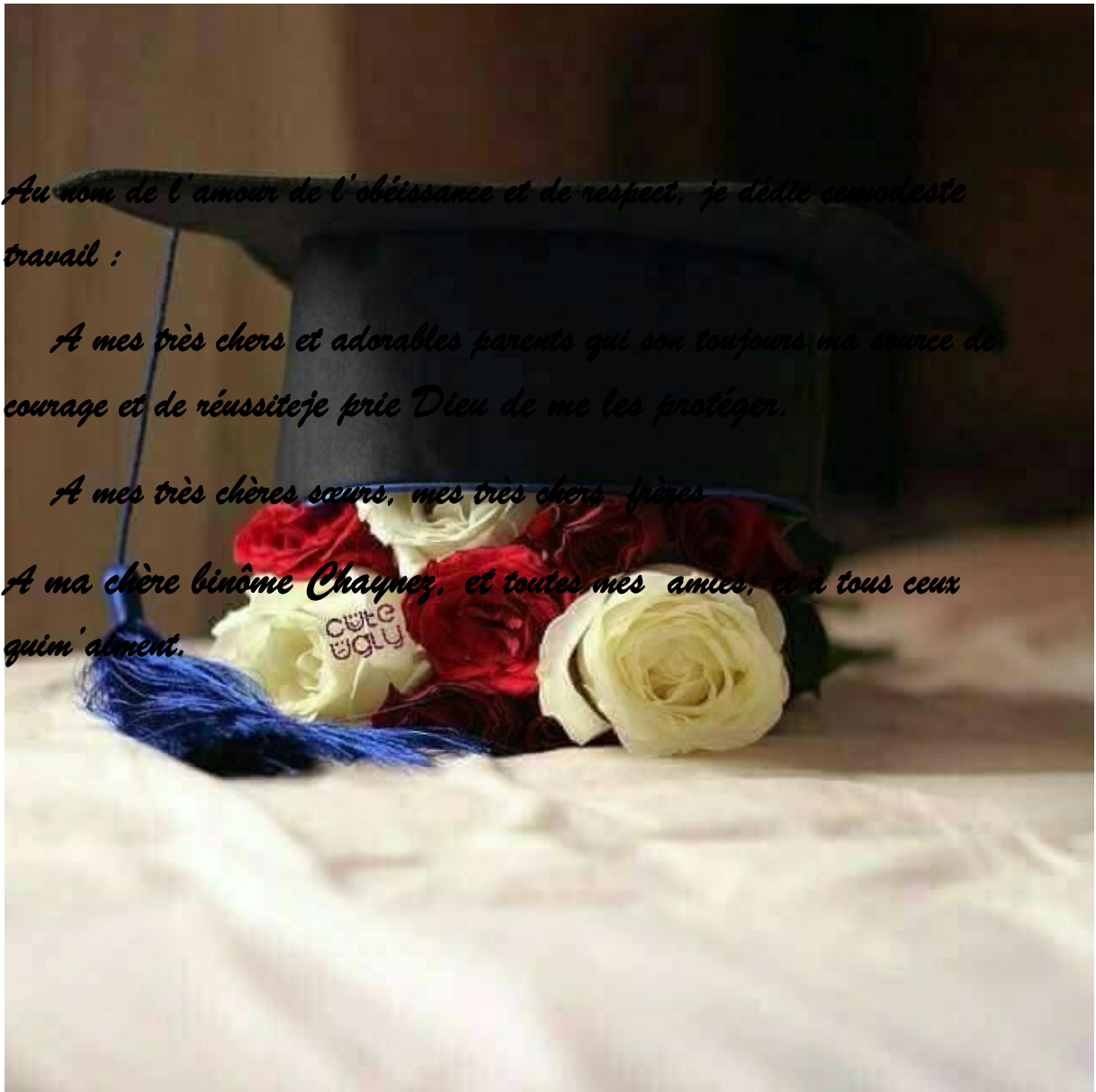
Dédicaces

Au nom de l'amour de l'obéissance et de respect, je dédie ce modeste travail :

A mes très chers et adorables parents qui son toujours ma source de courage et de réussite je prie Dieu de me les protéger.

A mes très chères sœurs, mes très chers frères

A ma chère binôme Chayneze, et toutes mes amies, et à tous ceux qui m'aiment.



H. HADJER

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

À celui qui m'a donné la vie, ma source de joie et de bonheur, celui qui m'a offert une enfance très heureuse, mais malheureusement il nous a quitté trop tôt, que Dieu L'accueille dans son vaste paradis, à toi mon chère père « AHMED » que j'adorais.

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, celle qui s'est toujours sacrifiée pour me voir réussir, maman que j'adore et je prie Dieu de me la protéger.

À mes très chers frères : Mehdi, Bilal, Hamza et mes chères sœurs : Imen et Ilhemâ qui je souhaite tout le bonheur.

À ma très chère tante Hakima, à mon adorable grand père et mes chers cousins et cousines.

À tous mes chères amies et ma chère binôme Hadjer.

R. GHAYNEZ

Liste des abréviations

AC : Activité coagulante.

AP : Activité protéolytique.

BSA : Sérum d'Albumine Bovine.

CaCl₂ : chlorure de calcium.

CMP : Caseino-Macro-Peptide.

DO : Densité Optique.

DBK : Draa Ben Kheddah.

EEB : Extrait Enzymatique Brut.

EEP : Extrait Enzymatique Purifié.

kDa : Kilo daltons.

ml : millilitre.

nm : nanomètre.

NaCl : chlorure de sodium.

PCA : plate count agar.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

PM : Poids Moléculaires.

TCA : Acide Trichloracétique.

UP : Unité Présure.

US : Unité Soxhlet.

µg : microgramme.

Figure 1 : Structure de la micelle de caséine.....	5
Figure 2 :Plan de travail expérimental.....	16
Figure 3 : Dilution et ensemencement.....	18
Figure 4 : photos réelles des souches caséolytiques.....	19
Figure 5 : Isolement de deux souches par boite de pétri.....	19
Figure 6 : photos réelles des dilutions et de d'ensemencement.....	20
Figure 7 : photo réelle de la culture en fiole.....	21
Figure 8 : Agitation des milieux de fermentation.....	21
Figure 9 : Coagulation du lait par les E.E.B.....	23
Figure 10 : l'installation l'appareil gel filtration.....	27
Figure 11 : aspect des colonies après 24h d'incubation à 30°C.....	29
Figure 12 : cellules bactériennes après coloration de Gram sous microscope optique (G x 100).....	31
Figure 13 : cellules bactériennes Observées après coloration de spore sous Microscope optique (G x 100).....	31
Figure 14 : tubes à essai montrant l'activité coagulante.....	33
Figure 15 : courbe étalon de la tyrosine.....	34
Figure 16 : courbe étalon de la BSA.....	35
Figure 17 : profil chromatographique de l'extrait enzymatique par <i>Bacillus subtilis</i> (F9) filtré sur gel séphadex G-75 Le débit des fractions est de 0,53ml/min, fraction de 1,7 ml.....	36
Figure 18 : Profil d'éluion des protéines standards.....	37

Figure 19 : Droite d'étalonnage du log des standards protéiques.....	37
Figure 20 : l'évolution de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut et l'extrait enzymatique purifié de <i>Bacillus subtilisen</i> fonction de la température de lait.....	38
Figure 21 : L'évolution de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut et purifié de <i>Bacillus subtilisen</i> fonction du pH de lait.....	39
Figure 22 : Evolution de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut et purifié de <i>Bacillus subtilisen</i> fonction de la concentration de CaCl ₂	40

Tableau 1 : la composition moyenne du lait de vache.....	3
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des caséines.....	4
Tableau 3 : Les résultats des observations macroscopiques et la largeur de la caséolyse des souches caséolytiques.....	30
Tableau 4 : critères biochimique des souches.....	32
Tableau 5 : Activité / force de coagulation des extraits enzymatiques bruts.....	33
Tableau 6 : Activité protéolytique des extraits enzymatiques bruts.....	34
Tableau 7 : Le temps de coagulation après purification.....	36
Tableau 8 : standards protéiques et leurs poids moléculaire.....	38

Sommaire

INTRODUCTION	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique

I. Le lait :

I.1. Définition	2
I.2. Caractéristiques physico-chimiques	2
I.2.1. Aspect	2
I.2.2. Constantes physiques	2
I.3. la composition du lait	2
I.3.1. Caséines	3
I.3.1.1. la micelle : composition et stabilité	4

II. Les enzymes :

II. Généralité sur les enzymes	6
II.1. Protéases	6
II.2. Les enzymes coagulant le lait	6
II.2.1. La présure	6
II.2.2.1. La chymosine	6
II.2.2.2. La pepsine	7
II.3. Préparation de la présure	7
II.4. Mécanisme d'action de la présure sur la caséine	7
II.5. les succédanés de la présure	8
II.5.1. les enzymes coagulantes d'origine animale	8
II.5.2. les enzymes coagulantes d'origine végétal	8
II.5.3. les succédanés d'origine microbienne	9
II.5.3.1. succédanés d'origine bactérienne	9
II.5.3.2. succédanés d'origine fongique	9
II.6. La chymosine produite par génie génétique	10

III. La fermentation :

III.1. Définition de fermentation	11
III.2. Types de fermentation	11
III.2.1. Fermentation sur milieu liquide	11
III.2.2. Fermentation sur milieu solide ou semi-solide	11
III.3. Critères de choix des germes et du milieu de culture	12
III.3.1. Microorganismes	12
III.3.2. Milieu de culture	12
III.4. Technologie de fermentation	12
III.4.1. Isolement	13
III.4.2. Extraction et purification des enzymes	13

VI. les *Bacillus* :

VI. Le genre <i>Bacillus</i>	14
VI.1. Les protéases de <i>Bacillus</i>	14
VI.1.1. Les protéases de <i>Bacillus subtilis</i>	14
VI.2. Intérêt industriel.....	15

Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes	16
I.1. Obtention de la souche.....	17
I.1.1. Source de prélèvement.....	17
I.2. Matériel.....	17
II. Méthodes	18
II.1. Isolement des souches.....	18
II.2. Conduite des cultures.....	19
II.2.1. Préculture.....	19
II.2.2. Culture en fiole.....	20
II.2.3. Extraction d'enzyme.....	21
II.3. Détermination des activités enzymatiques.....	22
II.3.1. Mesure de l'activité coagulante.....	22
II.3.2. Préparation du substrat de Berridge.....	23
II.3.2.1. Les constituants du substrat de Berridge.....	23
II.3.2.2. Mode opératoire.....	23
II.3.2.3. Mesure du temps de coagulation.....	23
II.4. Identification de la souche sélectionnée.....	24
II.4.1. Etude macroscopique.....	24
II.4.2. Etude microscopique.....	24
II.4.3. Test biochimique.....	24
II.5. Mesure de l'activité protéolytique.....	25
II.5.1. Préparation de l'échantillon.....	25
II.5.2. Préparation de témoin.....	25
II.6. Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	25
III. Essai de purification de l'extrait enzymatique brut	26
III.1. Caractérisation des extraits enzymatiques bruts et purifiés.....	28
III.1.1. Influence de la température du lait.....	28
III.1.2. Influence de la concentration en CaCl ₂	28
III.1.3. Influence du pH du lait.....	28

Résultats et discussion

I. choix des souches	29
I.1. Résultat de l'étude macroscopique.....	29
I.2. Résultat de l'étude microscopique.....	31
I.3. Résultat de teste biochimique.....	32

II. Résultats des activités enzymatiques	32
II.1. Activité coagulante.....	32
II.2. Activité protéolytique.....	34
II.3. Dosage des protéines de l'EEB de la souche F9.....	35
III. Essai de purification partielle de l'extrait enzymatique brut	35
III.1. Etude de l'enzyme coagulante purifié extraite de <i>Bacillus subtilis</i>	35
III.2. Détermination de point moléculaire.....	36
VI. Caractérisation des extraits enzymatiques bruts et purifiés	38
VI.1. Influence de la température du lait.....	38
VI.2. Influence du pH du lait.....	39
VI.3. Influence de la concentration en CaCl ₂	40
CONCLUSION	41

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

Introduction

Les principales étapes de la fabrication d'un fromage, sont la coagulation, l'égouttage et l'affinage. Les deux premières phases sont obligatoires, l'affinage est réservé aux seuls produits dit « maturés ».

La coagulation joue un rôle déterminant dans la technologie fromagère. Elle est réalisée en vue d'exploiter une propriété particulière des gels lactés qui est de s'égoutter spontanément. Cette évolution se traduit par la séparation progressive de la majorité de l'eau constitutive du lait sous forme de lactosérum et d'un substrat semi-solide constituant le fromage.

Bien que généralement reconnu comme aliment de grande valeur nutritive le fromage occupe une place de choix comme aliment de bonne conservation et riche en protéines, matière grasse, calcium, phosphore et autres éléments nutritifs.(J.G.DAVIS 1975).

Le processus de coagulation est provoqué par l'action d'un coagulant ajouté à un taux bien défini au lait, lui-même à une température et un pH précis ce coagulant est la présure extraite de l'estomac du jeune veau nourri au lait.

Du fait de l'augmentation de la production mondiale de fromage, la quantité de présure de veau disponible est devenue insuffisante et le besoin de coagulants de remplacement s'est fait sentir dès le début des années 1960.

De nombreux substituts ont été proposé ; d'origine animale, végétale, ou microbienne.

Cependant les enzymes d'origine microbienne présentent des avantages qui justifient leurs utilisations en industrie :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et religieuse.
- Culture rapide avec un bon rendement pouvant être augmenté par l'amélioration génétique des souches, la maîtrise et l'optimisation des conditions de fermentation.
- Techniques de production simple.

L'objectif de notre travail est donc d'isoler une souche microbienne à partir du sol à proximité de laiterie de Draà Ben Kheddah (D.B.K) et un autre sol d'une ferme de la région de Dellys capable de fournir une protéase avec une bonne activité coagulante et une faible activité protéolytique.

