

MINISTERE 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/2020

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Biotechnologies
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

BELGACEM Nesrine & SAOUD Roumaissa

Thème

**L'influence des conditions d'extraction sur l'activité
coagulante de deux protéases fongiques : Essais de
fabrication du fromage EDAM**

Soutenu le: 17/09/2020

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme. BOUTELDJA Razika

MCB

Univ. de Bouira

Présidente

Mlle. BENMAIL Souhila

MAA

Univ. de Bouira

Promotrice

Mme. DJOUAHRA-FAHEM Djamila

MAA

Univ. de Bouira

Examinatrice

Année Universitaire : 2019/2020



Remerciements

Ce travail est l'aboutissement d'un dur labeur et de nombreux sacrifices. Tout d'abord, nous remercions Dieu Tout-Puissant, l'omniscient et le miséricordieux de nous avoir donné la force et la patience pour achever ce travail, qui nous a guidé sur le droit chemin et nous a donné la force, la patience, la volonté et la bonne santé pour achever ce travail.

Nous remercions vivement et chaleureusement notre promotrice M^{me} BENSMAIL Souhila pour avoir accepté de diriger ce mémoire avec une grande rigueur scientifique. On vous remercie particulièrement pour toutes les heures, les jours et les mois que vous avez passé avec patience extrême à guider et corriger ce manuscrit et aussi pour sa disponibilité, ses conseils judicieux, ainsi son soutien qui ont contribué à la réalisation et l'accomplissement de ce travail.

Nos sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail :

À notre présidente de jury M^{me} BOUTELDJA Razika de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de mémoire et à l'examinatrice M^{me} DJOUAHRA Djamila pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

Également, nous tenons à remercier les techniciens des laboratoires de Biochimie et de Microbiologie de Département de Biologie.

Enfin, nous adressons notre reconnaissance à nos familles pour le support moral, l'encouragement et la compréhension qu'elles nous ont offerts tout au long de nos études.



Dédicace

*Au terme de ce modeste travail, je tiens à remercier en premier lieu, Dieu
tout puissant de m'avoir donné la Force et le courage*

A mes très chers et adorables parents

Mon père Aissa et ma très chère mère Hamida

*pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes
études, que Dieu les bénisse.*

A mes très chers frères Khalil et Ilyas

A mon futur mari Zaki qui m'a toujours soutenu dans mes choix

A ma promotrice M^{me} Bensmail S.

A mon adorable binôme Roumaïssa

À toutes mes amies, ma famille et ma belle-famille.

Nesrine





Dédicace

Avant tout, je remercie ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui m'a aidé et m'a donné la force dans les moments difficiles d'éditer ce mémoire.

Avec toute ma gratitude, je dédie cet humble travail de mes études, à tous mes proches, particulièrement :

Ma mère Zohra et mon Père Mohammed qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse

A ceux qui sont proches de mon cœur, mes adorables sœurs Yasmine et Ihssane.

A ma chère promotrice M^{me} BENSMAIL S.

A mon cher binôme Nesrine, on a passé des bons moments ensemble que Dieu garde notre amitié pour toujours.

A tous mes collègues de promotion " Biotechnologie Microbienne".

A tous mes amies.

A tous ceux que j'aime.

Roumaïssa



Liste des abréviations

AC: Activité coagulante

CMP: Caséine macro-peptide

GRAS: *Generally Recognized As Safe*

HR: Humidité relative

LFB: Laiterie et Fromagerie de Boudouaou

OMS: Organisation Mondiale de Santé

p: poids

PDA: *Potato Dextrose Agar*

pH: potentiel d'Hydrogène

SmF: *Submerged Fermentation*

SSF: *Solid-state Fermentation*

T: Température

tr/min: tour par minute

v: volume

M: Masse molaire

Liste des figures

Figure 1 : Mécanisme général de l'action des enzymes protéolytiques.....	3
Figure 2 : Classification des fromages selon le type de coagulation.....	8
Figure 3 : Représentation schématique de la structure d'une micelle.....	10
Figure 4 : L'organisation des hyphes chez les moisissures.....	12
Figure 5 : Cycle de la reproduction sexuée et asexuée des moisissures.....	14
Figure 6 : Une représentation histologique du grain de blé.....	19
Figure 7 : Aspect macroscopique des cultures de <i>M. circinelloides</i> (à gauche) et <i>R. stolonifer</i> (à droite) sur milieu PDA âgées de 5-7 jours à 28°C.....	21
Figure 8 : Système de filtration adopté durant l'expérimentation pour la récupération des suspensions de spores de deux souches fongiques.....	22
Figure 9 : Préparation des milieux de fermentation pour chaque souche.....	23
Figure 10 : Aspect des milieux de fermentation avant de lancer la production des coagulants fongiques.....	24
Figure 11 : Effet de différentes concentrations en solution de MgCl ₂ , NaCl, KCl et CaCl ₂ sur l'extraction de la protéase coagulante d' <i>A. oryzae</i>	26
Figure 12 : Effet de différents solvants sur l'extraction l'enzyme coagulant le lait produite par <i>A. oryzae</i> sur milieu solide.....	27
Figure 13 : Effet du volume de la solution du chlorure de calcium sur l'extraction de la protéase coagulante d' <i>A. oryzae</i>	29
Figure 14 : Les étapes de transformation des fromages à pâte semi-dure.....	34

Liste des Tableaux

Tableau I : Avantages et inconvénients de la SSF par rapports la SmF.....	17
Tableau II : Composition du son de blé.....	19
Tableau III : Liste du matériel non biologique utilisé durant l'expérimentation.....	21
Tableau IV : Sélection du solvant d'extraction de la protéase de <i>R. oryzae</i>	25
Tableau V : Effet de trois solutions sur l'extraction de la protéase de <i>R. oryzae</i>	28
Tableau VI : Effet de la température sur l'extraction de la protéase coagulante d' <i>A.oryzae</i> ..	31
Tableau VII : Effet du pH de tampon phosphate 0,1 M sur l'extraction de la protéase de <i>R. oryzae</i> RO IIT RB-13.....	33

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

SOMMAIRE

Introduction1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Protéases3

1.1. Définition3

1.2. Classification3

1.3. Source des protéases4

1.3.1. Protéases végétales.....4

1.3.2. Protéases animales4

1.3.3. Protéases microbiennes.....4

1.4. Principales applications des protéases5

2. Fromage6

2.1. Classification6

2.2. Fabrication du fromage8

2.3. La coagulation du lait9

2.3.1. Les caséines du lait.....9

2.3.2. Mécanisme de la coagulation11

3. Moisissures.....12

3.1. Définition12

3.2. Morphologie des moisissures12

3.3. Classification13

3.4. Cycle de vie13

3.5. Conditions de croissance.....14

3.6. Genre Mucor.....15

3.7. Genre Rhizopus16

4. Fermentation16

4.1. Définition16

4.2. Types de fermentation17

4.2.1.	Fermentation sur milieu liquide ou submergée	17
4.2.2.	Fermentation sur milieu solide	17
4.3.	Avantages et inconvénients de la SSF	17
4.4.	Son de blé	18

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1.	Matériel	20
1.1	Matériel biologique	20
1.2	Matériel non biologique	20
2.	Méthodes.....	21
2.1.	Revivification des souches.....	21
2.2.	Préparation des inocula.....	22
2.3.	Production des coagulants fongiques	22
2.4.	Extraction des protéases	24
2.5.	Méthodes de dosage	24

Chapitre III : Résultats & discussion

I.	Effet de l'extraction sur l'activité coagulante	25
I.1.	Influence du type de solvant	25
I.2.	Influence du volume de solvant d'extraction.....	28
I.3.	Effet du temps d'extraction	30
I.4.	Effet de l'extraction répétée	30
I.5.	Effet de la température d'extraction.....	31
I.6.	Effet de l'agitation	32
I.7.	Effet du pH de solvant d'extraction	32
II.	Fabrication du fromage.....	33
Conclusion & perspectives		36
Références Bibliographiques.....		38

Annexes

Résumé

Introduction

L'utilisation des enzymes dans les processus de fermentation est connue depuis l'antiquité où plusieurs enzymes étaient appliquées dans la boulangerie, le brassage, la production du vin, la fabrication du fromage, etc. L'amélioration des connaissances et le développement des techniques analytiques ont démontré la capacité des enzymes à remplir une grande variété des fonctions non seulement dans l'industrie alimentaire, mais également dans plusieurs autres industries et domaines de recherche (**Sharma et al., 2017**).

La coagulation du lait est une étape majeure du processus de fabrication du fromage. Elle induit un changement critique de l'état liquide du lait à un état semi-solide viscoélastique sous l'action d'un agent coagulant (**Derra et al., 2017**). La présure animale, un mélange de deux enzymes (pepsine et chymosine) extrait à partir de l'estomac des jeunes veaux et autres ruminants, est l'agent coagulant traditionnellement appliqué dans la fabrication du fromage. Plusieurs protéases coagulant le lait, provenant de différentes origines, ont été étudiées dans le but de les utiliser comme des succédanés de la présure animale. La pénurie de cette dernière, son prix élevé ainsi que l'augmentation de la production du fromage sont les principaux facteurs qui ont stimulé ce domaine de recherche (**Shah et al., 2014 ; Silva et al., 2014**).

Actuellement, environ 70% du marché mondial des enzymes coagulant le lait sont représentés par la chymosine recombinante ou *Fermentation Produced Chymosin* (FPC) (**Wei et al., 2016 ; Sundarraj et al., 2018**) produite par des microorganismes génétiquement modifiés (OGM) (*E. coli*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger*) (**Corredig et Salvatore, 2016 ; Wei et al., 2016**). Cette chymosine apparaît souvent sur les étiquettes des aliments comme « présure microbienne », qui ne reflète pas si la chymosine est produite naturellement (non OGM) par le micro-organisme ou si elle est le résultat d'un OGM (**Feijoo-Siota et al., 2014**).

Avec le débat développé sur la sécurité des produits génétiquement modifiés, des recherches approfondies ont été menées sur l'étude des protéases coagulant le lait produit naturellement (maintenant appelées coagulants) par certaines espèces de levures et de moisissures (**Harboe et al., 2010 ; Mistry, 2012**).

Tous les coagulants microbiens sont produits à l'échelle industrielle par fermentation sur milieu solide (ou *Solid State Fermentation*, SSF) ou liquide (*Submerged Fermentation*, SmF) et sont directement sécrétés dans le milieu de culture sous une forme diluée exempte de protéines cellulaires dans la plupart des cas de manière extracellulaire, ce qui simplifie

grandement les processus d'extraction et de purification (**Harboe et al., 2010; Yegin et al., 2011**). Les champignons filamenteux ont été largement exploités par comparaison aux bactéries, en raison de l'activité coagulante très élevée des protéases produites en grande quantité dans le milieu de fermentation, qui est dans la majorité des cas à base des déchets agroalimentaires, ce qui réduit considérablement les coûts de production (**Silva et al., 2014**).

