

143 B/HAM

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

HAMZA Safa & MERAD Amina

Thème

Application des extraits coagulant le lait d'origine fongique dans la production du fromage à pâte pressée non cuite type EDAM

Soutenu le : 02/07/2018

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Mme. AKKOUCHE Saida	MAA	Univ. de Bouira	Présidente
Mlle. BENSMAIL Souhila	MAA	Univ. de Bouira	Promotrice
Mme BOURFIS Nassima	MAA	Univ. de Bouira	Examinatrice

Année Universitaire : 2017/2018

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Chapitre I : synthèse Bibliographique

I.1 Les protéases.....	3
I.1.1 Définition	3
I.1.2. Classification	3
I.2. Les principaux enzymes coagulant du lait.....	4
I.2.1. La présure.....	4
I.2.2. Composition de la présure.....	4
I.2.2.1. La chymosine (EC.3.4.23.4)	4
I.2.2.2. La pepsine (EC 3.4.23.1-3).....	4
I.2.3. Mécanisme d'action	5
I.2.3.1. La phase primaire	5
I.2.3.2. La phase secondaire.....	5
I.2.3.3. La phase tertiaire	5
I.2.4. Les facteurs influençant la coagulation de lait par la présure	5
I.2.4.1. La température	5
I.2.4.2. Le pH	6
I.2.4.3. La concentration en ions Ca^{2+}	6
I.2.4.4. Le chlorure de sodium	6
I.2.5. Les succédanés de la présure.....	6
I.2.5.1. Les succédanés d'origine animale.....	6
I.2.5.2. Les succédanés d'origine végétale	7
I.2.5.3. Les succédanés d'origine microbienne.....	7
I.2.5.4. Chymosine recombinante.....	8
I.2.6. Les propriétés des enzymes coagulant le lait	8
I.2.6.1. Propriétés physico-chimiques	8

I.2.6.2. Propriétés technologiques	8
I.3. Le fromage	9
I.3.1. Définition.....	9
I.3.2. Classification	9
I.3.3. Etapes de fabrication.....	9
I.3.3.1. La coagulation.....	11
I.3.3.2. L'égouttage	11
I.3.3.3. L'affinage.....	12
I.4. Moisissures	12
I.4.1. Le genre <i>Mucor</i>	14
I.4.2. Le genre <i>Rhizopus</i>	14
I.5. La fermentation sur milieu solide	15
I.5.1. Définition.....	15
I.5.2. Avantages de la fermentation solide	15
I.5.3. Inconvénients des fermentations solides	16

Chapitre III : Résultats & Discussion

III.1. Culture des souches	31
III.2. Observations	31
III.3. La production des protéases	32

Chapitre II : Matériels & Méthodes

II.1. Matériel	17
II.1.1. Matériel biologique.....	17
II.1.2. Matériel non biologique.....	17
II.2. Méthodes	17
II.2.1. Revivification des souches.....	17
II.2.2. Préparation des inocula	17
II.2.3. Estimation de la taille des inocula	17
II.2.4. Fermentation sur milieu solide	18
II.2.5. Extraction des protéases.....	18
II.2.6. Pré-purification des extraits bruts.....	18
II.2.6.1. La précipitation au sulfate d'ammonium.....	18
II.2.6.2. La dialyse.....	19
II.2.6.3. Contrôle de la purification (SDS-PAGE).....	20

II.2.7. Paramètres de purification	20
II.2.8. Méthodes de dosage.....	21
II.2.8.1. Mesure de l'activité coagulante (AC)	21
II.2.8.2. Mesure de l'activité protéolytique (AP).....	22
II.2.8.3. Dosage des protéines	22
II.2.9. Caractérisation de l'extrait enzymatique dialysé.....	22
II.2.9.1. Influence de la température du lait.....	22
II.2.9.2. Influence du pH du lait	23
II.2.10. Essai de fabrication de fromage à pâte pressée non cuite type « EDAM »	23
II.2.10.1. Définition (EDAM).....	23
II.2.10.2. Les étapes de fabrication	23
II.2.10.3. Analyses physicochimiques.....	25
II.2.10.4. Analyses microbiologiques.....	26