Pour répondre à cet objectif nous suivrons les étapes décrites ci dessous :

- Isolement et caractérisation des souches bactériennes caséolytiques.
- Extraction de la protéase et la caractérisation de l'EEB.
- Détermination de l'activité coagulante et l'activité protéolytique.
- Essai de purification de l'extrait enzymatique brut par chromatographie d'exclusion moléculaire.
- Caractérisation de l'extrait enzymatique brut et purifié.

I. Le lait :

I-1-Définition :

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères comme la vache, la chèvre et la brebis , destiné à l'alimentation du jeune animal naissant. Du point de vue physicochimique, le lait est un produit très complexe. Une connaissance approfondie de sa composition de sa structure et de ses propriétés physiques est indispensable à la compréhension des transformations du lait et des produits obtenus lors des différents traitements industriels. (Amiot et al.,2002).

I.2.Caractéristiques physico-chimiques :

I.2.1.Aspect :

Le lait est un liquide blanc, opaque, d'une odeur peu prononcée, d'un gout légèrement sucré, d'une saveur douceâtre, mais sa teinte peut aller du blanc mat au jaune crémeux, suivant sa richesse en matière grasse, suivant l'espèce de l'animal et l'alimentation de celui-ci...etc. (ALAIS , 1984).

I.2.2.Constantes physiques :

Le lait est un liquide complexe, altérable et de composition variable ; ses principales caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes (ALAIS, 1974) :

- Densité à 15°C : 1,032.
- Viscosité absolue à 15°C.
- pH : 6,5 à 6,6.
- Point de congélation : -0,55°C.
- Acidité en degré Dornic : 16 à 18. (1 D° = 0,1 g d'acide lactique/litre).

I.3.la composition du lait :

La composition chimique du lait et ses caractéristiques technologiques varient sous l'effet d'un grand nombre de facteurs.

Ces principaux facteurs de variation sont bien connus, ils sont liés soit à l'animal (facteurs génétiques, stade de lactation, état sanitaire ...) soit au milieu et à la conduite d'élevage (saison, climat, alimentation). En outre quel que soit l'origine du lait, il renferme toujours les mêmes éléments.

Tableau 1 : la composition moyenne du lait de vache. (Alais et al., 1984).

Elément	Composition (g/l)	Etat physique des composants
Eau	905	Eau libre (solvant) plus Eau liée
Glucides	49	solution
Lipides :	35	Emulsion des
Matière grasse :	34	globules gras (3 à 5
➤ Lécithine (phospholipide)	0,5	microns)
➤ Partie insaponifiable (stérol, carotène)	0,5	
Matières azotées :	34	Suspension
➤ Caséines	27	micellaires de
➤ Protéines solubles (globulines, albumines)	5,5	phosphocaséinates de
➤ Substances azotées non protéiques	1,5	calcuim (0,8 à 0,12 microns)
Sels	9	Solution en état colloïdale
Constituants divers (vitamine, enzymes, gaz dissous)	Traces	

I.3.1. Caséines :

La caséine est un complexe protéique phosphoré à caractère acide qui précipite dans le lait à pH 4,6. Il s'agit d'une substance hétérogène même si elle a été longtemps considérée comme une protéine pure et homogène en raison de la constance de sa composition élémentaire (CAYOT P, LORIENT D, 1998).

Selon leur mobilité électrophorétique décroissante, on distingue trois fractions : alpha, bêta et gamma. La fraction alpha est elle-même subdivisée en caséine alpha S et Kappa-caséine. (CHEFTEL et CHEFTEL, 1980).

Les 4 caséines du lait (α_1 , α_2 , β , k) se distinguent les unes des autres par leurs composition en acides aminés et par voie de conséquence par leurs propriétés physico-chimique.

Tableau 2: Caractéristiques physico-chimiques des caséines(Schmidt, 1982 ; Swaisgood, 1982 ; Walstra&Jenness, 1984 in Mahaut et *al*,2003).

	αS_1	αS_2	β	k
Masse moléculaire(Da)	23 614	25 230	23 983	19 023
Résidus d'acides aminés (nombre)	199	207	209	169
Résidus cystéines (nombre)		2		2
Groupements phosphoryls	8-9	10-13	5	1-2
Glucides (g.100⁻¹g de caséine)				5
Hydrophobicité (KJ/résidu)	4,9	4,7	5,6	5,1
Charge à PH 6,6	-20,9	-14,8	-12,3	-3,0
Sensibilité à la chymosine	+		+	+++
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-

I.3.1.1.la micelle : composition et stabilité :

Les caséines se présentent dans le lait sous forme d'un complexe organique et minéral : la micelle ; Particule sphérique d'environ 180 nm constituée de submicelles de 8 à 20 nm, elle est très hydratée (2 à 4 g d'eau par g de protéine) et 7% environ de son extrait sec est composé de sels (phosphate, calcium, magnésium, citrate dans l'espace inter submicellaire).(**LENOIR J,1985**).

Les submicelles pourraient être constituées d'environ 10 molécules des 4 caséines en proportion variable avec une répartition de caséine k (hydrophile) en surface ; les submicelles les plus riches en caséine k sont situées en surface de la micelle, ce qui la stabilise. Les portions C-terminales de la caséine k hérissent la micelle et l'enveloppent d'une chevelure périphérique particulièrement hydrophile (**CAYOT P, LORIENT D,1998**).

Les micelles de caséine, compte tenu de leurs dimensions, présentent une grande stabilité. Elles supportent une longue conservation et des traitements thermiques ou mécaniques relativement sévères (**G.BRULLE et J.LENOIR,1990**)

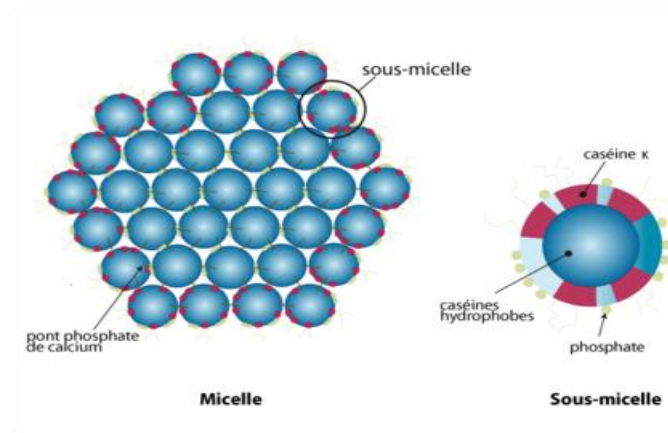


Figure 1 : Structure de la micelle de caséine (Amiot,et al., 2002).

II. Généralités sur les enzymes :

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100KDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants ou elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (**Bergmeyer et al ,1997 ; Pelmont, 1995, Drouin, 2005**).

En 2005 , plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (**Patel et al ; 2005**) ; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (**Leisola et al ;2001**) .

Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations couts-efficacité des procédés (**SANDHYA et al., 2005**).

II.1.Protéases :

Les protéases sont des enzymes qui dégradent les protéines ,ils sont variées et ont des rôles biologiques bien différents. Leurs structures sont donc elles aussi très variées. Toutefois, elles possèdent toutes, comme les enzymes en général, un site actif qui assure l'activité d'hydrolyse des liaisons peptidiques, et un site de reconnaissance du substrat pour n'agir que sur la protéine cible.

II.2. Les enzymes coagulant le lait :

II.2.1.La présure :

La dénomination présure est donnée à l'extrait coagulant provenant de caillettes (quatrième poche de l'estomac) de jeunes ruminants (des veaux) abattus avant sevrage (**ANDER ,2002**).Elle contient de la chymosine(80%) et de la pepsine(20%).La chymosine l'enzyme dominante est activée au pH de lait (6,2-6,6) ; sa sécrétion s'arrête au moment du sevrage , alors que la pepsine s'accroît et devient dominante (**ALAIS,1974 ;ERESTROM et WONGT,1983**).

II.2.2.1. La chymosine :

La chymosine est une enzyme protéolytique, elle a une double activité : une activité spécifique sur la caséine qui conduit à la déstabilisation micellaire au cours de la phase de coagulation et une activité faible de protéolyse générale qui pourrait se manifester sur toutes les protéines pendant l'affinage du fromage.

La stabilité de la chymosine est maximale à pH = 5 et 6 ; son activité est optimale à pH voisin de 5 ; elle est inactivée à pH = 7,5 et dénaturée à pH = 8 ; sa température optimale d'action est voisine de 40°C (**RAMET, 1997**). L'inactivation thermique a lieu à 60°C, elle est totale à 61°C (**SCRIBAN, 1993**).

II.2.2.2. La pepsine :

C'est une protéase acide de 35 Kda , constituée de trois fractions :A ,B et C ,son activité est la plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 ; elle dénaturée à 55°C. (SCRIBAN, 1999).

II.3. Préparation de la présure:

La présure est extraite à partir du quatrième estomac des veaux non sevrés. Les tissus sont découpés, et mis à tremper en solution acide pour activer l'enzyme. Ensuite, le pH est ajusté à 5,5 - 6, correspondant à la stabilité optimale. Après filtration, la solution est additionnée de chlorure de sodium pour prévenir les développements microbiens. Compte tenu de l'expansion de l'industrie fromagère et de la raréfaction des jeunes veaux, les producteurs de présure sont amenés à utiliser des estomacs d'animaux plus âgés. L'extraction consiste en la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires, nécessitant donc un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire, par des procédés mécaniques, physiques ou chimiques.

II.4. Mécanisme d'action de la présure sur la caséine :

Il y a deux phases dans la coagulation présure, une phase primaire purement enzymatique et une phase secondaire correspondant à la formation d'un gel qui ne peut avoir lieu qu'après la phase primaire en présence de calcium ionisé et des températures >15°C et des pH compris entre 6,2 et 6,6 (TARODO et al, 1999).

- **Phase de protéolyse spécifique :** La présure coupe la caséine κ qui porte les charges négatives et le caractère hydrophile. La chymosine, hydrolyse la liaison Phe105-Met106 (Lenoir et Veisseyre, 1987). On obtient alors deux segments : le CMP (Caseino-Macro-Peptide) hydrophile et soluble et acide, diffusé à l'extérieur de la micelle de caséines et qui est éliminé dans le lactosérum; ainsi que le PCK (Para-Caséine-Kapa) hydrophobe, qui reste à l'intérieur. La rapidité du déroulement dépend du pH et de la température. (LENOIR et al 1985 ; MIETTON et al 1994 ; TARODO et al 1999) .

- **Phase de protéolyse générale** Les CMP vont pouvoir se rapprocher par interactions hydrophobes, puis créer des liaisons fortes : liaisons covalentes ou ioniques. Le fractionnement du phosphocasinat laisse des liaisons libres qui peuvent être occupées par le calcium ionisé (cation bivalent) qui va former des ponts calciques; on pense possible la formation de ponts disulfures. C'est une réaction irréversible qui produit un gel souple: c'est le caillé présure. La vitesse de formation du coagulum ainsi que de son durcissement augmente avec la température. Elle est très faible à 15°C et très forte à 55°C, l'agrégation démarre lorsque 85 à 90% de la caséine κ est hydrolysée (GREEN et al, 1978 ; DALGLEISH, 1979 ; CHAPLIN et GREEN, 1980)

II.5. Succédanés de la présure :

Pour des raisons économiques et religieuses, de nombreuses recherches ont été entreprises afin de substituer la présure par des succédanés efficaces et compétitifs utilisables industriellement.

Parmi les voies de substitution de la présure, la production d'enzymes coagulants le lait à partir de sous-produits végétaux (CORDEIRO et al., 1992) et surtout à partir de la culture microbienne, suscite un intérêt pour la fromagerie locale et dans le monde où plusieurs souches de microorganismes font l'objet de productions industrielles de protéases coagulantes, *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Endothiaparasitica*, *Irpexlacteus*, *Aspergillus niger*, *KluyveromyceslactisetEscherichia coli* (CHANNE et SHEWALE, 1998).

II.5.1. Les enzymes coagulantes d'origine animale :

La Présure animale est la présure traditionnelle utilisée pour faire du fromage est la plus connue, voici d'autres enzymes d'origine animale qui peuvent être utilisées pour faire coaguler le lait :

- La pepsine bovine :
- La pepsine d'origine avicole :
- Pepsine d'origine pro-ventricule de dinde
- Pepsine de la muqueuse gastrique du phoque
- Pepsine de *l'estomac du poisson*

II.5.2. Les enzymes coagulantes d'origine végétale :

Beaucoup de végétaux contiennent un suc présurant en particulier dans les organes verts (jeunes tiges, bourgeons, feuilles) et dans les fleurs. Ces plantes s'utilisent principalement fraîches. Elles agissent surtout à des températures élevées (environ 60 à 90°C).

La coagulation réussit en général mieux dans le lait bouilli que dans le lait cru. Parmi les plantes qui peuvent servir au caillage du lait on peut citer :

- La chardonnette
- Le figuier
- Le gingembre,
- La luzerne,
- La garance,
- Le papayer (extrait coagulant du papayer : la papaïne),
- l'ananas (extrait coagulant de l'ananas : la bromélaïne).

II.5.3. Les succédanés d'origine microbienne :

II.5.3. 1. Les succédanés d'origine bactérienne :

Des études ont permis de mettre en évidence les potentialités de certaines bactéries à produire des coagulases. Ce sont les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* qui ont été plus particulièrement explorés (GREEN, 1977).

Il a été noté que ces enzymes présentaient une activité protéolytique trop élevée par comparaison à la présure dans les mêmes conditions.

Leur aptitude à la coagulation est meilleure que celle d'origine végétale et moins bonne que celle des enzymes produites par les moisissures. Les caillés obtenus manquent de cohésion du fait d'une trop forte activité protéolytique par comparaison à la présure animale (ALAIS, 1984 ; MAHON et BROWN, 1985).