Dans ce cadre, notre travail porte sur l'étude des protéases coagulant le lait produites par deux souches fongiques locales *Mucor circinelloides* et *Rhizopus stolonifer*. La fermentation sur milieu solide est le procédé choisi pour leur production. Deux objectifs sont visés par notre étude :

- Du fait de l'importance de l'étape d'extraction, différentes solutions seront testées afin de sélectionner la meilleure assurant la récupération d'un rendement important en protéases à partir du moût de la fermentation ;
- L'application des extraits enzymatiques de *M. circinelloides* et *R. stolonifer* dans des essais de production du fromage à pâte pressée non cuite type EDAM. Avant de procéder à la fabrication, une étape préliminaire de purification est visée afin d'améliorer la qualité des extraits fongiques.

Sur le point de commencer à avancer dans les manipulations afin d'atteindre nos objectifs et orienter les recherches selon les résultats obtenus, une pandémie sévit dans la plupart des pays du monde. Elle était connue sous le nom du nouveau coronavirus COVID-19. Comme ce virus est très contagieux et se propage rapidement et continuellement dans la population humaine; des stratégies strictes ont été mises en œuvre pour la prévention et le contrôle de cette maladie dans les pays touchés. L'Algérie étant parmi ces pays, il a été décidé que la majorité des citoyens doivent rester en quarantaine. De ce fait, nous avons arrêté le reste de nos travaux expérimentaux.

1. Protéases

1.1. Définition

Les protéases, appelées également peptidases ou enzymes protéolytiques (**Shamsi et al., 2016**), sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques reliant les acides aminés dans une chaîne polypeptidique (**Fig. 1**). La grande variété des protéases et leur spécificité d'action ont attiré l'attention pour possible exploitation dans diverses applications physiologiques, biotechnologiques et industrielles (**Sawant et Narendra, 2014**).

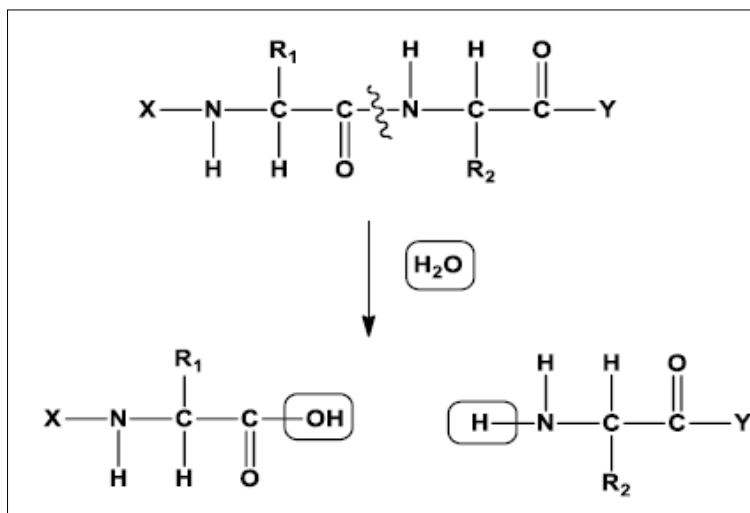


Figure 1 : Mécanisme général de l'action des enzymes protéolytiques (**Homaei et al., 2016**).

1.2. Classification

Les protéases sont généralement classées en endopeptidases et exopeptidases. Les exopeptidases clivent la liaison peptidique à proximité des extrémités N- et C-terminal (aminopeptidases et carboxypeptidases, respectivement) (**Sawant et Narendra, 2014**). Les endopeptidases ou protéinases hydrolysent les liaisons peptidiques au milieu des chaînes polypeptidiques (**Homaei et al., 2016**). Elles sont classées en six groupes importants selon la nature de l'acide aminé au niveau du site actif impliqué dans l'hydrolyse du substrat, à savoir : les protéases à sérine, à acide aspartique, à cystéine, à acide glutamique, à thréonine et les métalloprotéases. Certaines protéases possèdent à la fois une fonction endo- et exopeptidase (**Jarocki et al., 2015**). Les protéases peuvent également être classées en fonction de la plage du pH pour laquelle elles ont l'activité la plus élevée : protéases acides (pH 2–6), neutres (pH 6–8) et alcalines (pH 8–13) (**Souza et al., 2015**).

1.3. Source des protéases

Les protéases sont omniprésentes dans diverses sources : les plantes, les animaux et les micro-organismes (**Singh et al., 2016a**).

1.3.1. Protéases végétales

Les plantes comme source de protéases ont de nombreuses considérations qui incluent la dépendance aux conditions climatiques favorables et la disponibilité des terres agricoles pour la culture (**Gurumallesh et al., 2019**). Elles sont très utilisées dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. Parmi les protéases végétales largement exploitées : la bromélaïne, la ficine et la papaïne extraites à partir d'*Ananas comosus*, *Ficus carica* et *Carica papaya*, respectivement. Ces protéases sont utilisées pour différentes applications telles que : l'attendrissement de la viande, la coagulation du lait, la digestion, le traitement de certaines pathologies virales et le cancer (**Singh et al., 2016a**).

1.3.2. Protéases animales

Les protéases animales les plus couramment utilisées sont la présure, la chymotrypsine, la trypsine pancréatique et la pepsine extraites de plusieurs ruminants, des volailles et des porcs. Ces enzymes jouent un rôle fondamental dans le processus digestif (**Singh et al., 2016a; Gurumallesh et al., 2019**). La trypsine est utilisée dans la lutte biologique contre les insectes nuisibles et la préparation des milieux de culture microbiens avec peu d'applications médicales et analytiques. La chymotrypsine et la chymosine sont largement utilisées afin de réduire l'allergénécité des protéines du lait de vache consommé par les enfants et dans la production du fromage, respectivement (**Singh et al., 2016a**). Cependant, la production de ces enzymes dépend de la disponibilité de bétail pour l'abattage, qui à son tour est régi par les réglementations agricoles (**Jabalia et al., 2014**).

1.3.3. Protéases microbiennes

Pour répondre à la demande toujours croissante de protéases pour diverses applications, les micro-organismes sont devenus la source préférée par rapport aux autres sources en raison de la facilité de production et de manipulation génétique. Les protéases microbiennes constituent le plus grand groupe d'enzymes industrielles et représentent plus de 60% des ventes mondiales totales d'enzymes. Les sources fongiques utilisées pour produire ces enzymes hydrolytiques appartiennent principalement aux genres *Aspergillus*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Thermomyces*, etc. Bien que les protéases fongiques aient une vitesse de réaction et une stabilité thermiques inférieures à celles des enzymes bactériennes, elles présentent une plus grande variété et une large spécificité de substrat (**Singh et al., 2016a**).

La production de protéases fongiques a un avantage par rapport aux protéases d'origine bactérienne car le mycélium peut être facilement éliminé par filtration. En outre, l'utilisation

de champignons comme producteurs d'enzyme est plus sûre que l'utilisation de bactéries, puisqu'elles sont normalement reconnues comme GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Souza *et al.*, 2015).

1.4. Principales applications des protéases

Les protéases sont très demandées en raison de leurs applications biotechnologiques vastes et différentes, Elles peuvent être utilisées comme des médicaments, dans l'isolement cellulaire, dans la formulation de détergents et des produits cosmétiques, dans l'industrie alimentaire et de textiles, ... etc.

1.4.1. L'industrie de détergents

Les protéases sont utilisées comme l'un des constituants clés dans la formulation de détergents afin d'améliorer les performances du lavage domestique en solution, le nettoyage des lentilles de contact et les prothèses dentaires. Le plus souvent, ces protéases appartiennent à la sous-classe des protéases à sérine produites par des souches *Bacillus* spp. Les protéases alcalines provenant de sources fongiques gagnent également un intérêt en raison de la facilité de traitement en aval. Dans de nombreuses formulations, un mélange de différentes enzymes (protéases, amylases, cellulases et lipases) est également utilisé pour améliorer l'effet du lavage à des fins domestiques (Singh *et al.*, 2016a).

1.4.2. Industrie alimentaire

Les protéases sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour l'amélioration continue de la qualité organoleptique des produits (la saveur, l'arôme, la couleur, la texture, l'apparence et la valeur nutritive) et pour modifier les propriétés fonctionnelles, telles que la coagulation, l'émulsification, le moussage, la force du gel, la fixation des graisses, ...etc.

La production de plusieurs variétés de fromages se base sur l'addition des protéases au lait afin d'hydrolyser des liaisons peptidiques spécifiques de la caséine conduisant à la formation du caillé. En industrie de boulangerie, l'utilisation d'une large gamme de protéases garantit l'uniformité de la pâte, réduit sa consistance, maintient la force du gluten dans le pain et améliore sa saveur et sa texture, ...etc. (Singh *et al.*, 2016b).

1.4.3. Industrie de cuir

Le traitement de cuir implique l'utilisation des produits chimiques, toxiques et dangereux, qui génèrent une pollution de l'environnement et un effet néfaste sur les organismes vivants. Par conséquent, les procédés d'épilation à base de protéases sont actuellement appliqués dans cette industrie afin d'améliorer la qualité et réduire la pollution de l'environnement. Avant d'utiliser une protéase donnée dans tel processus, un criblage

approfondi doit être effectué pour obtenir une enzyme spécifique au substrat (kératine) afin d'éviter la dégradation des autres constituants (Gurumallesh *et al.*, 2019).

1.4.4. Applications thérapeutiques

La grande diversité et la spécificité des protéases microbiennes sont largement utilisées à des fins thérapeutiques et de diagnostic. La serratio-peptidase produite par l'espèce *Serratia*, est la protéase la plus efficace utilisée contre l'inflammation et pour soulager les douleurs. La protéase d'*Aspergillus oryzae* est utilisée comme aide digestive pour guérir la carence en enzymes lytiques. L'asparaginase d'*Escherichia coli* et la collagénase de *Clostridium* sont utilisées dans le traitement de la leucémie lymphocytaire, des brûlures et des plaies, respectivement. La nattokinase de *Bacillus subtilis* est utilisée comme anticoagulant pour le traitement des maladies cardiovasculaires. En tant que médicament contre les traumatismes, ces enzymes hydrolytiques sont appliquées pour traiter les cicatrices, régénérer les épithéliums et accélérer les processus de guérison. Plusieurs protéases d'origine bactérienne et fongique présentent également des propriétés antimicrobiennes (Singh *et al.*, 2016a).

2. Fromage

Le fromage est le nom générique d'un groupe de produits alimentaires à base du lait fermenté (Fox, 1993). Il est généralement produit à partir du lait pasteurisé (traitement à 72°C pendant 15s) (Hougaard *et al.*, 2010). Le fromage est une source très riche en nutriments essentiels, en particulier en protéines, calcium, peptides bioactifs, acides aminés, lipides, en acides gras, vitamines et en sels minéraux (Walther *et al.*, 2008).

2.1. Classification

Actuellement les fromages sont classés selon la nature de l'agent coagulant (enzyme protéolytique, un agent acidifiant, ou mixte) ; la texture et la teneur en humidité (très dur, dur, semi-dur, à pâte molle, ...) ; fromage affiné ou frais, et selon la microflore d'affinage (flore interne, bactéries de surface, moisissures internes ou de surface, bactéries acide propénoïque) (Fig. 2) (Fox *et al.*, 2017).