Résumé

Chapitre III : Résultats & Discussion

III.1. Culture des souches	31
III.2. Observation microscopique des souches.....	31
III.3. La production des protéases	32
III.4. Extraction des protéases.....	33
III.5. Mesure des activités enzymatiques.....	33
III.5.1. Extraits bruts.....	33
III.5.1.1. Détermination de l'activité coagulante.....	33
III.5.1.2. Détermination de l'activité protéolytique.....	34
III.5.1.3. Dosage des protéines	35
III.5.2. Extraits pré-purifiés (Dialysés).....	36
III.5.2.1. Détermination de l'activité coagulante.....	36
III.5.2.2. Détermination de l'activité protéolytique.....	37
III.5.2.3. Dosage des protéines	37
III.6. Paramètre de purification	38
III.7. Détermination du poids moléculaire.....	39
III.8. Caractérisation des extraits dialysés	41
III.8.1. Influence de la température du lait	41

III.8.2. Influence du pH	42
III.9. Les résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques	43
III.9.1. Du lait	43
III.9.1.1. Analyses physico-chimiques	43
III.9.1.2. Analyses microbiologiques.....	43
III.9.2. Du lactosérum.....	44
III.9.3. Du produit fini	45
III.9.3.1. Analyses physicochimiques.....	45
III.9.3.2. Analyses microbiologiques.....	45
III.10. Rendement fromager	46
<i>Conclusion</i>	47
<i>Références bibliographiques</i>	49
<i>Annexe</i>	
<i>Résumé</i>	

Introduction

Résumé

L'objectif de notre travail est la production, purification et la caractérisation de deux protéases coagulant le lait d'origine microbienne produites par deux souches fongiques locales *Mucor circinelloides* et *Rhizopus stolonifer* cultivées sur milieu solide à base de son de blé.

Les extraits bruts présentent une activité coagulante de l'ordre de 661,003US/ml et 1242,105US/ml pour *R. stolonifer* et *M. circinelloides* respectivement. Deux facteurs de purification de 5 et 2,1 ont été obtenus après précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et dialyse des extraits bruts de *M. circinelloides* et *R. stolonifer*.

La SDS-PAGE révèle que l'enzyme coagulante de *M. circinelloides* possède un poids moléculaire de 27523,3 kDa.

Les conditions optimales d'activité coagulante des extraits dialysés ont été déterminées. L'activité est maximale à pH 5 pour les deux souches, et à une température de 60°C pour le *M. circinelloides* et de 55°C pour *R. stolonifer*.

Les extraits bruts et dialysés ont été utilisés dans des essais de fabrication de fromage à pâte pressée non cuite type EDAM en se basant sur leurs rapport AC/AP. Les rendements obtenus sont plus faibles par rapport à la présure commerciale, mais les propriétés physicochimiques sont très proches.

Mot clé : protéase coagulant, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor circinelloides*, purification, fromage EDAM.

Abstract

The aim of our work is the production, purification and characterization of two milk-clotting proteases from microbial origin produced by two local fungal strains *Mucor circinelloides* and *Rhizopus stolonifer* grown on solid medium based on wheat bran as substrate.

The crude extracts have a curdling activity of 661.003US/ml and 1242.105US/ml for *R. stolonifer* and *M. circinelloides* respectively. Two purification factors of 5 and 2.1 were obtained after $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and dialysis of the crude extracts of *M. circinelloides* and *R. stolonifer*.

SDS-PAGE reveals that the milk-clotting enzyme of *M. circinelloides* has a molecular weight of 27523.3kDa.

Optimal conditions of curdling activity were determined for both the purified extracts. The activity is maximum at pH 5 for both extracts and at a temperature of 60°C for *M. circinelloides* and 55°C for *R. stolonifer*.

The crude and dialyzed extracts were used in EDAM uncured pressed cheese production trials based on their AC/AP ratios. The yields obtained are lower compared to commercial rennet, but the physicochemical properties are very close.

Keywords: milk-clotting protease, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor circinelloides*, purification, cheese EDAM.