En Algérie, (MATOUB, 2000) a mis en évidence la possibilité d'obtenir une coagulase à partir d'une souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc₃₃), et une autre à partir d'une souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée S₃ (CHEMLAL, 1998).

Mais leur utilisation n'a pas dépassé le stade expérimental en raison de leur prix de revient et de la réglementation stricte.

II.5.3. 2. Les succédanés d'origine fongique :

Les enzymes d'origine fongique permettent de bons résultats. Des préparations à base de trois genres de moisissures : *Endothia parasitica* (E.p.), *Mucor pusillus* (M.p.), *Mucor miehei* (M.m.) sont commercialisées sur le marché international et utilisées plus au moins à grande échelle selon les pays :

Endothia parasitica : c'est une moisissure parasite du châtaignier, la préparation enzymatique est produite par la firme américaine PFIZER et commercialisée sous le nom de Sufaren.

Mucor miehei : moisissure banale du sol, les préparations enzymatiques sont produites par :

- Une firme française RAPIDASE sous la dénomination fromase
- Une firme danoise NOVO INDUSTRIE sous le nom de Rennilase
- Une firme américaine MILES sous l'appellation de Marzyme
- Une firme danoise BOLL HANSEN sous le nom de Hamnilase.

- ***Mucor pusillus*** : moisissure banale du sol, exploitée par la firme japonaise METTOSANGYO. La préparation enzymatique est commercialisée par Noury sous la dénomination de Noury – Renn

Les conditions d'emploi de ces préparations fongiques en fromagerie (selon la circulaire ministérielle du 20/01/1981 et l'arrêté du 05/09/89 ; J. O. du premier octobre 1989) 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 contrôlée sont obligatoirement coagulés par la présure.

II.6. Lachymosine produite par génie génétique :

Les méthodes modernes du génie génétique ont été récemment appliquées à la production de chymosine par des micro-organismes clonés par le gène induisant l'expression de la prochymosine.

Actuellement, plusieurs préparations commerciales sont disponibles sur le marché (**Eck & Gillis, 1997**), citons :

- Kluyveromyceslactis : à partir de laquelle la firme GistBrocardesn.v(NL) produit et commercialise la préparation Maxiren.
- Kluyveromyceslactis : à partir de laquelle la firme Pfizer Inc(USA) produit et commercialise la préparation Chymax.
- Aspergillus awamori : à partir de laquelle la firme Ch.HansenLab(DK) produit et commercialise la préparation Chymogen (utilisé en Algérie).

L'analyse biochimique montre une identité absolue entre les isomères de la chymosine naturelle (isomère A, B, C) et celles produites par les micro-organismes recombinés.

L'activité protéolytique mesurée sur les différentes fractions de la caséine est également rigoureusement la même.

III. La fermentation :

III.1. Définition de la fermentation :

Les fermentations sont des voies cataboliques anaérobies au cours desquelles des composés organiques servent à la fois de donneurs et de récepteurs d'électrons, la synthèse, d'ATP étant réalisée par phosphorylation au niveau du substrat. En microbiologie industrielle. Le terme de fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de microorganismes. (PASCAL et al., 2004).

III.2. Types de fermentation :

III.2.1. Fermentation sur milieu liquide

Cette technique a été la première utilisée. Elle consiste à cultiver les moisissures sur la surface d'un milieu nutritif liquide, elle nécessite des conditions aseptiques strictes. La culture en milieu liquide d'effectuer dans des récipients agités, et le plus souvent dans des erlenmeyers, placés sur l'appareil d'agitation qui favorisent la diffusion de l'air à travers les tampons de coton servant à les boucher. (SIMON ET MEUNIER, 1970).

III.2.2. La fermentation solide ou semi-solide :

La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. Et en anglais : solide-state fermentation ou SSF) est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (RAHARDJO et al., 2006). De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse

prise au piège dans les particules ou entre celle-ci. (RAHARDJO et al., 2006) expliquent la diffusion des moisissures filamenteuses dans le substrat solide humide. Selon le substrat considéré, l'apparition d'eau libre se manifeste pour des teneurs en eau comprises entre 12 et 90%, soit 0,65 et 0,98 d'activité d'eau (aw). (GERVAIS et al., 2003).

III.3. Critères de choix des germes et de milieu de culture :

III.3.1. Microorganismes :

Les germes sont choisis en fonction des critères suivants :

- croissance rapide sur un substrat peu coûteux, en fournissant des quantités importantes de corps microbiens et ceci de façon constante.
- fourniture de quantité abondante d'enzyme.
- obtention des transformations recherchées d'une manière simple et rapide avec un rendement élevé et en utilisant le minimum d'énergie.
- conservation des souches.
- élaboration de produits faciles à isoler (Simon & Meunier ;1970)

III.3.2. Milieu de culture :

Un milieu de culture choisi pour favoriser la croissance d'un micro-organisme n'est pas nécessairement celui qui offre un rendement élevé de production enzymatique. Le meilleur milieu de culture est celui qui assure la meilleure production dans le plus court délai et dont le prix de revient est réduit.

La composition du milieu varie avec les micro-organismes utilisés, la préparation et la stérilisation.

Dans la microbiologie industrielle, chaque micro-organisme possède des exigences physiques et nutritionnelles particulières.

On peut indiquer qu'un milieu de culture généralement doit contenir une source d'azote, une source de carbone, des éléments minéraux et souvent certains produits naturels.

- Le glucose, le saccharose et parfois le lactose et le glycérol ainsi que certains produits naturels, comme cellulose, constituant les principales sources d'énergie.
- Les hydrolysats de protéines végétales ou animales, les peptones et extraits de viande avec les sels azotés minéraux comme les sels d'ammonium, fournissant l'azote nécessaire aux micro-organismes.

III.4. Technologie de fermentation :

Les fermenteurs utilisés habituellement atteignent des volumes de 100 à 200 m³. Ils doivent être équipés par un système d'agitation de puissance importante, capable d'agiter des milieux relativement visqueux.

Les fermenteurs sont également équipés d'une couronne d'aération classique, la plupart des fermentations productrices d'enzymes présentent une forte demande en oxygène (Aunstrup et al ; 1979).

Des équipements de mesure et de contrôle sur le fermenteur permettant de suivre et de réguler les paramètres de la culture. Généralement les contrôles s'exercent sur la température, le pH, l'oxygène dissous, les mousses et l'évolution de la concentration en certains nutriments. De plus, la mesure de l'apparition de l'activité enzymatique est effectuée à intervalles réguliers par le laboratoire de contrôle (Sicart, 1980).

Des conditions aseptiques sont nécessaires en production d'enzymes, pour obtenir un bon rendement d'un part, et pour ne pas risquer la sécrétion de substances toxiques par contamination d'autre part.

Donc des précautions sont nécessaires au niveau de la construction du fermenteur, du choix des installations et des équipements périphériques. Pendant toute la durée de la fermentation, une légère surpression d'air dans le fermenteur empêche les contaminants d'y pénétrer et des gardes de vapeurs, à chaque point de communication avec l'extérieur, renforcent cette précaution (SCRIBAN, 1988).

III.4.1. L'isolement :

L'isolement est une technique qui permet de séparer les bactéries d'un échantillon. L'isolement permet d'obtenir des colonies différentes, espacées les unes des autres. On cherche à isoler les différentes cellules de l'échantillon, chaque cellule isolée étant alors potentiellement susceptible de conduire à une colonie (mais parfois on obtiendra des colonies mixtes difficilement résolubles ...). L'isolement permet d'observer les colonies. Pour ce faire, on utilise une anse de platine. Cet instrument est stérilisé entre chaque utilisation.

III.4.2..Extraction et purification des enzymes :

La fermentation terminée, les enzymes doivent être séparés des cellules et du milieu, et traités de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités. Ces traitements sont des opérations unitaires simples telles que centrifugation, filtration, évaporation, précipitation, séchage,....

Les préparations enzymatiques sont commercialisées sous différentes : liquide, poudre, concentré, lyophilisée, immobilisée (SCRIBAN, 1988).

Parmi les bactéries le genre *Bacillus* a été le plus étudié car il produit une enzyme coagulant le lait.

VI. Le genre *Bacillus*:

Le genre *Bacillus* englobe des bactéries à Gram positif en forme de bâtonnets droits, ils font partie de la flore banale contaminant de nombreux produits alimentaires, généralement mobile grâce à des cils périt riches. Les cultures âgées peuvent apparaître gram négatif mais la majorité des espèces ont une catalase positive ou anaérobie facultative, très répandue dans la nature surtout dans le sol et souvent protéolytique.

Le genre de *Bacillus* est classiquement subdivisé en fonction de la morphologie et de la position de la spore en trois groupes:

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

VI.1. Les protéases de *Bacillus*:

Les protéases de *Bacillus* sont des enzymes sécrétées dans le milieu extra-cellulaire. Elles sont parmi les enzymes les plus anciennement connues et sécrétées par la plupart des espèces de *Bacillus* telles que : *Bacillus megaterium* et ***Bacillus subtilis*** (SASTRY et MATHUR, 1979).

VI.1.1. Les protéases de *Bacillus subtilis* :

Parmi les enzymes de remplacement de la présure les plus étudiés celles issues du genre *Bacillus subtilis*, malgré les résultats décevants, lors des tests de fabrication de fromage qui s'expliquent par leur forte activité protéolytique. Certains auteurs affirment la possibilité d'apporter des corrections pour l'utilisation de ces coagulases en fromagerie.

Des travaux de **PUHAN et al, (1973)** ont confirmés qu'une acidification préalable du lait avant l'ajout de l'enzyme peut remédier la consistance molle, la perte de protéines et de matière grasse dans le lactosérum ainsi que l'amertume dans le produit fini.

EL MAYDA (1981) a constaté que dans les fromages préparés à partir de lait ultra-filtré, l'emploi des protéases neutres de *Bacillus subtilis* devait se faire à faible concentration pour une solubilisation importante des fractions protéiques et pour prévenir l'apparition possible d'une amertume.

Néanmoins, lorsque la protéase était employée conjointement à la présure et à faibles concentrations, elle permettait de fabriquer du fromage de bonne qualité sans rencontrer les défauts précités.

VI.2.Intérêt industriel:

Le développement considérable qu'a connu le genre *Bacillus* dans le domaine de la production d'enzymes industrielles revient aux caractéristiques intéressantes que présente ce groupe. D'une part, ces micro-organismes se cultivent facilement et d'autres parts ils excrètent à l'intérieur des cellules une quantité importante de leurs protéines enzymatiques. Il présente des enzymes exo cellulaires qui appartiennent à la famille des hydrolases. Cette famille a connu le plus large développement pour les applications industrielles (amylases, protéases) (**SCHIFF, 1992**).

I. Matériel et méthodes

Notre travail expérimental consiste à la production d'une protéase coagulant le lait à partir d'une souche bactérienne isolée à partir d'un sol de proximité (D.B.K et F.L.D) selon les étapes suivantes :

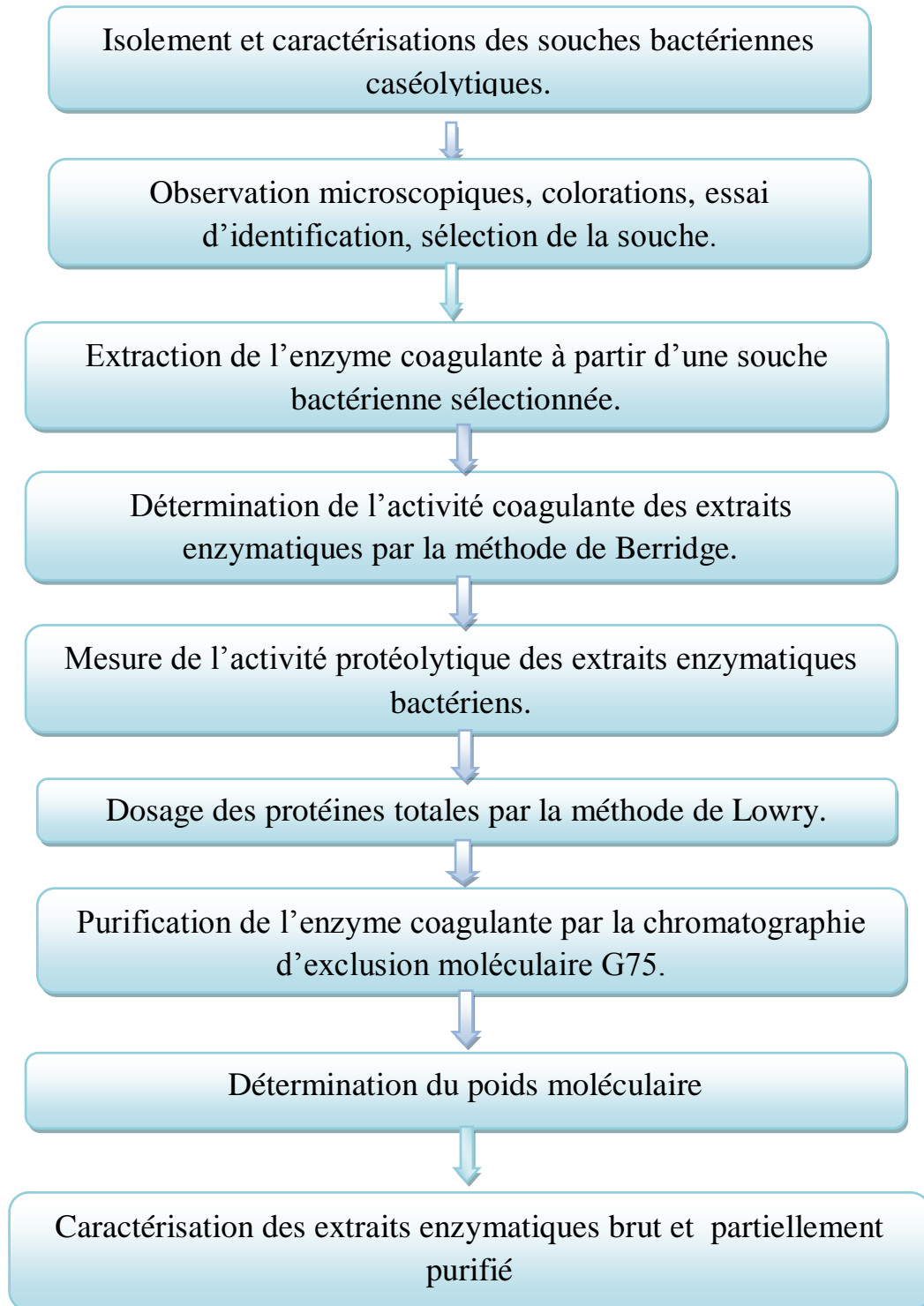


Figure 2 : Plan de travail expérimental

I.1. Obtention de la souche

I.1.1. Source de prélèvement

Nous avons prélevé deux échantillons du sol l'un c'est à partir d'une terre d'une ferme dans la région de Dellys (48 Km Est de Boumerdes), et l'autre de la terre à proximité de la laiterie de Draa ben Kedah (DBK).