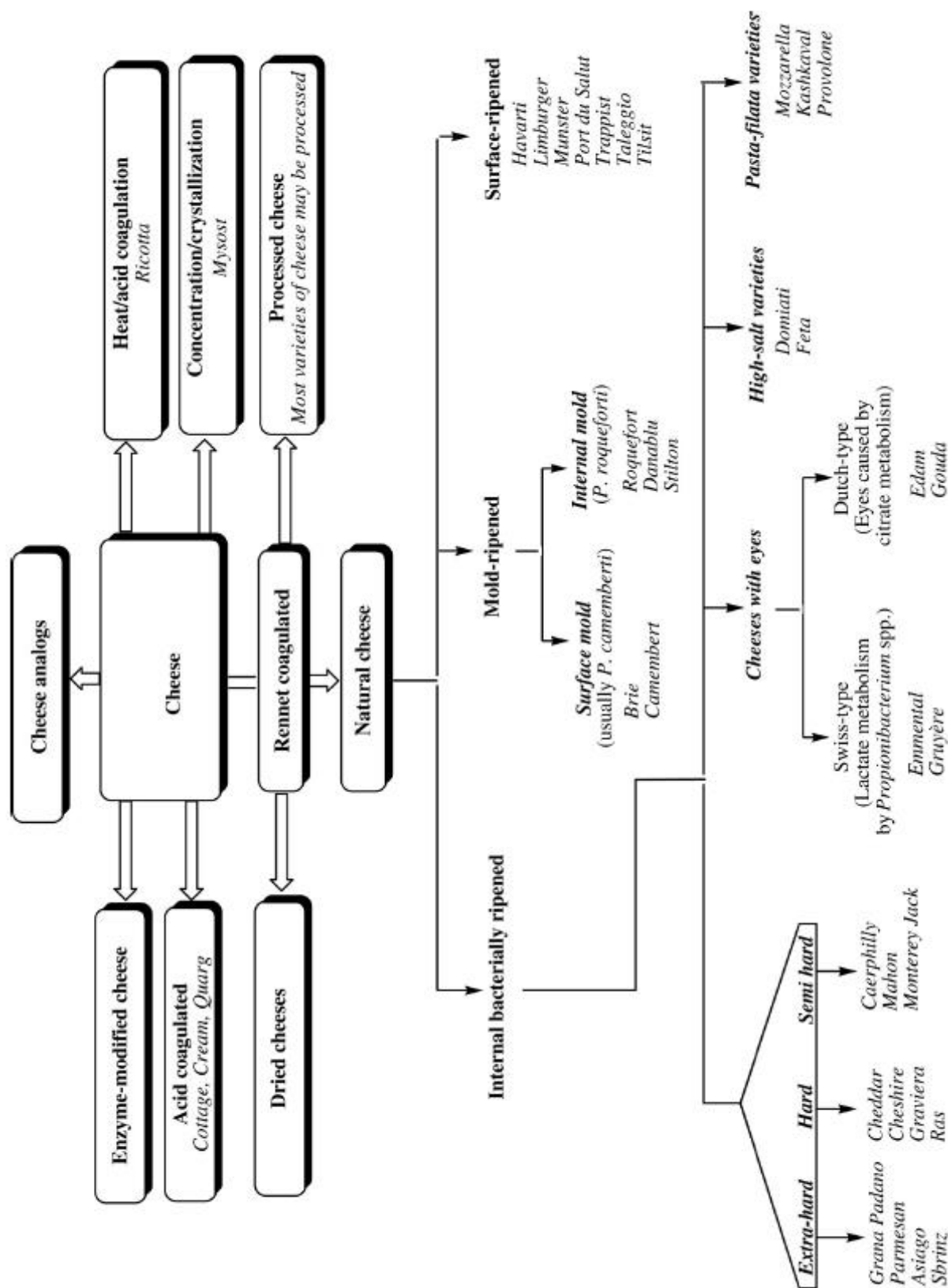


Figure 2 : Classification des fromages selon le type de coagulation et le procédé d'affinage (Mcsweeney *et al.*, 2017) (voir traduction Fig.1 Annexe 1).

Les variétés de fromages sont classées en superfamilles en fonction de la méthode de coagulation, puis subdivisées en fonction des principaux agents d'affinage et/ou des caractéristiques technologiques.

2.2. Fabrication du fromage

La fabrication du fromage est un processus qui implique la conversion du lait liquide (une matière première instable, volumineuse mais très nutritive) en fromage (un produit stable, savoureux et concentré qui procure du plaisir alimentaire et a une durée de conservation prolongée) (Legg *et al.*, 2017). La fabrication moderne du fromage comprend l'ingénierie avancée, la biotechnologie et la science alimentaire. Malgré ça, cette opération est considérée comme un processus ancien et de nombreuses procédures standards de fabrication sont basées sur des pratiques traditionnelles (Powell *et al.*, 2016).

Bien qu'il existe de nombreux types de fromage, mais certaines étapes de fabrication sont en communs pour plusieurs d'entre elles (Olson, 2003). Le déroulement des différentes étapes de fabrication du fromage est illustré dans la Fig.2 **Annexe 1**.

2.2.1 Préparation du lait : cette étape consiste à préparer le lait qui inclue la standardisation des niveaux de caséine et de matière grasse pour atteindre les proportions requises pour un type de fromage particulier et la pasteurisation pour contrôler la microflore du fromage (Grappin et Beuvier, 1997). Dans certains cas, le lait cru peut être utilisé afin que la microflore du lait puisse conférer des caractéristiques sensorielles particulières (Coker *et al.*, 2005).

2.2.2 Coagulation : est le changement de l'état liquide du lait en présence d'un agent coagulant conduisant à la séparation du caillé de caséines du lactosérum et ses protéines solubles (Schlienger et Rolling, 2011).

2.2.3 Egouttage : il a pour but la séparation entre le caillé, composé de certains éléments du lait qui sera ultérieurement soumis à l'affinage, et le lactosérum. Il s'agit donc d'une phase essentielle qui conditionne directement la composition du fromage et son devenir au cours de l'affinage. Il se traduit par une élimination importante de lactosérum qui s'accompagne d'une rétraction et d'un durcissement du gel (Ramet *et al.*, 1985).

2.2.4 Salage : est l'une des dernières étapes du processus de fabrication du fromage pour divers types. Il est réalisé soit par l'ajout direct et mélange de cristaux de sel sec à des morceaux de caillé brisés ou broyés à la fin de la fabrication (salage à sec) ou par immersion du caillé dans de la saumure (salage en saumure). Le sel en fromagerie joue deux rôles principaux, à savoir agit comme conservateur et contribue directement à la saveur et à la qualité du fromage. Il affecte également la microbiologie du fromage en augmentant la pression osmotique de sa phase aqueuse, provoquant la déshydratation des cellules bactériennes, soit en les

inactivant, soit en empêchant leur croissance (**Kapoor et al., 2004 ; Mcsweeney, 2007**).

2.2.5 Affinage : il correspond à une phase de digestion enzymatique (**Turcot et al., 2002**), principalement de deux composants majeurs : les protéines et la matière grasse par protéolyse et lipolyse. Au cours de cette phase, le fromage subit des modifications profondes liées à sa composition physico-chimique, qui influe son aspect, ses qualités organoleptiques, sa digestibilité et sa valeur nutritive (**Ramet et al., 1985**).

2.3. La coagulation du lait

La coagulation du lait est la principale étape dans la production du fromage (**Mohamed et al., 2015**). Elle correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine du lait réalisée par trois manières :

- Voie enzymatique par des enzymes coagulantes, en particulier la présure.
- Voie fermentaire par des bactéries productrices d'acide contenant naturellement dans le lait ou apportées sous forme de ferments, ou par un agent acidulant (HCl, acide gluconique- δ -lactone).
- Voie mixte entre les deux processus déjà signalés

Les mécanismes d'action de ces agents coagulants au niveau de la micelle sont très différents, bien qu'ils conduisent tous les deux à la formation d'un coagulum (gel ou caillé) (**Ramet et al., 1985**).

2.3.1. Les caséines du lait

Les caséines sont des phosphoprotéines synthétisées sous un contrôle multi-hormonal complexe et représentent la fraction protéique la plus abondante dans le lait. Elles proviennent de l'expression de quatre chaînes polypeptidiques distinctes : les caséines α_1 , β , α_2 et κ , dont les structures sont maintenant connues pour plusieurs espèces (**Perinelli et al., 2019; Rijnkels et al., 2003**). Elles sont codées par quatre gènes (CSN1S1, CSN1S2, CSN2 et CSN3) situés sur le chromosome 6 et présentent des taux de mutation élevés (**Fuerer et al., 2020**). En effet, la teneur en caséines des laits est très variable, près de 80% des protéines du lait des ruminants, mais pour le lait humain, leur pourcentage n'excède pas 50%. Au-delà de cette variabilité globale, il existe des différences de proportions relatives des caséines entre les espèces (**Léonil et al., 2013**).

Les micelles de caséine sont des agrégats à peu près sphériques stabilisés en suspension colloïdale dans le lait (**Alessi et al., 2007**). Elles contiennent 92% de protéines et une fraction

minérale de 8%. Les minéraux sont constitués de 90% de phosphate de calcium et de 10% d'ions citrate et magnésium. Leur diamètre moyen est d'environ 180 nm mais peut varier de 30 à 600 nm (McMahon et Brown, 1984). Les micelles sont formées de sous-micelles reliées ensemble par des ponts phosphate de calcium. Les sous-micelles périphériques sont plus hydrophiles et contiennent une plus grande proportion de casein- κ (Fig. 3) (Vignola, 2002).

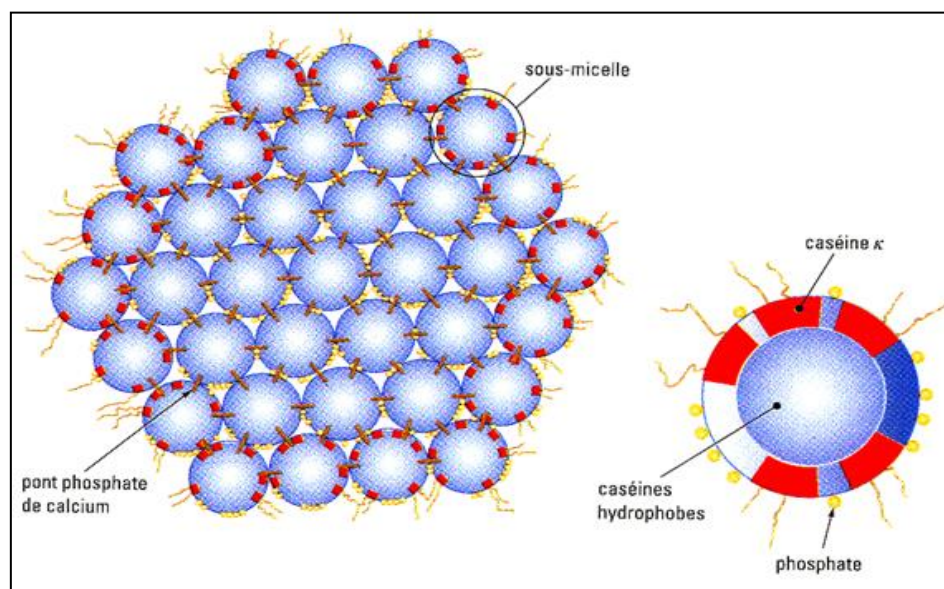


Figure 3 : Représentation schématisques de la structure d'une micelle (Vignola, 2002).