I.2. Matériel :

- **Appareillage :**

- ❖ Autoclave ; « TRADE RAYPA ; STEAM STERILIZER ».
- ❖ Agitateur magnétique et Plaques chauffantes ; « Hot & stinner Medline Scientific limited MS 300 ».
- ❖ Bain-marie ; « MEMERT ».
- ❖ Balance ; « SARTORIUS ».
- ❖ Centrifugeuse ; « HERMLE / Z – 323 K ».
- ❖ Etuve ; « MEMERT ».
- ❖ Microscope optique ; « KRUSS ».
- ❖ PH mètre ; « HANNA pH 211 ».
- ❖ Réfrigérateur et congélateur ;
- ❖ Spectrophotomètre ; « MEMERT ».

- **Verrerie :**

- ❖ Pipettes en verre (pipette de 1-5ml à écoulement) ;
- ❖ Fioles jaugées à 1 trait (volume de 50, 100, 250, 500, 1000 ml) ;
- ❖ Eprouvettes graduées à pied (10-100 ml) ;
- ❖ Bêchers ;
- ❖ Fiole conique d'erenmeyer ;
- ❖ Entonnoir ;
- ❖ Pipettes pasteur ;
- ❖ Lames ;
- ❖ Tubes à essai ;

- **Petit matériel :**

- ❖ Boîtes de Pétri ;
- ❖ Anse de platine ;
- ❖ Bande à gaz ;
- ❖ Papier filtre ;
- ❖ Thermomètre ;
- ❖ Bec bunsen ;
- ❖ Chronomètre ;

- ❖ Portoir de tubes ;
- ❖ Micropipette ;
- ❖ Pissette en plastique ;
- ❖ Vortex ; « VELP SCIENTIFICA Z x 3 ».

II. Méthodes :

II.1. Isolement des souches (Davet P, Rouxel F 1997) :

10g de chaque sol tamisé sont mis dans 100 ml d'eau physiologique on obtient 10^{-1} . Après agitation pendant 20 min, des dilutions décimales de 10^{-2} jusqu'à 10^{-9} sont réalisées. 0,1 ml de chaque dilution est ensemencé en surface sur milieu solide : milieu PCA additionné de lait écrémé stérile de 10% et d'actidione de 2%. (voir ANNEXE 1)



Figure 3 : dilutions et ensemencement.

Après incubation nous avons sélectionné les souches présentant une caséolyse autour de la colonie (un halo clair) ,ensuite on a fait plusieurs prélèvements des souches caséolytiques puis purifiées par isolements jusqu'à l'obtention d'une souche pure, leur pouvoir caséolytique a été vérifié sur milieu P.C.A additionné de lait (1 ml de lait écrémé stérile pour 15 ml de milieu P.C.A) après incubation (30°C/48h) ,la présence d'un halo clair caractérise le pouvoir caséolytique, le diamètre de la zone d'hydrolyse est mesuré.

Le McFarland est utilisé comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes de sorte que le nombre de bactéries soient dans une plage donnée.

Avant de procéder à la culture en fiole ,on réalise des dilutions décimales de 10^{-2} a 10^{-9} afin de pouvoir connaître le nombre de colonies bactériennes à ensemercer dans le milieu de culture. On prend 1 ml de chaque dilution et les ensemercer dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PCA , les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h .

Puis les colonies sont comptées ce qui nous donne le nombre de bactéries par millilitre contenues dans l'inoculum puis cet inoculum est comparé par McFarland 4.

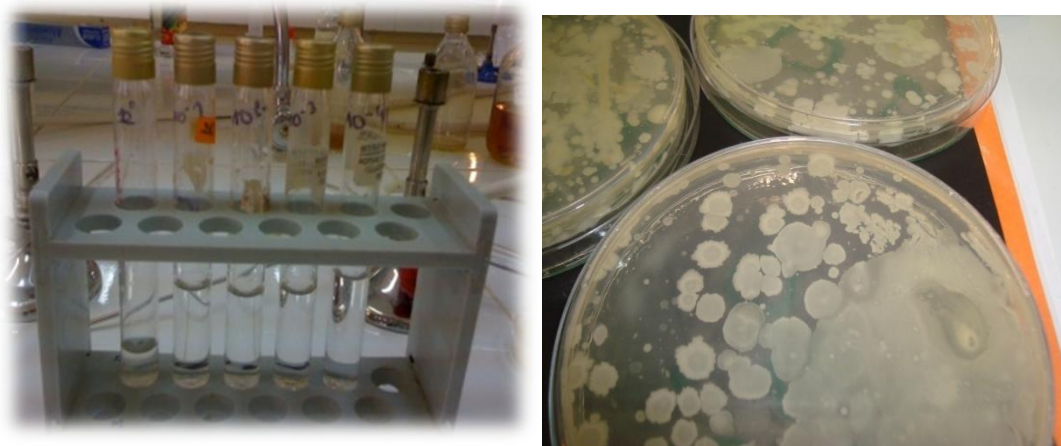


Figure 6:photos réelles des dilutions et de d'ensemencement.

II.2.2.Culture en fiole :

Nous avons préparé un milieu de culture solide selon (**Levadoux1989**) à base de son de blé (30g) ,dulait écrémé (2,5g) ainsi que 70ml de sulfate d'ammonium à 0,01% (70 ml). Nous avons préparé plusieurs erlenmeyer (un par erlenmeyer souche caséolytiqueisolé).les erlenmeyer sont fermés avec du coton cardé puis recouvert d'aluminium, le milieu est ensuite stérilisé 15 min à 120°C .

Après refroidissement on inocule le milieu à raison de 2 ml par erlenmeyer, on incube à 30°C pendant 24 heures.



Figure 7:photo réelle de la culture en fiole

II.3. Extraction d'enzyme:

Toutes les sécrétions exocellulaires du micro-organisme se trouvent au niveau du milieu de culture.

L'extraction de l'enzyme est réalisée par l'addition de 70 ml d'eau distillée stérile dans chaque erlenmeyer. Suivie d'une agitation lente pendant 30 minutes, puis on filtre sur une bande à gaz entreposée sur un entonnoir. Le filtrat est soumis à une centrifugation à 5000 tr/min pendant 20 minutes à 4°C, le surnageant est appelé extrait enzymatique brut (EEB).



Figure 8 : Agitation des milieux de fermentation.

II.3. Détermination des activités enzymatiques:

II.3.1. Mesure de l'activité coagulante :

Nous avons cherché l'activité coagulante de toutes les souches caséolytiques isolées qui sont représentées dans le tableau 5.

L'activité coagulante est déterminée selon la méthode de BERRIDGE (1955). 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'évaluation de cette mesure est fixée dans les conditions standards suivantes :

- Volume de la solution enzymatique : 1ml
- Volume de lait à coaguler : 10ml
- Température du lait : 35°C
- pH du lait : 6,4

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

$$UP = \frac{10 \times V}{Tc \times Q}$$

- **UP** : Unité présure
- **V** : Volume de substrat standard utilisé (ml)
- **Tc** : Temps de coagulation (secondes)
- **Q** : Volume extrait coagulant (ml)

L'activité coagulante peut être également exprimée en force coagulante de Soxhlet décrite par TSOULI (1979). Cette force coagulante définit le volume de lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique ou d'une enzyme, en 40 mn, à 35°C et pH 6,4 .

La force coagulante est exprimée par :

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

- **F** : Force de l'enzyme
- **V** : Volume du lait ajusté (pH :6,4 , T° :35°C)
- **v** : Volume de la solution enzymatique
- **T** : Temps de coagulation du lait(en secondes).

II.3.2. Préparation du substrat de Berridge :

II.3.2.1. Les constituants du substrat de Berridge :

a)-Le lait en poudre :

Le lait en poudre utilisé est de type LOW-HEAT écrémé fournie par la L.F.B.C'est une poudre n'ayant subi qu'un chauffage faible qui entraîne un respect de l'état physico-chimique de protéines solubles du sérum, elle est conservé dans des sachets en plastique à +4°C.

b)-Solution de CaCl_2 :

La solution de CaCl_2 de qualité anhydre utilisée à une concentration de 0,01M.

II.3.2.2. Mode opératoire :

Une quantité de 12 g de lait en poudre écrémé est dissoute dans 100 ml de solution de chlorure de calcium (CaCl_2) à 0,01M sous agitation douce pendant 30 minutes en évitant une agitation trop violente susceptible de produire une mousse. Le pH du lait ainsi préparé est 6,4.

Le lait ainsi reconstitué, est maintenu pendant 30 minutes au bain marie réglé à 35°C pour sa stabilisation. Le substrat est prêt pour l'emploi.

II.3.2.3. Mesure du temps de coagulation :

Un volume de 10ml de substrat est introduit dans un tube à essai auquel on ajoute 1ml d'extrait enzymatique est incubé à 35°C.

La rotation du tube émergé permet la formation d'un film sur la paroi. Le temps de prise correspond à la période qui sépare le moment de l'emprésurage et l'apparition des premiers flocons de caséine adhérents à la paroi des tubes légèrement inclinés. Quant au temps de coagulation correspond à la période séparant le moment de l'emprésurage et le temps ou le caillé est complet (séparation entre le coagulum et le lactosérum).

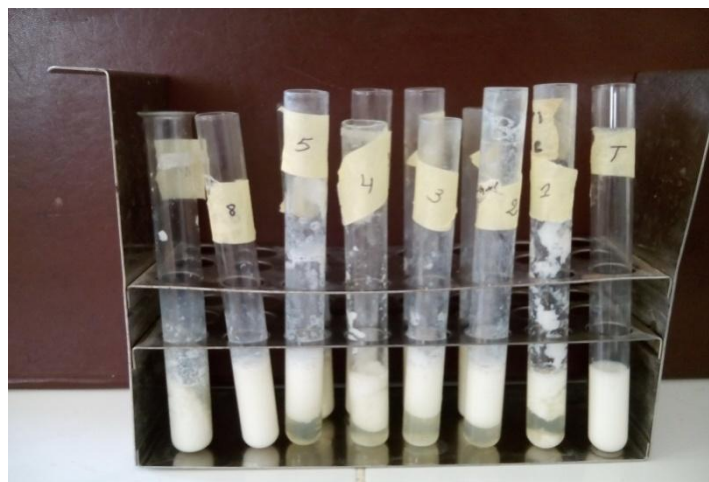


Figure 9: Coagulation du lait par les E.E.B.

A ce niveau nous sélectionnons uniquement les souches caséolytiques qui possèdent une activité coagulante.

II.4. Identification de souches sélectionnées :

II.4.1. Etude macroscopique :

Se résume-en :

La forme des colonies, la surface, l'opacité, le contour, consistance, etc...

II.4.2. Etude microscopique :

Coloration de Gram : C'est une coloration différentielle permet de diviser les bactéries en deux groupes : Gram+ (bien colorées en violet) et Gram- (colorées en rose).. (voir ANNEXE 4).

Coloration des spores : C'est une coloration au bleu de méthylène (ou vert de malachite), après observation microscopique, les cellules doivent être colorées en bleu sauf les spores elles se présentent sous forme de petites granulations très réfringentes, sphériques ou ovoïdes, libres ou incluses dans les bactéries.(voir ANNEXE5)

II.4.3. Tests biochimiques (souches sélectionnés) :

- **Milieu mannitol-mobilité :**
 - **Principe :** Ce milieu permet d'étudier simultanément la dégradation du mannitol et la mobilité.
 - **Technique :** Ensemencer le milieu par pique centrale à l'aide d'une anse à fil droit avec les souches bactériennes, Incuber à 37°C pendant 24 h.
 - **Lecture :** si la souche est mobile, elle envahit le milieu en diffusant vers la périphérie, si la souche utilise le mannitol le milieu vire au jaune.

- **Milieu citrate de Simmons :**
 - **Principe :** Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone qui est le citrate, une bactérie citrate positive utilise le citrate en provoquant de l'alcalinisation du milieu (virage au bleu de l'indicateur de pH).
 - **Technique :** Ensemencer le milieu par des stries sur la pente à partir d'une suspension bactérienne.
 - **Lecture :** virage du milieu au bleu, ceci se traduit par l'utilisation du substrat comme source de carbone : Citrate (+).
Pas de virage : Citrate (-).

- **Hydrolyse de la caséine :**

- **Principe :** l'hydrolyse de la caséine est étudiée sur milieu gélose au lait.
- **Technique :** ensemencer le milieu en points ou par touche centrale.
- **Lecture :** l'hydrolyse de la caséine se traduit par une zone de clarification entourant la colonie.

II.5. Mesure de l'activité protéolytique :

L'activité protéolytique est mesurée selon la méthode de (M.A.Murado et al 1993) modifiée. Cette mesure permet d'évaluer le taux de dégradation du substrat (caséine) par l'enzyme pendant la réaction primaire. Pour cela, on mesure la concentration en produits d'hydrolyse de la caséine, soluble dans l'acide trichloracétique (TCA) à 5%.