1. Les caséines α s

La caséine α_1 est le constituant majoritaire des caséines du lait. Les deux extrémités N- et C-terminal de la molécule sont hydrophobes contrairement à d'autres caséines, ce qui conduit à la formation d'interactions intramoléculaires et intermoléculaires. Elle est la plus sensible à l'action des ions Ca^{2+} (Madadlou et Azarikia, 2013). La caséine α_2 comporte 207 acides aminés avec un grand nombre de chaînes latérales chargées positivement en particulier dans le segment C-terminal. Elle contribue avec 29% de la teneur totale en caséines (Selvaggi *et al.*, 2014).

2. Les caséines β et γ

La caséine- β est composée de 209 acides aminés avec un poids moléculaire ~ 24 kDa. Elle représente environ 37% des caséines du lait de vache et est la plus hydrophobe grâce à sa queue C-terminale riche en résidus proline (17%) (Bahri *et al.*, 2019). Les caséines γ sont des fragments C-terminal résultant de la protéolyse de la caséine- β par la plasmine (Rutigliano *et al.*, 2018).

3. La caséine- κ

La caséine- κ est une molécule amphiphile avec un seul résidu phosphoséryl. Elle est chargée de fragments tri-saccharide ou tétra-saccharide situés dans le segment C-terminal. Le reste de la molécule a un caractère hautement hydrophobe. Elle contient 169 résidus d'acides aminés (Eskin et Goff, 2013), pour une masse moléculaire moyenne de 19 kDa (Brulé *et al.*, 1997) dont 11,8% sont de la proline (Eskin et Goff, 2013) et représente 8–15% du total des caséine (Fuc *et al.*, 2018).

2.3.2. Mécanisme de la coagulation

La coagulation enzymatique du lait se déroule en trois étapes désignées communément par :

- L'hydrolyse de la protéine stabilisatrice des micelles, la caséine- κ ;
- L'agrégation et la gélification des micelles modifiées par l'enzyme coagulante ;
- Le développement d'un gel particulier (Fox *et al.*, 2017).

1. Phase primaire

L'activité de la chymosine ou d'autres enzymes protéolytiques (avec quelques exceptions) pendant la phase primaire est l'hydrolyse de la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caséine- κ (Lucey, 2011). Cela produit la paracaséine- κ (résidus 1-105), assez hydrophobe qui reste attaché aux autres caséines, et le caséinomacropéptide (CMP) (résidus 106-169) qui est très hydrophile, libéré dans le lactosérum (Hyslop, 2003).

2. Phase secondaire

Elle correspond au processus physique de la coagulation qui implique l'agrégation des micelles modifiées par voie enzymatique, ou les micelles de paracaséine, conduisant à la formation d'un coagulum (Zobrist *et al.*, 2005). Après avoir perdu sa queue soluble dans l'eau, les caséines ne peuvent plus se séparer, elles commencent donc à former des chaînes et des amas. Les grappes continuent de croître jusqu'à former un réseau continu en trois dimensions, qui emprisonne l'eau à l'intérieur et forme un gel comme dernière étape du processus (Fox *et al.*, 2017).

3. Moisissures

3.1. Définition

Les moisissures sont des champignons filamenteux microscopiques (Viel *et al.*, 2019), ayant un rôle important dans les processus biotechnologiques en tant que producteurs d'enzymes et de composés naturels utilisés en médecine, dans la production de biocarburants, des pigments et autres métabolites (Schuster et Kahmann, 2019). Ce sont des eucaryotes, hétérotrophes dont la plupart sont des saprophytes dans le sol et sur la matière organique en décomposition. Elles sont caractérisées par une gamme de systèmes membranaires internes, des organites liés à la membrane et une paroi cellulaire bien définie composée en grande partie de polysaccharides (glucane, mannane), de chitine et de chitosane (Warnock, 2012).

3.2. Morphologie des moisissures

Les moisissures sont des organismes multicellulaires présentant un corps ou une structure végétative appelée « thalle ». Ce dernier est constitué de longs filaments fins et ramifiés à structure cellulaire appelée « hyphe » (*du grec hyphe : tissu*) qui forme le « mycélium ».

Chez certains champignons filamenteux, le protoplasme coule dans l'hyphe sans être interrompu par des cloisons transversales, ce sont des hyphes coenocytiques ou aseptés (Fig. 4a). Les hyphes des autres champignons (Fig. 4b) ont des cloisons transversales appelées septums, percées soit d'un pore unique (Fig. 4c), soit de pores multiples (Fig. 4d), qui permettent le passage du cytoplasme. On les désigne comme des hyphes septés. La nature filamenteuse des hyphes donne une surface relativement grande par rapport au volume du cytoplasme ce qui rend possible une absorption nutritive adéquate par osmotrophie (Joanne *et al.*, 2018).

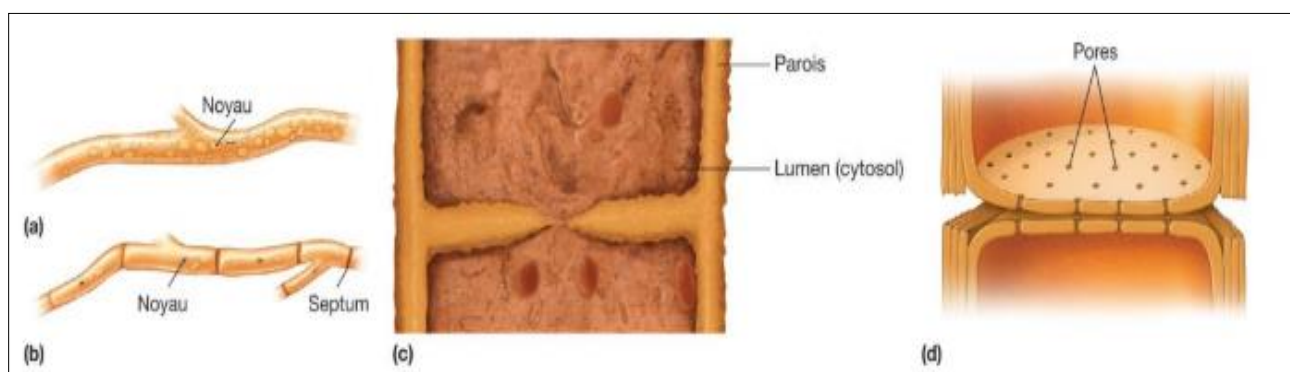


Figure 4 : L'organisation des hyphes chez les moisissures : (a) hyphes coenocytiques (non septés), (b) hyphes divisés en cellules par des septums, (c) septum uni-pore (d) septum multi-perforés (Joanne *et al.*, 2018).

3.3. Classification

Les moisissures s'imposent comme un règne distinct dans la classification actuelle du vivant qui regroupe les eucaryotes (*Eucarya*), les archées (*Archaea*) et les bactéries (*Bacteria*) (Woese *et al.*, 1990). Elles sont classées en fonction de critères phénotypiques historiquement définis en quatre catégories : Phycomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes et les Deutéromycètes ou fungi imperfecti (Ainsworth, 1973). Au cours de ces dernières années, l'introduction des critères génotypiques a contribué dans le développement important de cette classification (Hibbett *et al.*, 2007; Spatafora *et al.*, 2016). La nouvelle classification adoptée est rendue possible grâce au séquençage des nombreux génomes fongiques actuellement disponibles (Spatafora *et al.*, 2016).

Le groupe des moisissures est composé actuellement d'un sous-règne, de 7 divisions et de 10 sous-divisions (Hibbett *et al.*, 2007; Spatafora *et al.*, 2016). Le sous règne des *Dikarya* comporte deux divisions, *Ascomycota* et *Basidiomycota*. La division des *Ascomycota* se scinde en trois sous-divisions (*Pezizomycotina*, *Saccharomycotina* et *Taphrinomycotina*), tandis que la division des *Basidiomycota* se divise en trois sous-divisions (*Pucciniomycotina*, *Ustilaginomycotina* et *Agaricomycotina*) (Spatafora *et al.*, 2017). Les autres divisions sont : *Mucoromycota*, *Zoopagomycota*, *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota* et *Cryptomycota*. La division des *Mucoromycota* regroupe les trois sous-divisions *Mucoromycotina*, *Mortierellomycotina* et *Glomeromycotina*, tandis que la division des *Zoopagomycota* regroupe les sous-divisions *Zoopagomycotina*, *Kickxellomycotina* et *Entomophthoromycotina* (Spatafora *et al.*, 2016; Morin-Sardin *et al.*, 2017).

3.4. Cycle de vie

La reproduction chez les moisissures s'effectue par deux modes (Fig. 5) :

- 1. Reproduction asexuée** : elle se fait sans fusion de gamètes et correspond majoritairement à la dispersion de spores asexuées produites par des structures spécialisées développées à partir du mycélium. Différents types de spores asexuées ont été décrits sur la base de leur mode de production : (a) les arthrospores se développant à partir d'un fragment parent de mycélium ; (b) les sporocystiospores qui sont produites de manière endogène à l'intérieur de sporocystes et (c) les conidies ou conidiospores générées de manière exogène et en continu à l'extrémité de structures spécialisées appelées cellules conidiogènes (annélides, phialides, ... etc.) (Barnett et Hunter 1998).

2. **Reproduction sexuée** : il s'agit de la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium à (n) chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui donne une zygospore qui germe de nouveau pour former un mycélium à $2n$ chromosomes (Roquebert, 2002).

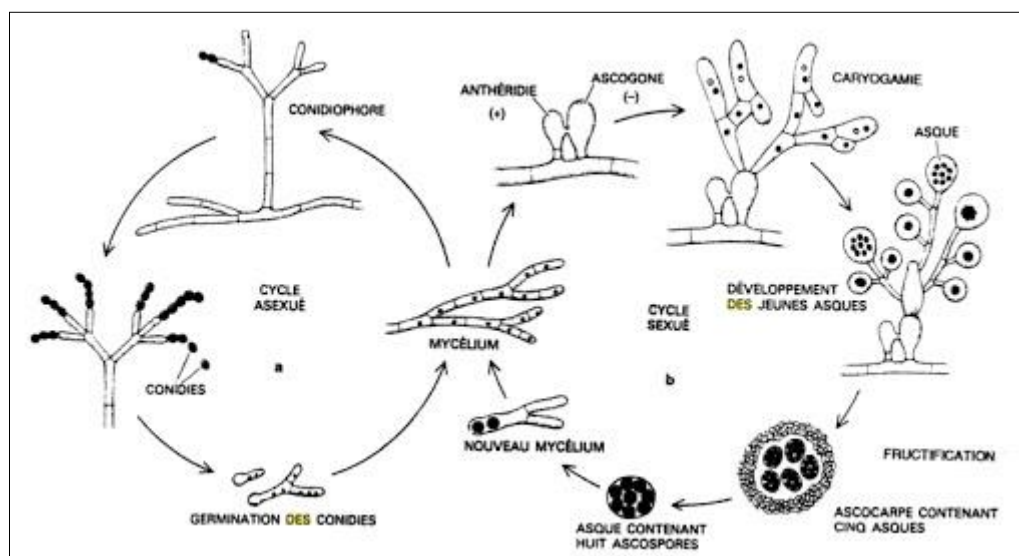


Figure 5 : Cycle de la reproduction sexuée et asexuée des moisissures (Jennings et Lysek, 1996).