L'addition de TCA dans le milieu réactionnel arrête la réaction, et une filtration permet de séparer le précipité de caséine et le produit d'hydrolyse soluble. Le dosage de l'hydrolysate est effectué selon la méthode de (LOWRY et al, 1951).

Les résultats s'expriment en termes de concentration de tyrosine ($\mu\text{g/ml}$) d'extrait enzymatique (FEDERICI, 1982), par référence à une courbe étalon établie à partir de concentration croissante en tyrosine variant de 10 à 100 $\mu\text{g/ml}$ (voir figure 15).

II.5.1. Préparation de l'échantillon :

A 1ml de filtrat on ajoute 5ml de la solution réactive et on agite, puis on incube pendant 10 minutes dans le bain marie à 35°C. Dans chaque tube, on ajoute 0,5ml de réactif de folin-ciocalteu dilué au 1/3 et on agite, puis on continue l'incubation pendant 30 minutes à 35°C. La lecture est faite au spectrophotomètre à 660 nm contre un blanc.

II.5.2. Préparation du témoin (blanc) :

A 1ml de la solution enzymatique diluée on ajoute 5ml de solution trichloracétique (TCA) à 5% (pour empêcher la réaction enzymatique) puis 1ml de la solution caséine à 1%. Le mélange ainsi préparé est traité de la même façon que précédemment.

II.6. Dosage des protéines par la méthode de Lowry :

C'est une méthode spectrophotométrique basée sur une technique colorimétrique par référence à une courbe étalon établie à partir d'une solution standard de sérum albumine bovine (BSA).

Cette méthode a été développée par LOWRY et al (1951) qui ont combiné une réaction au Biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes principalement et à

un moindre degré la cystéine et l'histidine, pour donner une coloration bleue. la Densité optique est mesurée à 660 nm au spectrophotomètre.

La grande sensibilité de la méthode de Lowry est sa principale qualité. Elle peut atteindre 5-10 µg.

Protocole expérimental :

Pour 1ml de l'extrait enzymatique dilué au 1/20 on ajoute 5ml de la solution réactive. On laisse reposer 10 minutes à l'obscurité puis on ajoute 0,5ml du réactif de Folin-ciocalteu dilué au 1/3 ; après agitation on laisse incuber 30 minutes à l'obscurité ; la densité optique est par la suite mesurée au spectrophotomètre à 660nm.

La concentration en protéines (mg/ml) est déterminée par référence à un courbe étalon à partir d'une solution standard de sérum albumine bovine (BSA) à 200 µg/ml (**Voir figure16**)

III. Essai de purification de l'extrait enzymatique brut :

L'extrait coagulant issu de *Bacillus subtilis* est soumis à une chromatographie d'exclusion moléculaire.

➤ Principe :

La chromatographie d'exclusion moléculaire est une Méthode fréquemment utilisée dans la purification et la séparation des protéines ; Les molécules sont filtrées sur un gel constitué de billes de diamètre connu et comportant des pores. Les "petites" molécules vont passer dans les billes, ce qui va leur donner un trajet dans la colonne plus long. Elles sortiront donc de la colonne plus tard que de «grosses" molécules qui auront plus de mal à rentrer dans les billes et auront tendance à passerentre les billes, ce qui représente un trajet moins important. La sortie des molécules du gel sefait donc dans l'ordre décroissant des PM.

➤ Elution :

Chromatographie d'exclusion moléculaire sur colonne Sephadex G-75 (1,5cm x 30 cm) calibrée par une solution tampon phosphate (0,1 M; pH 5,5)(**ANNEXE 7**). Une quantité de 1 ml est injectée et éluée avec le même tampon à un débit égal à 0,53 ml/min. chaque tube contient 1,7 ml. La lecture des densités optiques est réalisée à 280 nm.

➤ Choix du gel :

La série des gels "Sephadex (G-25, G-50, G-75, ...) est très largement employée en chromatographie de filtration sur gel. Les indices G-25, G-50, G-75, ... indiquent la granulométrie des billes du gel, c'est-à-dire leur volume , l'indice qui suite la lettre G correspond à leur capacité de fixation d'eau.par exemple, LeSéhadex G10 fixe 1 ml par g de poids sec, G75, 7,5 ml par g, G100, 10 ml, etc. Le type de gel est choisi en fonction du domaine de fractionnement dans lequel se trouvent les molécules à séparer.

Par exemple, le gel le mieux adapté pour la séparation de protéines de masse moléculaire : 2000 Da < PM < 70000 Da est le gel de filtration « Superdex G-75».

➤ **Préparation du gel :**

Le gel Séphadex G 75 est lavé avec la solution tampon [Annexe n°7], puis mis à gonfler dans un excès de cette même solution tampon pendant 24 heures.

Le volume de la colonne est donné par la formule suivante :

$$V = \pi.R^2.H$$

Où :

- **V** : volume de la colonne ;
- **π** : 3,14 ;
- **R** : rayon intérieur (avec $d = 1,5$ cm) ;
- **H** : hauteur de la colonne égale à 30 cm

Une fois le gel prêt, il est coulé sur les parois de la colonne afin d'éviter la formation des bulles d'air. Le gel doit être bien tassé et homogène et présenter une seule phase. La colonne est équilibrée avec la solution tampon phosphate (le pH de la solution tampon doit être le même avant et après son passage dans la colonne pour assurer un bon lavage).

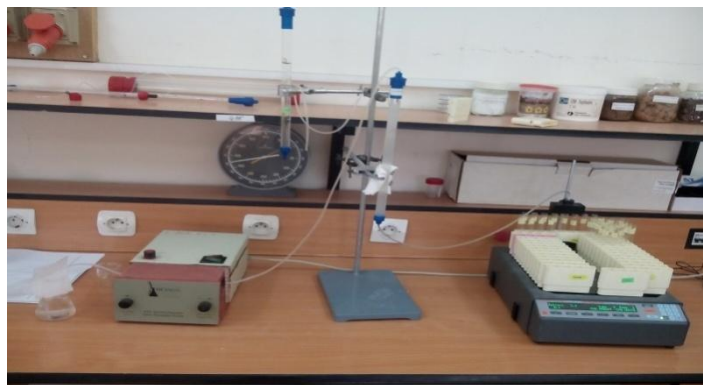


Figure 10: L'installation de l'appareil de gel filtration.

III.1. Caractérisation de solutions enzymatiques brutes et purifiées :

III.1.1. Influence de la température :

La température optimale de coagulation du lait est déterminée en observant le temps le plus court de coagulation avec une variation allant de 25 à 90°C avec un intervalle de 5°C ; les autres paramètres étant fixés selon les conditions standards (pH du lait = 6,4, concentration de CaCl₂ = 0,01M).

III.1.2. Influence de la concentration en CaCl₂ :

La concentration en CaCl₂ favorisant la coagulation est déterminée en observant le temps le plus court de coagulation avec une concentration en CaCl₂ allant de 0,008 à 0,08; les autres paramètres étant fixés selon les conditions standards (pH du lait = 6,4, température 35°C).

III.1.3. Influence du pH du lait :

Le pH optimum de coagulation du lait est déterminé en observant le temps le plus court de coagulation à différents pH allant de 5,2 à 7,5 ; les autres paramètres étant fixés selon les conditions standards (concentration de CaCl₂ = 0,01M, température 35°C).

Résultats et discussion

I. Choix des souches :

Les souches sélectionnées caséolytiques sont représentées dans **le tableau N°3**. L'identification de la souche fait appel à des caractères cultureux et à la morphologie.

I.1. Résultat de l'étude macroscopique :

L'aspect des colonies obtenues sur gélose nutritive après 24h d'incubation à 30°C a révélé les caractéristiques suivantes :

- Forme : ronde, bombée
- Contour : irrégulier
- Opacité : translucide
- Surface : lisse, brillante
- Couleur : blanchâtre



Figure 11 : aspect des colonies après 24h d'incubation à 30°C.

Nous avons mis le code D pour les souches obtenues par le sol de D.B.K et le code F pour les souches obtenues par le sol de la ferme laitière de Dellys.

Tableau 3 : les résultats des observations macroscopiques et la largeur de la caseolyse des souches caséolytiques :

Code de la souche	Aspect macroscopique	Caséolyse (en mm)
D1	Colonies sèches mûtes avec un centre.	6 mm
D2	Colonies très sèches.	5 mm
D3	Colonies sèches bordures dentelées.	8 mm
D4	Colonies sèches très caséolytiques.	10 mm
D5	Colonies gluante légèrement bombées.	7 mm
D6	Colonies brillantes lisses	5 mm
D7	Petites colonies brillantes	3 mm
D8	Ressemble à D4	11 mm
D9	Colonies très sèches très caséolytiques.	8 mm
D10	Ressemble à D1	7 mm
D11	Colonies gluante	10 mm
D12	Ressemble à D6	5
D13	Colonies très sèches bordures dentelées	7 mm
D14	Ressemble à D7	4 mm
D15	Colonies gluante bombées.	6 mm
D16	Colonies sèches dentelées.	10 mm
D17	Petites colonies gluante	3 mm
D18	Ressemble à D9	8 mm
F1	Colonies gluantes dentelées.	8 mm
F2	Colonies sèches très étalées	5 mm
F3	Ressemble à F1	8 mm
F4	Colonies sèches bordures irrégulières	4 mm
F5	Ressemble à F2	5 mm
F6	Colonies brillantes lisses	6 mm
F7	Petites colonies gluante	2 mm
F8	Ressemble à F4	5 mm
F9	Colonies sèches très caséolytiques	9 mm

Nous avons sélectionné les souches qui possèdent une bonne activité coagulante et qui sont :D3.D4.D7.D8.D15.D18.F3.F4.F9.

I.2.Résultats de l'étude microscopique :

- Etat frais : mobile
- Coloration de gram : (+)
- Coloration de spore : ovale, centrale, non déformante.



Figure 12 : cellules bactériennes Observées après coloration de Gram sous microscope optique (G x 100)

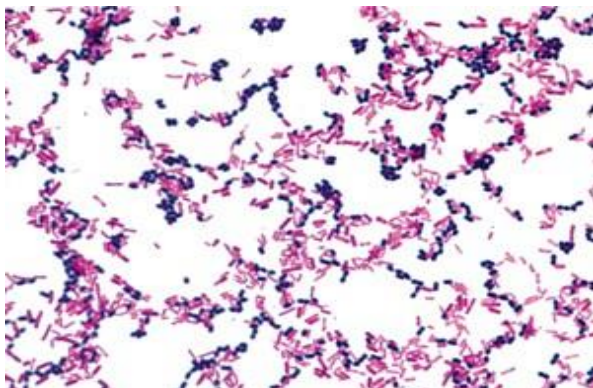


Figure 13 : cellules bactériennes Observées après coloration de spore sous microscope optique (G x 100)

I.3.Résultats de tests biochimiques

Tableau 4 : critères biochimiques des souches :

caractères biochimique	Résultat
Mannitol (mobilité)	+
Citrate de Simons	+
Nitrate réductase	+
Caséine	+
Gélatinase	+
Glucose	+
Saccharose	+
Lactose	+
Catalase	+
Uréase	-
Indole	-

D'après les résultats de l'étude macroscopique, microscopique (la position de la spore centrale et ovale et non déformante) et de tests biochimiques nous pouvons dire que les souches obtenues correspondent à *Bacillus subtilis*.

II .Résultats des activités enzymatiques

II .1.Activité coagulante

Nous avons déterminé l'activité coagulante des extraits enzymatique bruts des déférents milieux solide selon les conditions standard (pH =6,4, CaCl₂ = 0,01M, T= 35°C).

Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau N° 5**

Tableau 5 : Activité coagulante et force de coagulation des extraits enzymatiques bruts.

Code de Souches	Temps de coagulation (s)	Activité coagulantes (UP)	Force de coagulation (SOXHLET)
D7	1530	0.065	15.86
F9	825	1.212	29.09
F3	46	2.173	521.74
D3	600	0.166	40
D15	1260	0.079	19.05
D 18	71	1.408	338.03
F4	106	0.943	226.42
D8	55	1.818	436.36
D4	57	1.754	421.05



Figure 14 : tubes à essai montrant l'activité coagulante.

II.2. Activité protéolytique : (voir ANNEXE 6)

Les résultats de l'activité protéolytique s'exprime en terme de concentration de tyrosine d'extrait enzymatique, par référence à une courbe étalon établit à partir de concentration croissante en tyrosine variant de 10 à 100 µg/ml.

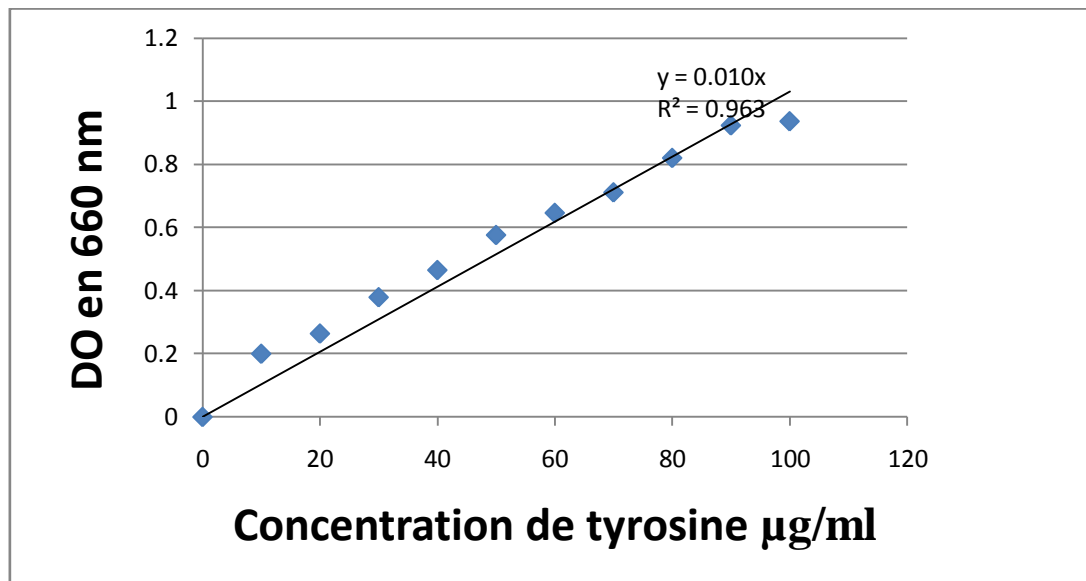


Figure 15 : courbe étalon de la tyrosine

Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau N°6**

Tableau 6 : Activité protéolytique des extraits enzymatiques bruts.

Code de Souches	Temps de coagulation (s)	Activité protéolytique (µg/Tyr/min/ml)
D7	1530	15.81
F9	825	11.24
F3	46	24.54
D3	600	21.90
D15	1260	18.29
D 18	71	18.63
F4	106	19.58
D8	55	25.77
D4	57	18.87

Et nous avons sélectionné la souche qui possède une activité coagulante élevée et une activité protéolytique faible (F9).

II .3.Dosage des protéines de l'EEB de la souche F9 :

Le dosage des protéines dans les solutions enzymatiques est effectué par la méthode de Lowry (voir ANNEXE 8).

Les concentrations en protéines des extraits enzymatiques bruts sont déterminées par référence à une courbe étalon de BSA .

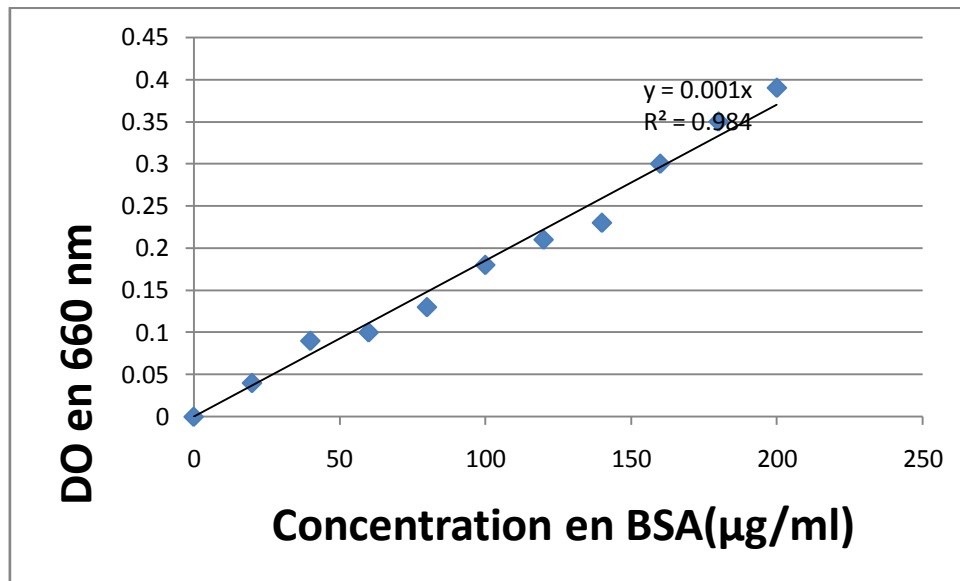


Figure 16: courbe étalon de la BSA.

III. Essai de purification de l'extrait enzymatique brut

III.1. Etude de l'enzyme coagulante purifiée extraite de *Bacillus subtilis*

La solution enzymatique obtenue à partir de *Bacillus subtilis* (F9) est soumise à une chromatographie sur gel de séphadex G75 en utilisant la solution tampon phosphate (0,1M ; pH 5,5).

Un volume de 1ml de l'extrait enzymatique a été injecté sur le haut de la colonne, après l'éluion la DO de chaque tube a été déterminée à 280 nm.

Le profil chromatographique sur séphadex G75 de l'extrait enzymatique Purifié de *Bacillus subtilis* est représenté sur la figure 17

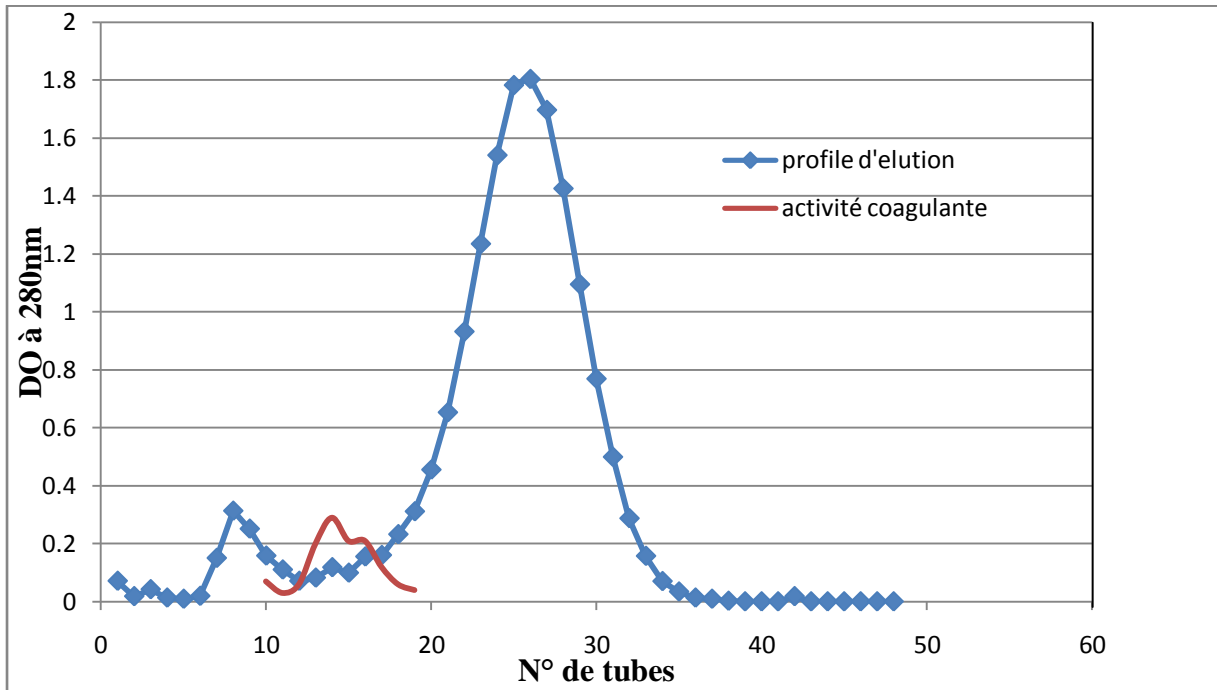


Figure 17: profil chromatographique de l'extrait enzymatique par *Bacillus subtilis*(F9) filtré sur gel séphadex G-75 Le débit des fractions est de 0,53ml/min, fraction de 1,7 ml.

Le profil chromatographique sur gel séphadex G75 de l'extrait enzymatique de *Bacillus subtilis* révèle deux pics d'éluion, au niveau desquelles la recherche de l'activité coagulante a été faite par la méthode de Berridge.

Les tubes n° 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15,16, 17, 18,19 de *Bacillus subtilis* appartenant au premier pic ont été positifs au test de coagulation, les résultats représentés dans le tableau 7

Tableau 7 : Le temps de coagulation après purification

N° tube	7	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Le temps de coagulation min	34	24	60	30	8.14	5.50	7.50	8	14	26	38

Cela nous permet de dire que la protéine étudiée se trouve dans l'ensemble de cette fraction, le deuxième pic était inactif, il représente une protéine contaminante.

III.2.Détermination du poids moléculaire

Le poids moléculaire de la protéase obtenu après purification des extraits enzymatiques prépurifiés a été déterminé à partir du profil d'un mélange de protéines standards par passage sur colonne Sephadex G-75. Il s'agit de l'albumine d'œuf de poulet, (43,3 kDa), pepsine

porcine Sigma (35 kDa), trypsine de pancréas bovin Merck (23,3 kDa) et la lactoglobuline de lait bovin (18,36 kDa). La droite de régression est représentée par la valeur du logarithme de la masse moléculaire de la protéine étalon (logPM) en fonction de son volume d'élution (**Figure18**). Cette méthode de mesure est la technique classique de mesure du PM d'une protéine en biochimie (**Kamoun, 1991**).

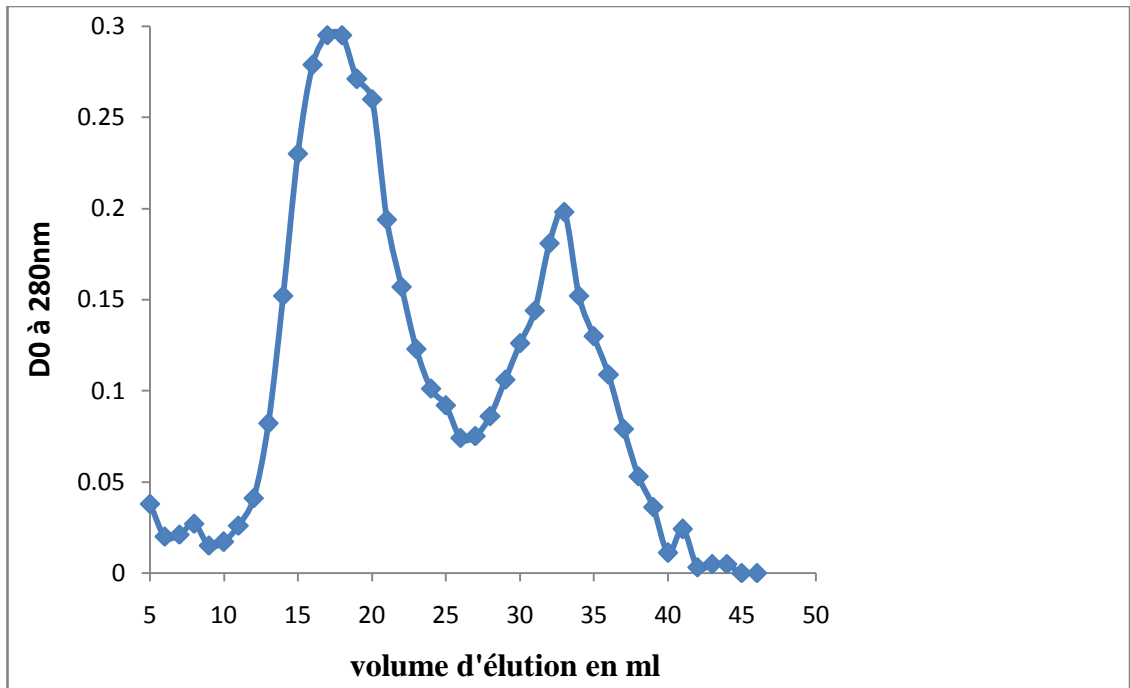


Figure18 : Profil d'élution des protéines standards

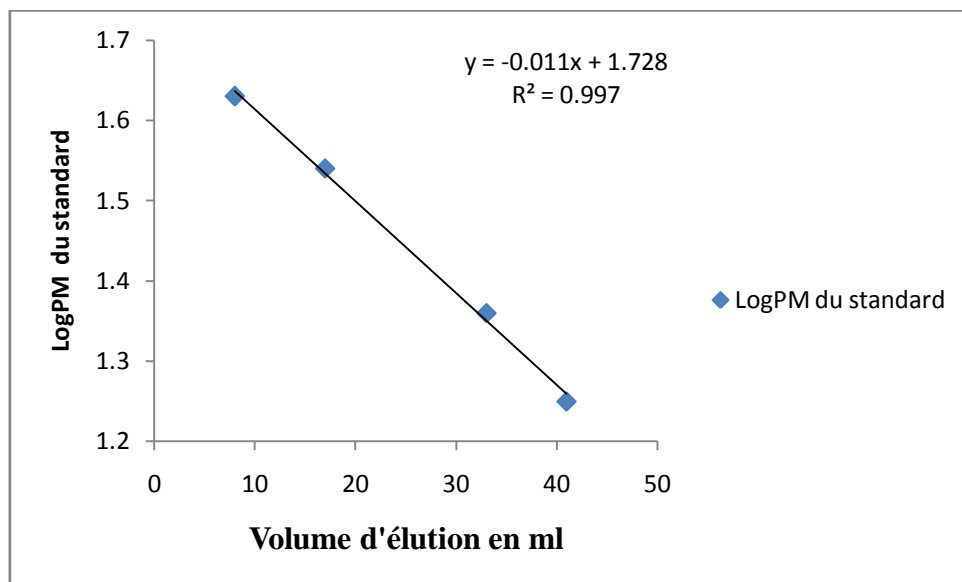


Figure19 : Droite d'étalonnage du log des standards protéiques

D'après la courbe d'étalonnage, nous pouvons déterminer le poids moléculaire de l'enzyme coagulante de *Bacillus subtilis*F9 purifiée.

Le volume d'élution est 25 ml par extrapolation le poids moléculaire de l'enzyme coagulante F9 est 28 kDa.

Tableau 8 : standards protéiques et leurs poids moléculaire

Standards protéiques	PM (kDa)	Volume d'élution (ml)	Log PM
Albumine d'œuf	43.3	8	1.63
Pepsine de porc	35	17	1.54
Trypsine de pancréas	20	33	1.36
Lactoglobuline de lait	18	41	1.25
l'enzyme coagulante F9	28	25	1.453

VI. Caractérisation des extraits enzymatiques bruts et purifiés

VI.1. Influence de la température du lait :

Les résultats sont illustrés dans la figure 20.