3.5. Conditions de croissance

Les moisissures sont omniprésentes dans la nature et leur développement nécessite des facteurs nutritifs et environnementaux. Elles sont généralement considérées comme des hétérotrophes qui dépendent des éléments nutritifs tels que : le carbone et l'azote comme composés organiques, les ions minéraux comme le potassium, le phosphore, le magnésium, le fer ou le soufre. Elles nécessitent aussi d'autres molécules qui peuvent pénétrer dans la cellule sans transformation comme les acides aminés ou après une digestion enzymatique des molécules complexes comme l'amidon, la cellulose ou les protéines (Cole, 1996; Botton *et al.*, 1990). Les différents modes de nutrition des champignons filamenteux sont : le saprophytisme (Martins *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016), la symbiose (Ray et Craven, 2016), le parasitisme (Dean *et al.*, 2012).

Le développement des moisissures est également dépendant de l'environnement, Le facteur le plus important est l'humidité relative (HR). La majorité des moisissures se développent en présence d'une activité d'eau comprise entre 0,85-0,99 (Lahouar *et al.*, 2016). Le deuxième facteur est la température, dont les exigences thermiques pour le développement diffèrent d'une moisissure à l'autre. La majorité de ces microorganismes sont

mésophiles qui se développent entre 20-25°C, mais il existe certaines moisissures dites psychrophiles, thermophiles et thermo-tolérantes (**Botton et al., 1990**). Les moisissures sont des microorganismes aérobies et qui se développent sur des milieux à pH compris entre 4,5–8 ; bien que le pH optimum soit entre 5,5–7,5 (**Larpen-Gourgand et Sanglie, 1992**).

3.6. Genre *Mucor*

Le genre *Mucor* a été décrit premièrement par Fresenius en 1850 (**Nguyen et al., 2020**), c'est un groupe de champignons phylogénétiquement ancien appartenant aux premières lignées divergentes de champignons (**Lebreton et al., 2020**). Il appartient à la famille des Mucoracées, ordre Mucorales, sous-embranchement *Mucoromycotina*. Il comprend le plus grand nombre d'espèces au sein des Mucorales (**Nguyen et al., 2020**). Les espèces appartenant à ce genre sont principalement saprophytes colonisant des environnements multiples et différents, des excréments ou des matières végétales mortes au tissus végétaux et animaux (**Lebreton et al., 2020**).

Les caractères morphologiques des espèces de *Mucor* ont été largement signalés par Schipper (**Schipper, 1967; 1969; 1970; 1976**) et Zycha (**Zycha et al., 1969**). Les hyphes des *Mucor* sont généralement siphonnés et larges avec un diamètre pouvant atteindre 15 µm. La présence de septums chez les *Mucor* ne se rencontre que pour séparer les organes de reproductions sexuée et asexuée du reste du mycélium (**Stajich et al., 2009**) ou lors de l'isolement des parties sénescents pour éviter la propagation de composés toxiques dans tout le mycélium (**Carlile, 1995**). L'extension mycélienne est générée au niveau de l'apex des hyphes (**Morin-Sardin et al., 2017**). Le mycélium des *Mucor* est haploïde et multi-nucléé, seules les cellules issues de la reproduction sexuée générant les zygospores, sont diploïdes (**Morin-Sardin et al., 2017**).

En effet, les différentes espèces appartenant au genre *Mucor* sont utilisées depuis des siècles dans la fabrication des aliments, l'affinage du fromage, la production de certains aliments fermentés asiatiques et africains. Certaines espèces ont également marqué leur exploitation dans l'industrie en raison de leur taux de croissance rapide, leurs activités protéolytiques et lipolytiques élevées et leur capacité à produire divers métabolites secondaires (**Walther et al., 2013; Lebreton et al., 2020**). D'autres applications comprennent : la production des biocarburants, production des stéroïdes et des terpénoïdes pour des intérêts pharmaceutique et médical, et plusieurs autres biotransformations (**Alves et al., 2002**). 26 souches appartenant à 6 espèces différentes (*M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. genevensis*, *M.*

piriformis, *M. racemosus* et *M. variosporus*) sont connues par la production des taux très élevés en polygalacturonases, amylases et en protéases (**Morin-Sardin et al., 2017**).

3.7. Genre *Rhizopus*

La description de *Rhizopus* a été faite pour la première fois par Ehrenb en 1821. Il appartient à la famille des *Rhizopodaceae*, ordre des Mucorles. On le trouve presque partout dans le sol, les excréments d'animaux et la végétation en décomposition (**Gryganskyi et al., 2018; Slaviero et al., 2020**).

Il est habituel de distinguer les espèces de *Rhizopus* en fonction de caractéristiques morphologiques et physiologiques distinctes, comme : la température maximale de croissance, la formation de structures morphologiques (chlamydo-spores, sporanges et rhizoïdes), les caractéristiques des sporangiophores (couleur, forme et taille), le diamètre des sporanges, la production des acides, ...etc. La classification de *Rhizopus* publiée par **Schipper (1984)** a séparé le genre en trois groupes, *R. microsporus*, *R. stolonifer* et *R. arrhizus (oryzae)*, en fonction de la ramification des rhizoïdes, la température de croissance et la taille des sporanges et des sporangiophores (**Gryganskyi et al., 2018**).

Les souches de *Rhizopus* sont utilisées depuis longtemps en industrie pour la production des acides lactique, fumarique et malique par le complexe *R. arrhizus/R. delemar*, la synthèse de l'éthanol, des caroténoïdes et des enzymes hydrolytiques (protéases, lipases) ainsi que d'autres acides organiques (**Dolatabadi et al., 2016; Gryganskyi et al., 2018**). Certaines espèces sont utilisées comme des organismes modèles dans l'étude de la biologie cellulaire et moléculaire fongique, dont d'autres sont considérées comme des agents phytopathogènes ou causent des maladies chez les animaux, y compris les humains (**Gryganskyi et al., 2018**).

4. Fermentation

4.1. Définition

Le mot « fermentation » vient du verbe latin *fevere*, qui signifie bouillir (**Okafor, 2016; Thatoi et al., 2020**). La fermentation est définie comme une transformation chimique impliquant la participation d'enzymes et des catalyseurs organiques générés par une gamme de micro-organismes qui comprennent les bactéries, les levures et les champignons (**Batt, 2016; Ojha et al., 2017**).

Depuis la préhistoire la fermentation a été utilisée pour fabriquer de la bière, du pain, du fromage, du vin et d'autres produits alimentaires. Aujourd'hui, et avec le développement de la technologie de fermentation, plusieurs produits sont fabriqués, notamment des carburants, des

produits chimiques, des enzymes, des antibiotiques et des produits pharmaceutiques (Anderson, 2009).

4.2. Types de fermentation

Les processus de fermentation peuvent être divisés en deux systèmes : la fermentation submergée (SmF) et la fermentation à l'état solide (SSF).

4.2.1. Fermentation sur milieu liquide ou submergée

La fermentation submergée (*Submerged fermentation ; SmF*) a été appliquée depuis longtemps par rapport à la fermentation sur milieu solide (Suriya *et al.*, 2016). Elle implique l'inoculation de la culture microbienne dans un milieu liquide qui est optimisé avec les nutriments nécessaires pour avoir une meilleure croissance et production du métabolite recherché (Doriya *et al.*, 2016).

4.2.2. Fermentation sur milieu solide

La fermentation à l'état solide (*Solid-state fermentation, SSF*) est définie comme un processus de bioconversion dans lequel les micro-organismes se développent sur des substrats solides humides en absence d'eau libre (Martínez-Medina *et al.*, 2019). Les processus SSF sont principalement utilisés pour la transformation des aliments et la production d'enzymes à l'aide de micro-organismes principalement les champignons filamenteux (Malakar *et al.*, 2020), puisque leurs hyphes peuvent se développer à la surface des déchets agricoles, pénétrer à l'intérieur des espaces entre les particules et coloniser les substrats solides (Nighojkar *et al.*, 2019).

Plusieurs applications de la fermentation à l'état solide par intervention biotechnologique ont été étudiées pour la transformation d'aliments, la production de boissons, des pigments, des arômes, des antibiotiques, des biosurfactants, des enzymes (amylases, lipases, phytases, cellulases, protéases, tannases, chitinases, ...ect), des acides organiques, ...etc (Mitchell *et al.*, 2011; Malakar *et al.*, 2020). Les substrats largement utilisés pour les systèmes SSF sont : le son de blé, le son de riz et la bagasse de canne à sucre (Patnala *et al.*, 2016).

4.3. Avantages et inconvénients de la SSF

La fermentation solide est généralement connue pour offrir une série d'avantages opérationnels et économiques par rapport à son homologue la fermentation submergée. Une gamme d'avantages et des inconvénients de la SSF par rapport à SmF est résumée dans le

Tableau I : Avantages et inconvénients de la SSF par rapports la SmF. (Fellows, 2009; Ramos et Malcata, 2011; De Castro *et al.*, 2018; Martinez-Medina *et al.*, 2019; Nighojkar *et al.*, 2019).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Elle ressemble à l'habitat naturel de plusieurs micro-organismes en particulier les moisissures. – Assure des rendements et des productivités plus élevés. – Une stabilité accrue des produits élaborés. – Les milieux de culture requis ne sont pas très complexes. – Les substrats peuvent être utilisés tels quels (ou enrichis en nutriments supplémentaires). – Des coûts énergétiques inférieurs (la stérilisation, l'agitation mécanique et l'aération ne sont pas toujours nécessaires). – Meilleure circulation de l'oxygène. – Moins de risques de contamination. – Volume de bioréacteur est faible. – La technologie des réacteurs est simple. – La faible disponibilité en humidité peut favoriser la production de composés qui ne peuvent pas être produits en culture submergée. – Absence de formation de mousse donc pas besoin d'agent anti-mousse. 	<ul style="list-style-type: none"> – Contrôle difficile des paramètres du processus (la teneur en humidité, l'oxygène et la biomasse produite). – Le coût de récupération est élevé. – Les temps de cycle de fermentation sont plus longs car des volumes d'inoculum élevés sont nécessaires et les spores inoculées ont un temps de latence avant la germination. – Un risque de contamination par des champignons indésirables. – Mélange d'éléments nutritifs non uniforme. – Difficultés du passage entre les échelles. – Accumulation de la chaleur. – Produit d'intérêt plus impurité.