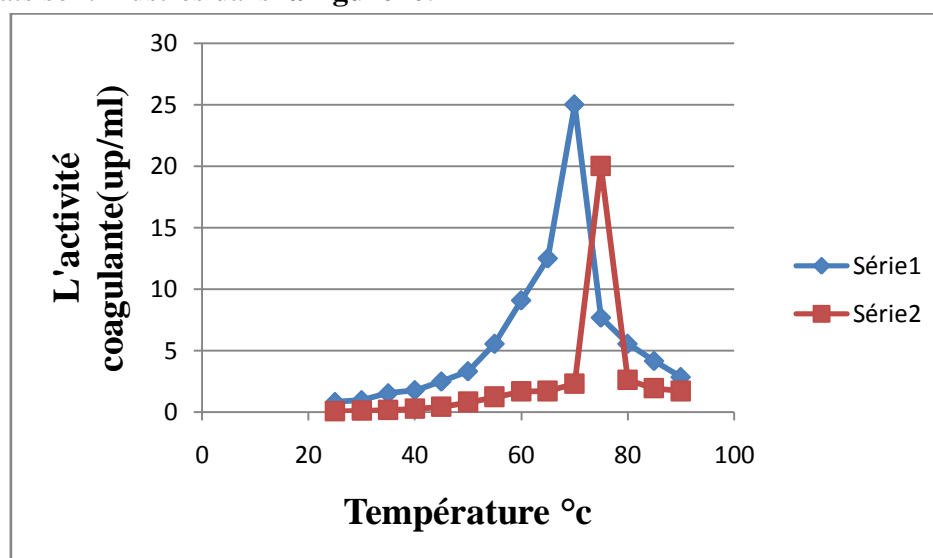


Figure 20 : l'évolution de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut et l'extrait enzymatique purifié de *Bacillus subtilis* en fonction de la température du lait.

D'après nos résultats l'activité coagulante de l'extrait enzymatique purifié et brut de *Bacillus subtilisaugmente* au fur et à mesure avec la température jusqu'à atteindre une valeur maximale à 70°C pour le brut et 75°C pour purifié puis elle diminue.

VI.2. Influence du pH du lait :

Les résultats sont représentés dans la figure 21.

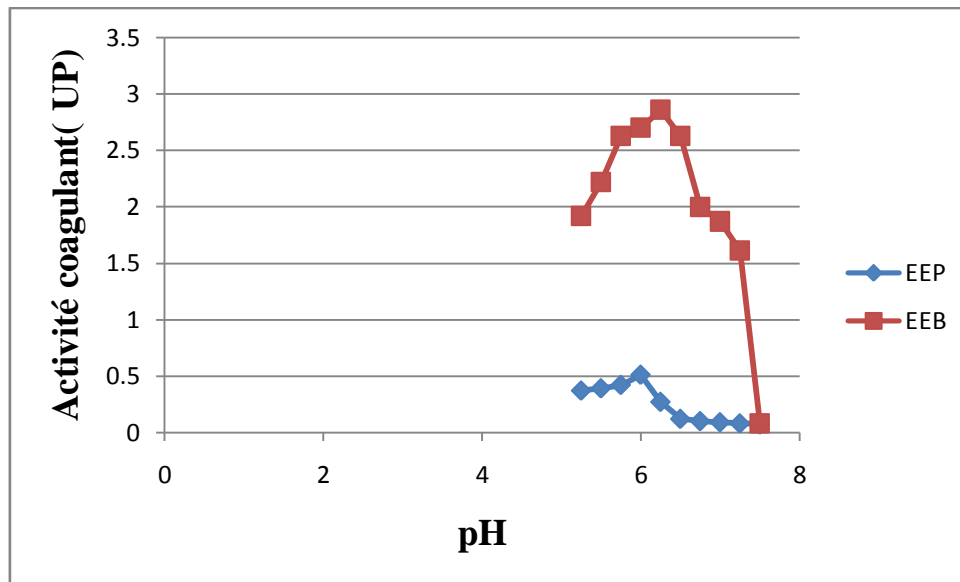


Figure 21 : L'évolution de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut et purifié de *Bacillus subtilisen* fonction du pH de lait

D'après nos résultats l'activité coagulante de l'extrait enzymatique purifié et brut de *Bacillus subtilisaugmente* au fur et à mesure avec le pH jusqu'à atteindre une valeur maximale à pH= 6.25 pour le brut (AC= 2.86 UP) et à pH= 6 pour le partiellement purifié (AC= 0.51 UP) puis elle diminue.

Nos résultats concordent avec ceux de MATOUB., (2000) qui indiquent un pH optimum d'action de 6,2 pour une coagulase produite par une souche locale sélectionné de *Bacillus subtilis*.

VI.3. Influence de la concentration en CaCl_2

Les résultats sont représentés dans la figure 22 :

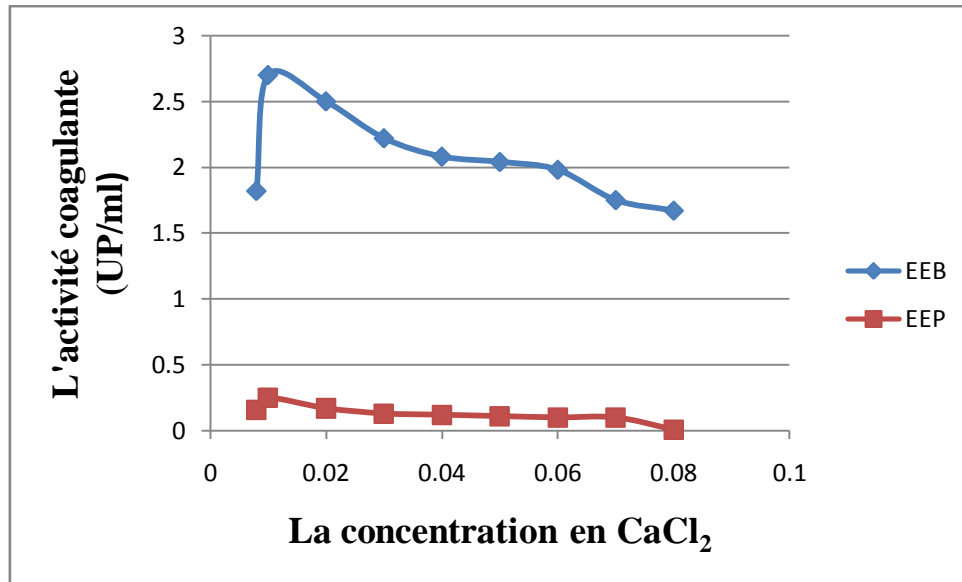


Figure 22: Evolution de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut et purifié de *Bacillus subtilis* en fonction de la concentration de CaCl_2 .

Nous avons observé que l'activité coagulante augmente de manière proportionnelle avec la concentration en CaCl_2 pour atteindre une activité maximale à une concentration de **0.01M** de 2.7 UP/ml pour l'extrait enzymatique brut et 0.25 de l'extrait enzymatique purifié ; mais à partir de la concentration 0.01M de CaCl_2 l'activité coagulante décroît jusqu'à ce qu'elle stagne après 0.04M, cela peut être expliqué par l'inhibition des ions Ca^{+2} dû en partie à la précipitation de la caséine du lait (CHAFETEL J.C et CHEFTEL H, 1977).

Nos résultats sont inférieurs à ceux de MATOUB., (2000) qui indique une activité optimale à une concentration en CaCl_2 de l'ordre de 0.02M pour une coagulase produite par une souche de *Bacillus subtilis*. et ressemble à ceux de MORSLI.,(1996) qui indique une valeur de 0.01M. En technologie fromagère les concentrations se situent dans l'intervalle de 0,01 et 0,02M de CaCl_2 .

Conclusion

Cette étude nous a permis de contribuer aux travaux de recherches préexistants dans le domaine de l'industrie fromagère, en particulier de trouver de nouvelles sources potentielles de succédanés de présure, en isolant à partir de deux différents sols (terre), des microorganismes (Bactéries) caséolytiques possédant une enzyme coagulant le lait.

Nous avons obtenu un certain nombre de Bactéries que nous avons cultivé sur un milieu solide à base de son de blé, après incubation, nous avons procédé à l'extraction de l'enzyme. L'activité coagulante est recherchée. Après étude de leurs activités enzymatiques nous avons opté pour la souche qui possède la meilleure activité coagulante et la plus faible activité protéolytique.

La souche sélectionnée **F9** a été identifiée comme étant *Bacillus subtilis* grâce à des techniques microscopiques et à des tests biochimiques puis nous avons effectué d'autres analyses sur l'EEB de la souche sélectionnée (Activité coagulante, Activité protéolytique et dosage des protéines).

Les résultats obtenus sont $AC = 1,212 \text{ UP}$ et $AP = 11,24 \mu\text{g/Tyr/min/ml}$

Une caractérisation de l'enzyme brute a été effectuée et nous avons obtenu un pH optimal de 6,25, une température de 70°C et un taux de CaCl_2 de 0,01 M.

La purification de notre extrait enzymatique par chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel sephadex G75 a révélé la présence de deux pics, seul le premier est actif, ensuite nous avons procédé à la détermination du PM.

En utilisant des protéines standards qui sont l'albumine d'œuf de poulet, pepsine porcine, trypsine de pancréas et la lactoglobuline de lait bovin, nous pouvons conclure que notre enzyme possède un PM voisin de 28 kDa.

Les conditions optimales d'activité coagulante de l'EEP obtenues sont un pH de 6, une température de 75°C et une concentration en CaCl_2 de 0.01M.

Néanmoins il serait intéressant de poursuivre ce travail notamment de :

- Faire l'identification par biologie moléculaire de la souche sélectionnée.
- De tester d'autres milieux de fermentations
- De comparer les activités enzymatiques avec la présure commerciale.
- D'effectuer des essais de fabrication fromagère.

Références bibliographiques

ALAIS C. (1971).Les enzymes coagulantes .La technique laitière. 9,115-129.

ALAIS C. (1974).Science du lait. Principes des techniques laitières.3^{ème}ed.
162-164 ; 618-619

ALAIS C. (1984).Science du lait. Principes des techniques laitières .Ed SEPAIC,Paris 4^{ème} ED ,814p.

AMIOT J ., FOURNIER F., LEBEUF y., Paquin P.,SIMPSON R.,(2002).Composition ,propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait .Dans :science et technologie du lait :transformation du lait coordonnateur VignolaCC,Fondation de technologie laitière du Québec 395P.

ARNAUD A., GUIRAUD S.P.1993. Le métabolisme microbien.IN : Biotechnologie. Cood. Scriban, R.4^{ème}èd.95.

BERGMEYER H.U. , GAWEKN K., et al., (1979). Principes de l'analyse enzymatique. Tech.et Doc .Lavoisier. Paris. Pp.17

BERRIDGE, N.J.(1955).Purification and assay of rennin .Methods in enzymologie volume 2pp 69-77Ed ., perlmannG.E.andLorand L, A cad. Press Inc., New York.

CAYOT P., et LORIENT, D., 1998. Structures et techno-fonctions des protéines du lait Ed.Tec& Doc, Lavoisier, Paris, 363 p.

CHAFETEL J.C et CHAFTEL H.(1977). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, Tec&Doc Lavoisier, Paris 1984

CHANNE PS.And SHEWALE JG., (1998). Influence of culture conditions on the formation of milk clotting protease by *Aspergillus niger*MC4. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14 : 11-15.

CHOPRA et MATHUR (1985). Purification and characterization of heat stable proteases From *Bacillus stearothermophilus* J.App Bacteria., 15 : 355-358.

CORDEIRO ET AL., 1992. Milk-clotting and proteolytic activities of purified Cynarases from *Cynaracardunculus* - a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft*, vol. 47, p.p. 683-687.

DROUIN M., 2005. Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat .Mémoire de Maître sciences (M.Sc.).Canada.

ECK A. & GILLIS J.C., (1997) .Le fromage . Ed. Tec & Doc., Lavoisier ,Paris,3^{ème}Ed.

EMILIE FREDOT, LAVOISIER, 2005 : LAVOISIER, 2005, (3^{ème} tirage, 2006) ;
ISBN : 2-7430-0810-5.

FLORENT .J, (1993). Les Moisissures In : microbiologie industrielle-les microorganismes d'intérêt industriel, tec & doc lavoisier, paris.

GREEN M.L., et STACKPOOLE A., 1975. The preparation and assessment of a Suitable *Mucor pucillus* Lindt protéinase-swine Pepsin mixture for cheddar cheese making. *Journal of dairy research*, 40 :297-312.

GUIRAUD J. (1998). Microbiologie alimentaire 8-101. Edition Donod, Paris.

J.C. COLLIN, R. GRAPPIN et Y. LEGRAET, 1977). REVUE LAITIERE FRANCAISE N°355.

KAMOUN P., 1977. Appareils et méthodes en biochimie. Ed. Flammarion, Paris, 80-193.

KUMAR.S : SHARMA. N. S : M.R : SAHARAB, et SINGB. R., (2005). Extracellular acide protease from *Rhizopusoryzae*: purification and characterization. *Elsevier Process Biochemistry* .Vol : 40.P 1701-1705.

LEISOLA M.,JOKELA J., PASTINEN O.,TURUNEN O.,2001. Industrial use of enzymes .Laboratory Bioproc.Eng.,Helsinki University of Technology ,Finland,nd Hans Schoemker ,DMSReserch,MDGeleen ,The Netherlnds.

LENOIR R.C., (1985) :Cheese and whey in industrial enzymology. 2 Ed. Edited by Godfrey and west chap.2.7.P 135-153.

LENOIR J., REMEUF F., SCHNEID N., 1997. L'aptitude du lait a la coagulation par la présure. In: Le Fromage, 3ème édition, *Ed. Tec & enzymatic properties of cynarase A.* Phytochemistry,66 :41-49.

LEVADOUX W.,GOHNSONM.Et ANDER G.,1989.Monitoring the degradation of commercial microbial rennet preparations.*J.Dairy Sci., 72(3):627-634.*

LOWRY O.H. ROSEBROUGH N.J. FARR A.L. et RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with thefolin phenol reagent. *J. Bio. Chem.* 193 265-275.