4.4. Son de blé

De nombreuses recherches ont été effectuées sur le son de blé, dont la majorité se concentre sur les facteurs alimentaires, mais l'utilisation biotechnologique du son de blé a également retenu l'attention, surtout comme substrat de fermentation pour la production de différentes enzymes. Le son de blé est un sous-produit agroindustriel (Higuchi, 2014). La **Fig. 6** illustre les différentes couches constituant le son de blé : la couche d'aleurone, la couche

hyaline, le testa ou le tégument, le péricarpe intérieur et le péricarpe extérieur (**Emanuelli et al., 2014**).

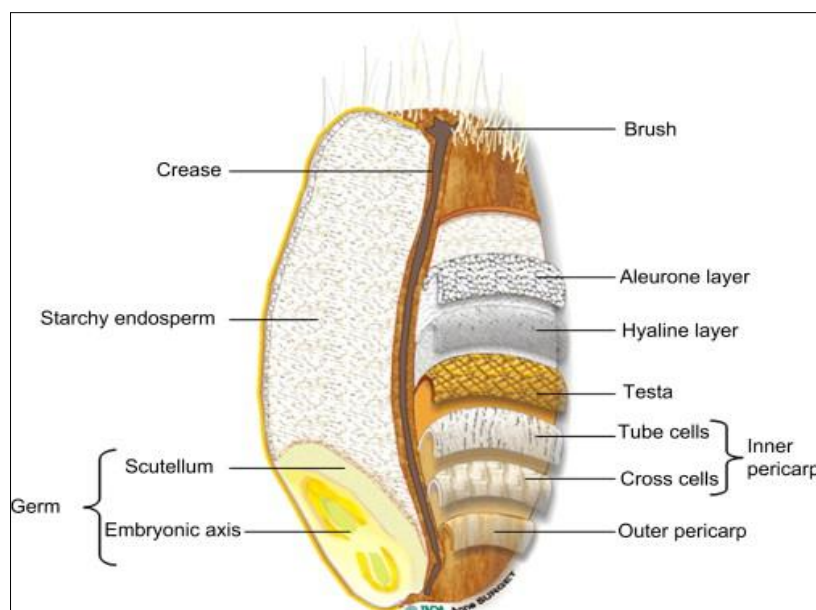


Figure 6 : Une représentation histologique du grain de blé (**Emanuelli et al., 2014**).

Le son de blé est riche en fibres, la plupart d'entre eux sont des fibres alimentaires insolubles (**Tableau II**), représentant une bonne source de protéines, de minéraux, de vitamines et d'antioxydants. Les principaux composants fibreux du son de blé sont les hémicelluloses, principalement les arabinoxylanes. Le péricarpe et le testa sont des tissus hydrophobes qui contiennent des quantités importantes de lignine et de cellulose. La couche d'aleurone est composée d'arabinoxylanes relativement linéaires fortement substitués par l'acide férulique, de β -glucanes, qui sont le principal composant de la fibre soluble du son de blé, la plupart des phytates et les minéraux essentiels présents dans le grain (**Emanuelli et al., 2014**).

Tableau II : Composition du son de blé (**Emanuelli et al., 2014**).

Constituant	Quantité (g/100 g)
Humidité (%)	1,5-2,2
Protéines	13,6-15,9
Lipides	4,1-8,1
Glucides	14,7-28,1
Cendres totales	4,3-6,1
Fibres insolubles	32,1-48,4
Fibres solubles	1,2-4,0

Ce travail a été réalisé au niveau des Laboratoires de Biochimie et de Microbiologie, Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre (SNV-ST, Université Akli Mohand Oulhadj-Bouira).

Vers la fin de l'année 2019, une nouvelle épidémie a été identifiée. Elle est provoquée par un nouveau type de virus de la famille des *Coronaviridae*, temporairement appelé «nouveau coronavirus», 2019-nCoV. L'organisation mondiale de santé (OMS) a déclaré que l'épidémie est une urgence internationale et lui a attribué les noms de SARS-CoV2 (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère 2) et COVID-19. Cette pandémie a affecté rapidement et profondément chaque partie de la vie quotidienne. En raison de la prévalence du coronavirus (COVID-19) en Algérie, le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique (MESRS) a décidé de fermer les universités afin d'éviter la contamination par le COVID-19 et rester en quarantaine en tenant compte des mesures de prévention jusqu'à ce qu'il existe des solutions pour le traiter.

Pour cela, nous n'avons pas eu l'opportunité de continuer la partie pratique de notre projet de fin cycle (Master II) au niveau des laboratoires de la faculté, afin d'obtenir les résultats souhaités et achever le reste du travail en stage pratique dans la Laiterie et Fromagerie de Boudouaou (LFB) pour la production du fromage. Avant le déclenchement de la pandémie, nous avons déjà commencé à travailler sur une fraction minimale de la partie expérimentale, qui sera expliquée dans ce chapitre.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Les deux espèces fongiques utilisées dans ce travail, *Mucor circinelloides* DIV16/2095-2047 et *Rhizopus stolonifer* DIV16/2095-2048-1, ont été isolées à partir des sols agricoles provenant de deux Wilayas du centre d'Algérie (Bouira, Tipaza) puis identifiées sur la base de leurs propriétés phénotypiques (aspect macroscopique et microscopique) et génotypiques (Bensmail *et al.*, 2020).

1.2. Matériel non biologique

L'ensemble du matériel non biologique utilisé durant notre partie expérimentale est illustré dans le **Tableau III**.

Tableau III : Liste du matériel non biologique utilisé durant l'expérimentation.

Appareillage	Verrerie et petit matériel
Autoclave (Systec BD-23), agitateur magnétique couplé à une plaque chauffante (HOT plate stirrer), balance (KERN 440-35N), balance analytique (OHAUS), étuve (Mettler, Heraeus 9209), bain-marie (Nuve bath), pH mètre (METTLER TOLDO), ...etc.	Bécher, fioles jaugées 250 mL, entonnoir ; Erlenmeyers 250 mL, pipettes graduées, tubes à essai,...etc. Boîtes de Pétri, anse de platine, micropipettes : 100µL et 1mL, coton cardé, papier Wattman n°1, parafilm, bec Bunsen...etc.

2. Méthodes

2.1. Revivification des souches

Les deux souches fongiques sont revivifiées par prélèvement de quelques spores et/ou des fragments de mycélium à partir des cultures conservées sur milieu PDA (g/L: 200g Pomme de terre, 20g Glucose, 17g Agar-agar) (Guiraud, 2012) en tubes à essai ou coulé dans des boîtes de Pétri. Par la suite, les boîtesensemencées sont incubées à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 5-7 jours jusqu'à l'obtention d'une sporulation complète.

La **Figure 7** représente l'aspect des deux souches fongiquesensemencées sur le milieu PDA après la période d'incubation.

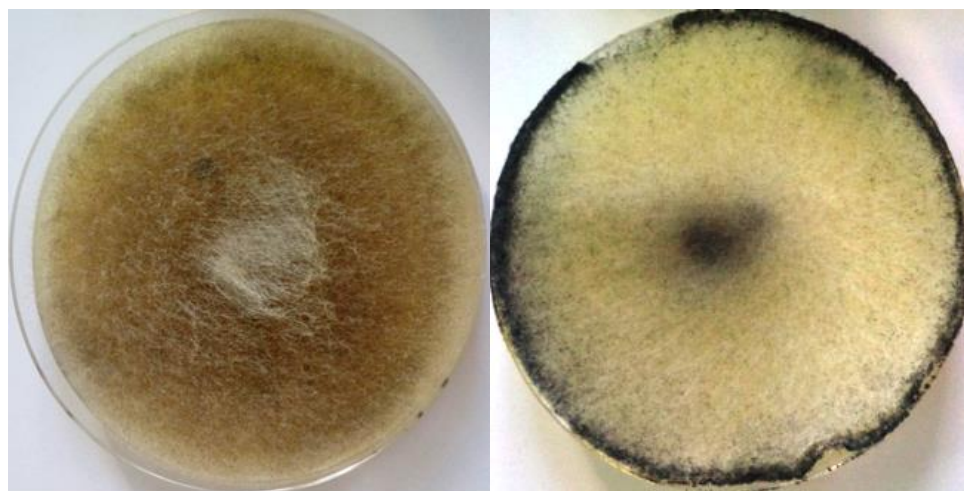


Figure 7 : Aspect macroscopique des cultures de *M. circinelloides* (à gauche) et *R. stolonifer* (à droite) sur milieu PDA âgées de 5-7 jours à 28°C .

2.2. Préparation des inocula

La préparation des suspensions de spores à partir des cultures fongiques a été effectuée par l'addition de 10 mL d'une solution stérile de Tween 80 à 0,1% pour chaque boîte de Pétri (Agrawal *et al.*, 2005). À l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose afin de libérer le maximum de spores en suspension, sans toucher la gélose elle-même. Une étape de filtration à travers le papier Wattman n°1 entreposé sur un entonnoir stérile, assure la récupération des spores dans un tube à essai stérile et élimine les autres débris de mycélium (Fig. 8). Tous les constituants du système ont été stérilisés au préalable à 120°C pendant 20 min, alors que la filtration a été conduite entre deux bacs Bunsen afin d'assurer en mieux la zone d'asepsie. Les suspensions de spores récupérées sont conservées à -18°C jusqu'à utilisation ultérieure.

Le dénombrement de spores sera réalisé suite à quelques étapes de dilution à partir de la suspension mère pour chaque souche séparément, *via* la cellule de Malassez sous microscope photonique au grossissement GX40.



Figure 8 : Système de filtration adopté durant l'expérimentation pour la préparation des suspensions de spores des deux souches fongiques.

2.3. Production des coagulants fongiques

La fermentation sur milieu solide est le procédé choisi pour produire les protéases coagulant le lait par les deux souches fongiques sélectionnées. Au total 12 Erlenmeyers de 250 mL ont été utilisés durant cette étape (Fig. 9). Ce nombre a été divisé en deux, dont six Erlenmeyers sont réservés pour chaque souche fongique. Le substrat utilisé pour la production des enzymes par *M. circinelloides* et *R. stolonifer* est le son de blé, mais la préparation des

milieux de fermentation sera spécifiée pour chaque souche vu la différence de certaines conditions de production.



Figure 9 : Préparation des milieux de fermentation pour chaque souche.

Dans le cas de *M. circinelloides*, nous avons introduit dans chaque Erlenmeyers 10g de son de blé additionné de 0,1g du sulfate d'ammonium puis mélangés et humidifiés avec 10 mL de la solution M-9 dont le pH a été ajusté à 4,23 avant stérilisation (**Bensmail et al., 2019**). La composition de la solution minérale M-9 est la suivante (g/L) : NaH_2PO_4 12,8 ; KH_2PO_4 3 ; NaCl 0,5 ; NH_4Cl 1 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 (**Tunga et al., 1998**). L'addition de la solution minérale au substrat de la fermentation sur milieu solide permet de l'enrichir avec des oligo-éléments, de lui assurer une certaine humidité et de régler son pH (**Krishna, 2005; Singhania et al., 2017**).

Pour *R. stolonifer*, une quantité de 5g du son de blé a été introduite dans chaque Erlenmeyers. 0,1g de xylose et 0,04g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont ajoutés puis mélangés avec le substrat de la fermentation. Le taux d'humidité a été régulé par l'addition de 6 mL de la solution M-9 avec un pH ajusté à une valeur de 6,0.