MAHAUT MICHEL , GERARD BRULE. (2003). Initiation a la technologie fromagère, technique et documentation, Lavoisier, France ; Pp 24-102.

MAHAUT M., JEANTET R., BRULE G., 2000. Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc Lavoisier. pp : 1-21.

MAHAUT M., JEANT t R., BRULE G.,SCHUCK P.,(2000).Les produits industriels laitiers .Tec & Doc, Paris, France.

MATOUB, (2000). Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Mémoire de magister, Institut National Agronomique, El Harrach, Alger.

MORSLI ., (1997). Recherche sur les activités protéasiques de l'extrait de *Cynarascolymus*, de *Ficus caricaet* de *Gallus gallusen* vue de leur application en technologie fromagère. Mémoire de magister, Institut National Agronomique, El Harrach, Alger, 181 p.

MORSLI A., 1996. Recherche sur les activités protéasique des extraits de *cynarascolymus*, de latex du *ficus caricaet* de provetricule de Gallus gallus en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Thèse magister, INA , Alger, 181p.

PASCAL CHILLET, JOEL CNOKAERT, FRANÇOISE GUILLET (2004).
Opérations unitaires en génie biologique (fermentation), biologie et technique.

PATEL R., DODIA M., SINGH S.P.,2005. Extra cellular alkaline protease from a
New lysoladhaloalkaliphilic *Bacillus sp.* : production and optimization.proc.
Biochem.,40 ;3569-3575.

RAHARDJO Y.S.P.,tramper j.& RINZEMA A. (2006). Modeling conversion and
transport phenomena in solid-state fermentation : a review and perspective. Biotechnol. Adv.,
24(2) , 161-179.

RAMET, 1997 : RAMET JP, SCHER J. Propriétés physiques du coagulum. In : eck a,
gillisjc, eds. Le fromage. 3^{ème} édition. Paris : tec & doc-lavoisier, 1997.

RAMET J.P. (1997).Les agents de transformation du lait. In « Le fromage ».Paris, Ed.
Tech.And Doc. Lavoisier (3eme édition), 165-172.

SCRIBAN R., (1999). Biotechnologie.Ed. Tec et Doc Lavoisier. 5^{ème}, 904 p.

SCRIBAN R., (1993). Biotechnologie,production d'enzymes. Ed. Lavoisier. Techn. Et doc.,
Paris,266-486.

SCRIBAN R., (1988) : Biotechnologie. 3^{eme} edition tech& doc. Lavoisier, pp 266-486.

SIDRACH L., GARCIA-CANOVAS F., TUDELA J., and NEPTUNO

SIMON P., MEUNIER R. (1970). Microbiologie industrielle et génie biochimique. Ed
masson et cie. Paris. P567.

Annexe N°1

- **Préparation des dilutions :**

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

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

- **Méthodes d'ensemencement et de dénombrement :**

Ensemencement et dénombrement sur milieu solide :

- **Par étalement :**

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

- **Par incorporation :**

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

En ce qui concerne l'isolement des bactéries, le milieu employé est le milieu plate count Agar (P.C.A), additionné de 10% lait écrémé UHT et d'actidione à 2 % (cycloheximide). L'incubation s'effectue à 30°C pendant 48h à 72h.

Le dénombrement est effectuée par la méthode McFarland standards (Mc farland 4 = $15.10^8 \text{B}^{\text{ies}}/\text{ml}$).

Annexe2

Normes McFarland

Un article de Wikipédia, l'encyclopédie libre

En microbiologie , les **normes McFarland** sont utilisées comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes de sorte que le nombre de bactéries soit dans une gamme donnée pour normaliser les tests microbiens. Un exemple de ces tests est le test de sensibilité aux antibiotiques par mesure de la concentration minimale inhibitrice qui est habituellement utilisée dans la microbiologie et la recherche médicales. Si une suspension utilisée est trop lourde ou trop diluée, un résultat erroné (faussement résistant ou faussement susceptible) pour tout agent anti-microbien donné pourrait se produire.

Les normes originales de McFarland mélangeaient des quantités spécifiées de chlorure de baryum et d'acide sulfurique ensemble. Le mélange des deux composés forme un précipité de sulfate de baryum, ce qui provoque une turbidité dans la solution. Un standard de 0,5 McFarland est préparé en mélangeant 0,05 ml de dihydrate de chlorure de baryum 1,175% ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), avec 9,95 ml d'acide sulfurique à 1% (H_2SO_4).

Maintenant, il existe des normes McFarland préparées à partir de suspensions de particules de latex, ce qui allonge la durée de conservation et la stabilité des suspensions. La norme peut être comparée visuellement à une suspension de bactéries dans une solution saline stérile ou un bouillon nutritif. Si la suspension bactérienne est trop trouble, elle peut être diluée avec plus de diluant. Si la suspension n'est pas suffisamment trouble, plus de bactéries peuvent être ajoutées.

McFarland Nephelometer Standards ^[citation nécessaire] :

McFarland Standard No.	0,5	1	2	3	4
1,0% Chlorure de baryum (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
1,0% d'acide sulfurique (ml)	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6
Environ. Densité cellulaire (1×10^8 CFU / mL)	1,5	3,0	6,0	9,0	12,0
% Transmittance *	74,3	55,6	35,6	26,4	21,5
Absorbance *	0,08 à 0,1	0,257	0,451	0,582	0,669

* À une longueur d'onde de 600 nm

Références [modifier]

LE NEPHÉLOMÈTRE: UN INSTRUMENT POUR ESTIMER LE NOMBRE DE BACTÉRIES DANS LES SUSPENSIONS UTILISÉES POUR CALCULER L'INDICE OPSONIQUE ET POUR LES VACCINS. JOSEPH McFARLAND, MD JAMA. 1907; XLIX (14): 1176-1178

Annexe N°3

Préparation de sulfate d'ammonium 0,01 % :

0,01 g —————> 100 ml l'eau distillée.

0,05 g —————> 500 ml.

Annexe N°4

Technique de coloration de Gram :(CAMILLE , 1980)

On prépare un frottis d'un produit d'une culture bactérienne pure.

- Recouvrir le frottis de violet cristal oxalate ; laisser agir une minute.
- Couvrir avec Lugol ; 45 sec deux fois.
- Décolorer avec l'alcool ; 30 sec.
- Lavage pour stopper l'action de l'alcool.
- La coloration par la fuchsine pendant 1 min.
- Lavage à l'eau courante.
- Séchage puis refroidissement de la lame.
- Observation au microscope.

CAMILLE D L. ;(1998) ; microbiologie pratiques pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire p108,109

Annexe N°5

Technique de coloration de Spores (coloration de BENITO) :

On prépare un frottis d'un produit d'une culture bactérienne pure.

- Déposer le frottis de bactéries sur une platine chauffante.
- Recouvrir largement le frottis avec du vert Malachite à 5% (5g dans 100 ml d'eau distillée).
- Chauffer jusqu'à émissions de vapeur et laisser refroidir.
- Renouveler plusieurs fois (3) l'opération, laisser en contact 10 mn ajoutant si nécessaire du vert Malachite pour éviter l'évaporation.
- Rincer à l'eau courante, puis recouvrir le frottis d'une solution de safranine à 0.25 % (0,25 g dans 100 ml d'eau distillée) pendant une minute.
- Rincer à l'eau, sécher et observation à l'objectif*100 à immersion.

Annexe N°6

Activité protéolytique :

1. Préparer la solution HCl 0,01 N pour dissoudre la tyrosine à raison de 100µg /ml
Pour HCl il faut 3,9 ml HCL 38% → 500ml d'E.D pour HCl 0,1 N
Pour HCl 0,01N il faut faire le calcul soit 0,39 ml HCL

2. Peser 10mg de tyrosine qu'on dissout dans l'HCl 0,01
10mg dans 100ml HCl 0,01
Pour avoir une solution mère qui contient 100µg /ml

3. Préparer

- **Sol A** : 2g NaOH → 500ml eau distillée } NaOH / Na₂CO₃
Na₂CO₃ 10g
- **Sol B** : tartrate double de Na et de K à 2g → 100ml
- **Sol C** : sulfate de cuivre CuSO₄· 5H₂O (1g → 100ml)

Mélanger juste avant l'emploi dans l'ordre (sol réactive) en respectant l'addition des réactifs

Sol C : CuSO₄ 0,5 cm³

Sol B : tartrate 0,5 cm³

Sol A : NaOH Na₂CO₃ 50 cm³

Prélever 5ml de la solution réactive à mettre dans chaque tube .

4. Préparer TCA 5% (5g de TCA dans 100ml d'ED)

5. Caséine 1% 1g dans 100 ml NaOH 0,02M

6. Folin dilué au 1/3 ex : 2 ml folin+ 4mlH₂O

Mesurer la DO à 660nm

7. NaOH 0,02M

1 mole : 40g → 1000 ml

4 gr-----100ml -----1M

X-----100ml -----0,02M

X= 4 * 0,02 = 0,08 gr dans 100ml d'eau distillée

N° tube	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration en tyrosine	0µ/g	10µ/g	20	30	40	50	60	70	80	90	100µg
Sol mère	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
ED	1ml	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Sol réactive	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
DO	0	0,2	0,264	0,379	0,465	0,576	0,646	0,711	0,820	0,923	0,936

Annexe N°7

Préparation de la solution tampon (pH =5,6)

- Solution A : KH_2PO_4 (1,36g dans 100ml d'eau).
- Solution B : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,78g dans 100ml d'eau).

La formule de tampon : **X ml de A + (100-X) ml de B.**

Annexe N°8

Dosage des protéines totales :

Méthode de Lowry (1951) :

Le dosage des protéines dans les solutions enzymatiques est effectué par la méthode de **LOWRY (1951)**.

-1-Préparation des solutions

Solution mère à 200ug/ml de BSA : peser 10 mg les mettre dans une fiole jaugée de 50ml compléter avec H_2O

-2-Préparation la solution réactive :

- Solution A : 2g NaOH dans 500 ml d'eau distillée puis ajoute 10 g Na₂CO₃
- Solution B : 2g de tartrate double de sodium et potassium dans 100 ml d'eau distillée.
- Solution C : 1g de sulfate de cuivre (CuSO₄ · 5H₂O) dans 100 ml d'eau distillée.

En respectant l'addition des réactifs, mélanges : (cette solution doit être préparée juste avant l'emploi et dans l'ordre).

- **Solution C** : CuSO₄ 0,5 cm³
- **Solution B** : tartrate 0,5 cm³
- **Solution A** : NaOH Na₂CO₃ 50 cm³

-3- Solution diluée de Folin à raison de 1/3 :

Tubes N°	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol mère	0ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
H ₂ O	1ml	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Concentration En BSA	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200µg/ml
Solution réactive	5ml	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DO	0	0,04	0,09	0,10	0,13	0,18	0,21	0,23	0,30	0,35	0,39

Faire la courbe d'étalonnage (sol étalon+H₂O, agiter,+ sol réactive, agiter, attendre 10min, ajouter Folin, agiter, laisser 30min à l'obscurité) lire la DO à 660 nm

Pour l'EEB :

Diluer au 1/2 ou 1/10 tenir compte des les résultats (ex : 1ml EEB+9mlH₂O)

- Prendre 1mlEEB ajouter5ml de sol réactive
- Agiter
- Attendre 10Min
- Ajouter0, 5ml de folin (dilué 3 fois)
- Agiter
- Laisser reposer 30min à l'obscurité
- Lire la DO à 660nm

Annexe N°9

Appareillage



Balance analytique



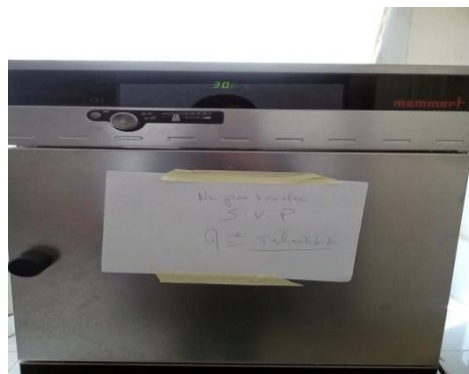
PH-mètre



Bain Marie thermostat



Autoclave



Etuve d'incubation



Agitateur



Microscope



Installation du gel filtration



Plaque chauffante



Vortex



Centrifugeuse

Résumé :

L'objectif de notre travail est d'étudier la production des protéases par la souche isoler localement *Bacillus subtilis* cultivées un milieu solide à base de son de blé.

L'influence du pH , la température, et de la concentration en CaCl_2 sur l'activité des extraits coagulants bruts et purifiés a été étudiée.

La chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Séphadex G75 nous a permis de purifier l'enzyme coagulant et nous avons mis en évidence son profil d'élution.

Mots clés : *Bacillus subtilis*, Enzymes coagulant le lait , son de blé, purification.

Abstract:

The objective of our work is to study the production of the proteases by the local isolated strain *Bacillus subtilis* cultivated on solid medium containing wheat bran.

The pH, the temperature, and CaCl_2 concentration influence on the activity of raw purified clotting extracts was studied.

The molecular chromatography of exclusion on freezing Séphadex G75 enabled us to purify the coagulating enzyme and we highlighted his profile of elution.

Key words: *Bacillus subtilis*, Milk clotting, wheat bran, purification.

ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو إظهار و إنتاج مخثرات الناتجة من السلالة البكتيرية المعزولة محليا *Bacillus subtilis* المزروعة في وسط صلب المتكون من النخالة.

الظروف المثالية لعمل الأنزيمات المخثرة الخام والتنقية ك pH الحرارة تركيز الحليب ب CaCl_2 .

ان محاولة تنقية المستخلص الأنزيمي الخام بعملية كروماتوغرافية بهلام Séphadex G75 سمحت لنا بانجاز منحناها البياني.

الكلمات الأساسية: *Bacillus subtilis*, الانزيمية المخثرة, التنقية.