Après la préparation des milieux de fermentation, tous les Erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé puis coiffés avec du papier aluminium avant de lancer la stérilisation à 115°C pendant 15 min (**Fig. 10**). Suite au refroidissement, les Erlenmeyers ont été conservés à 4°C avant de procéder à l'ensemencement et l'incubation sous les conditions optimales de production.

Malheureusement, l'expérimentation au niveau du laboratoire a été arrivée à ce stade là avant de commencer la stratégie de confinement imposée par l'état afin de prévenir la propagation de la pandémie du COVID-19 au niveau des établissements universitaires.



Figure 10 : Aspect des milieux de fermentation avant de lancer la production des coagulants fongiques.

2.4. Extraction des protéases

L'objectif de notre travail est d'étudier l'influence de certaines solutions sur l'extraction des protéases coagulant le lait produites par les deux souches fongiques à partir du moût de fermentation. Pour cette raison, nous avons préparé six Erlenmeyers pour chaque cas. Les solutions qui ont été choisies sont: KCl à 0,05%, CaCl₂ à 0,05%, (NH₄)₂SO₄ à 0,05%, glycérol à 10%, Tween 80 à 5% et l'eau distillée qui est utilisée comme témoin.

Le protocole d'extraction selon **Tunga**, après 3 jours de fermentation, la matière fermentée a été entièrement écrasée et trempée pendant 2 h avec 5 fois le volume d'eau à température ambiante (30°C). Le liquide a ensuite été séparé par filtration sur tissu de coton et le filtrat a été centrifugé à 10 000 xg pendant 10 min en utilisant un rotor pré-refroidi à 4°C (Remi-24, Inde) pour éliminer les spores et autres matières insolubles. Le surnageant a été stocké à 4°C et utilisé comme source d'enzyme (**Tunga et al., 2003**).

2.5. Méthodes de dosage

Il était prévu que pour chaque extrait brut, trois types de dosage seront réalisés. Il s'agit du dosage des protéines (**Bradford, 1976**), la détermination de l'activité coagulante (**Arima et al., 1970**) et l'estimation de l'activité protéolytique (**Anson, 1938**) (voir **annexe 2**). Avant d'être appliqué dans un essai de fabrication du fromage à pâte pressée non cuite type EDAM, les deux extraits bruts présentant les meilleures activités coagulantes, pour chaque souche, doivent passer par une étape de purification partielle (précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse) afin de réduire le maximum des contaminants ayant un effet négatif sur la qualité des extraits bruts comme des substituants de la chymosine commerciale.

I. Effet de l'extraction sur l'activité coagulante

Selon notre recherche dans la littérature, peu de travaux ont été publiés sur l'influence de la méthode d'extraction et ses conditions sur l'activité coagulante des protéases d'origine fongique. Aucun article n'a été publié sur l'effet de cette étape sur l'activité coagulante des protéases produites par les deux espèces choisies dans notre étude, *M. circinelloides* et *R. stolonifer* cultivées sur milieu solide. Pour cette raison, les résultats détaillés et discutés dans ce chapitre sont obtenus à partir des travaux lancés sur des souches fongiques du genre *Rhizopus* et *Aspergillus* et qui ne sont pas obligatoirement des producteurs de protéases coagulant le lait.

La fermentation à l'état solide est une fermentation en absence ou presque absence d'eau libre, dont la récupération du produit de fermentation nécessite son extraction par l'addition d'un solvant approprié (Aikat et Bhattacharyya, 2000).

I.1. Influence du type de solvant

Dans le travail publié par Ikasari et Mitchell (1996), le maximum d'activité de la protéase acide de *R. oligosporus* ACM 145F a été atteint avec l'utilisation de la solution NaCl à 5% (p/v) comme solvant d'extraction. La substitution de l'eau distillée par le tampon citrate (0,1 M ; pH 4) n'a pas révélé une différence significative, tandis que la solution d'HCl à 0,1 M a induit une diminution de l'activité récupérée par environ 50%.

Les travaux de Tunga *et al.* (1998), ont révélé que l'éthanol à 10% (v/v) a contribué dans l'amélioration de l'extraction de la protéase de *R. oryzae* NRRL-21498, par rapport aux autres solutions testées (Tableau IV), probablement due à sa constante diélectrique la plus basse qui assure une interaction plus forte avec la protéase. Cette interaction a été considérée plus importante que la force de liaison établie entre l'enzyme produite et le substrat de la fermentation (le son de blé) (Tunga *et al.*, 1999).

Tableau IV : Sélection du solvant d'extraction de la protéase de *R. oryzae* (Tunga *et al.*, 1999).

Solvant d'extraction	Activité protéolytique (U/mL d'extrait)
Eau distillée	34,5
Tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5)	38
Glycérol à 10%	54
Ethanol à 10%	61,5
Méthanol à 10%	46
Acétone à 10%	30

Dans la même étude et vu l'effet positif de l'éthanol et le glycérol sur le rendement en activité protéolytique extraite du substrat fermenté, des essais d'extraction ont été lancés avec des mélanges entre les deux alcools. Selon les résultats du dosage réalisé sur les extraits bruts récupérés, un mélange contenant 10% d'éthanol et 3% de glycérol assure le maximum d'extraction. **Tunga et al. (1999)** ont suggéré que les groupes hydroxyles de l'éthanol et du glycérol peuvent former des liaisons hydrogènes avec les molécules de protéine, ce qui améliore la stabilité de l'enzyme durant le processus d'extraction.

Au total l'effet de dix solutions entre minérales, alcools et solvants organiques a été étudié sur le rendement en protéase coagulant le lait produite par *Aspergillus oryzae* à partir du moût de fermentations. Les solutions choisies par **Shata (2005)** sont : l'eau distillée, l'eau de robinet, NaCl, CaCl₂, MgCl₂, KCl, le glycérol, l'éthanol, le méthanol et l'acétone, testées à une concentration de 5%. Les résultats illustrés sur les figures (11 et 12), montrent que la solution de CaCl₂ à 0,05% assure la meilleure extraction (AC = 2520 U/g de son de blé) suivie par le glycérol (1725 U/g de substrat) et l'acétone. L'eau distillée et l'eau de robinet ont assuré les plus faibles taux d'extraction.

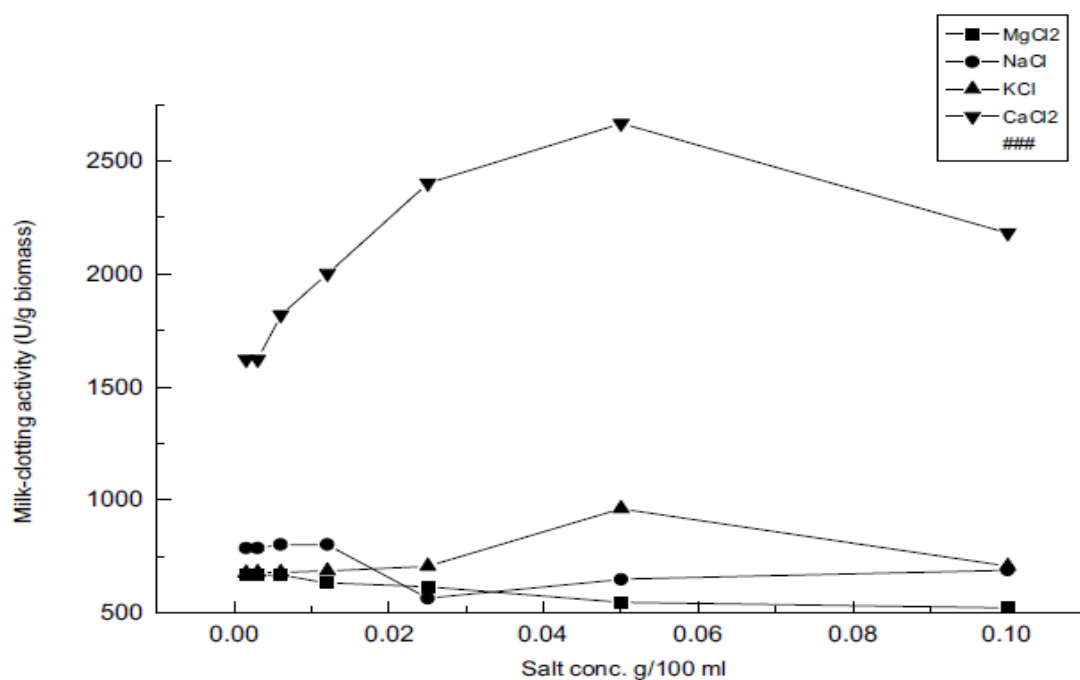


Figure 11: Effet de différentes concentrations en solution de MgCl₂, NaCl, KCl et CaCl₂ sur l'extraction de la protéase coagulante d'*Aspergillus oryzae* (**Shata, 2005**).

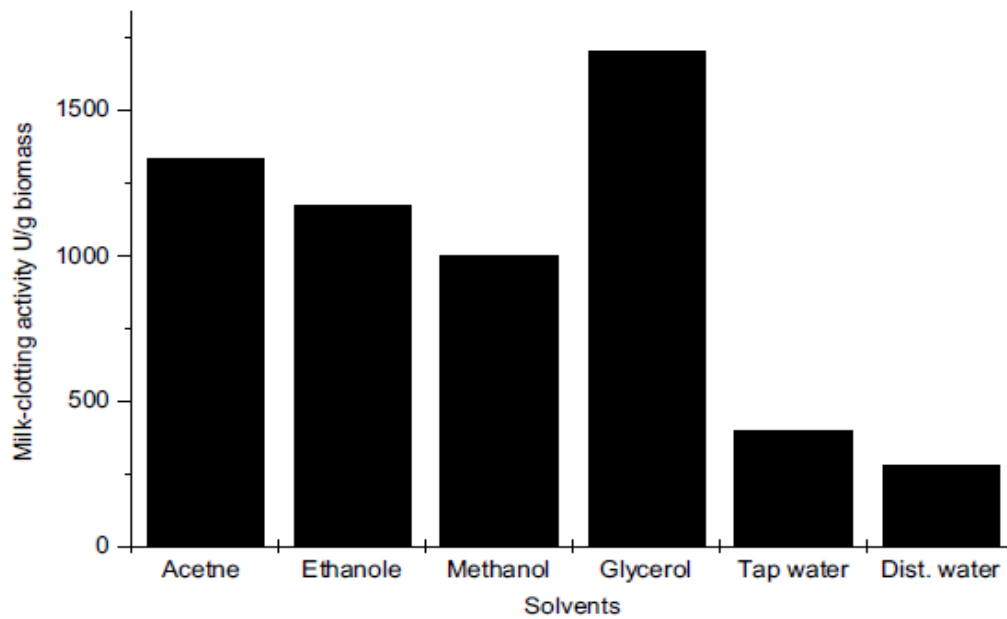


Figure 12 : Effet de différents solvants sur l'extraction l'enzyme coagulant le lait d'*A. oryzae* produite sur milieu solide (Shata, 2005).

L'interprétation de ces résultats a été basée sur deux points :

- L'amélioration de la solubilité de l'enzyme à des faibles concentrations en sel (ou le Salting-in) est favorisée par l'augmentation des interactions électrostatiques entre la protéine et le solvant ;
- Des travaux antérieurs ont suggéré puis démontré la présence de faibles liaisons ioniques entre la protéase produite et le substrat de fermentation ainsi qu'avec la paroi des cellules fongiques productrices. L'addition de la solution saline permet de briser cette interaction et augmente la solubilité de la protéase d'intérêt (Wang 1967 ; Corpe et Winters, 1973; Shata, 2005).

D'un autre côté, l'augmentation de la concentration du glycérol jusqu'à 40% n'a pas permis d'atteindre celle obtenue avec la solution de CaCl_2 . Ce faible pouvoir extractant du glycérol a été expliqué par l'effet de la viscosité du glycérol sur le transfert de la matière (Shata, 2005).

L'efficacité relative de quatre types d'alcool sur l'extraction de la protéase coagulante d'*Aspergillus oryzae* NCIM 1032, produite par fermentation sur une mixture du son de blé et de riz, a été étudiée par Pati Pallavi *et al.* (2012). Les alcools testés à une concentration de 5% (v/v) sont : l'éthanol, le sorbitol, le méthanol, le glycérol par comparaison à l'eau distillée comme témoin. Les résultats de cette étude révèlent que le glycérol garantis le maximum

d'extraction avec une AC = 1194,4 U/g de substrat (une augmentation de 96% par rapport le témoin) suivi par le sorbitol en suite l'éthanol et en dernier on trouve l'eau distillée. On constate que ces résultats sont très proches de ceux aboutis par **Shata (2005)**.

L'eau distillée, la solution Czapek-Dox et le tampon phosphate (0,6 M ; pH 7) sont les trois solutions utilisées par **Aikat et Bhattacharvya (2000)** pour extraire la protéase de *R. oryzae* produite sur son de blé. Le dosage de l'activité protéolytique montre que le tampon phosphate favorise le meilleur rendement d'extraction, par contre aucune différence n'a été signalée entre l'effet de l'eau de distillée et la solution du Czapek-Dox (**Tableau V**).

Tableau V : Effet de trois solutions sur l'extraction de la protéase de *R. oryzae* (**Aikat et Bhattacharvya, 2000**).

Solvant d'extraction	Activité enzymatique (U/g du son de blé)	Activité spécifique (U/mg)
Eau distillée	60,02	1,83
Czapek-Dox	62,07	1,81
Tampon phosphate (0,6 M; pH 7)	85,29	4,25

Contrairement aux résultats précédents, l'étude menée par **Irfan et al. (2011)** a prouvé que l'eau distillée assure la meilleure extraction de deux protéases produites par *R. oligosporus* M-30 et *R. arrhizus* M-26 par comparaison aux solutions suivantes : Tween 80 (0,1% ; v/v), NaCl (0,1% ; p/v), tampon citrate (pH 5) et tampon phosphate (pH 7). La composition chimique des tampons et leur pH ont probablement un effet inhibiteur sur l'activité des protéases et non pas sur leur pouvoir d'extraire l'enzyme d'intérêt à partir du milieu de fermentation (**Ikram et al., 2003 ; Irfan et al., 2011**). Cela est dû à un changement du degré d'ionisation des groupes à l'intérieur ou à proximité du site actif de l'enzyme qui sont impliqués dans la liaison et/ou la conversion des substrats (**Khatun et al., 2001**).

I.2. Influence du volume de solvant d'extraction

Aikat et Bhattacharvya (2000) ont également étudié l'effet du volume d'eau distillée ajouté au substrat de la fermentation sur le rendement en protéase extraite. La gamme choisie pour élucider cet effet varie entre 10 et 60 mL d'eau distillée/10 g du son de blé, ce qui représente un rapport de 1:1–6 (p/v). Le processus d'extraction pour toutes les expériences a été conduit pendant une nuit complète à 4°C sous agitation. Le maximum d'activité de la protéase de *R. oryzae* a été noté avec l'addition de 50 mL d'eau distillée et l'augmentation de ce volume a un effet diluant ce qui provoque la diminution de l'activité.

Les mêmes observations ont été signalées par **Tunga et al. (1999)** avec l'utilisation de l'éthanol à 10% comme solvant d'extraction. Les faibles rendements d'extraction obtenus à des rapports inférieurs à 1 :5 (p/v) sont provoqués par l'insuffisance du volume de solvant à pénétrer dans toute la masse du substrat utilisé (**Tunga et al., 1999**).

Du même, **Shata (2005)** a essayé d'optimiser le volume de la solution du CaCl_2 (0,05% ; p/v) afin d'atteindre le maximum d'activité enzymatique récupérée à partir du milieu de fermentation. L'intervalle étudié était entre 2,5–30 mL/g du son de blé. Cette fois l'extraction a été effectuée sous agitation à 30°C pendant 3 h. Les résultats ont été similaires à ceux de l'étude précédente avec un optimum obtenu en utilisant 50 mL de la solution minérale (rapport 1:5 v/p). Par contre, l'augmentation de ce volume induit à une chute dans l'efficacité de l'extraction et de l'activité selon la **Fig. 13**, interprétée sur la base de l'effet diluant du solvant et la récupération d'autres enzymes non spécifiques à partir du moût de fermentation.

En revanche, les résultats d'**Ikasari et Mitchell (1996)** ont abouti à un rapport optimal de 1:10 (p/v) probablement influencé par l'effet absorbant du substrat utilisé qui est le son de riz.

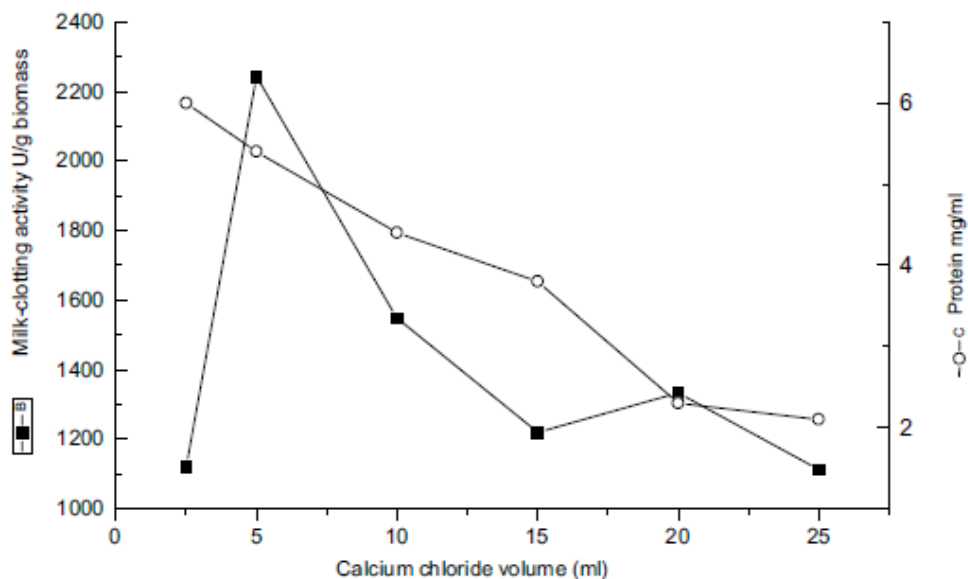


Figure 13 : Effet du volume de la solution du chlorure de calcium sur l'extraction de la protéase coagulante d'*A. oryzae* (**Shata et al., 2005**).

I.3. Effet du temps d'extraction

Le temps de contact entre le solvant et le substrat de fermentation est un autre paramètre important de l'extraction qui doit être également optimisé.

Des temps d'extraction qui varient entre ½ h et 6 h ont été choisis par **Tunga et ses collaborateurs (1999)** pour évaluer l'influence de ce paramètre. Le maximum d'activité de la protéase de *R. oryzae* NRRL-21498 a été récupéré après 2 h d'agitation qui diminue légèrement en prolongeant la durée d'extraction.

Quatre-vingt-dix pour cent (90%) de la protéase de *R. oryzae* RO IIT RB-13 ont été récupérés après 2 h d'extraction à 4°C, tandis que l'extraction complète a été achevée après 10h. Des périodes d'extraction plus prolongées jusqu'à 96 h n'ont pas entraîné une augmentation significative de l'activité protéolytique récupérée à partir du substrat fermenté (**Aikat et Bhattacharvya, 2000**).

Par contre, les travaux de **Shata (2005)**, ont démontré qu'un temps de 3 h était l'optimum pour atteindre le maximum d'extraction de la protéase coagulant le lait d'*A. oryzae* à 30°C et sous agitation (100 rpm/min). Au-delà de ce temps, le rendement en activité était stable malgré la prolongation de la durée d'extraction jusqu'à 48 h.

Ikasari et Mitchell (1996) ont étudié l'influence de cette condition sur l'extraction de la protéase acide de *R. oligosporus* produite par SSF. Ils ont conclu que la récupération maximale de l'enzyme était obtenue à 22°C après agitation pendant pendant 1 h et c'est la période la plus faible par rapport aux autres résultats. Il est très intéressant de noter que plus de 75% de l'activité a été récupérée après 2 min uniquement, probablement induit par la nature du substrat utilisé et les autres conditions de l'extraction. Le substrat utilisé durant cette étude est le son de riz présentant une faible capacité d'absorber l'eau par rapport le son de blé, ce qui assure une libération plus rapide de l'enzyme dans le solvant d'extraction. En plus les conditions pratiquées durant l'extraction (addition de 100 mL du solvant, agitation à 80 rpm à 22°C) ont participé dans la récupération de ce taux durant les premières minutes de l'extraction.

1.4. Effet de l'extraction répétée

Des expériences d'extraction ont été effectuées afin de déterminer si la plupart des protéases produites par *R. oryzae* NRRL-21498 (**Tunga et al., 1999**), *R. oryzae* RO IIT RB-13 (**Aikat et Bhattacharvya, 2000**) et *A. oryzae* (**Shata, 2005**) pouvaient être récupérées en une seule étape ou elle nécessite plusieurs lavages avec un nouveau volume du solvant

d'extraction. Trois répétitions de la procédure d'extraction ont été lancées pour les deux premières protéases, par ailleurs le nombre de répétitions a été augmenté jusqu'à cinq fois dans le cas de la protéase coagulante d'*A. oryzae*.

Les résultats ont été différents pour chaque cas :

- Pour la protéase de *R. oryzae* NRRL-21498, il a été avéré que les deux premiers lavages sont largement suffisants pour récupérer une quantité maximale d'enzyme. Ce nombre de répétition a été réduit avec l'application d'une certaine pression lors du filtration du mélange substrat fermenté/solvant d'extraction, ce qui est davantage plus économique. La force de pression appliquée sur le substrat humidifié permet d'expulser la majorité du volume ajouté au substrat, qui entraîne avec lui la protéase soluble (**Ikasari et Mitchell (1996)**).
- La protéase élaborée par *R. oryzae* RO IIT RB-13 nécessite une seule étape d'extraction (**Aikat et Bhattacharvya, 2000**).
- Par contre, la protéase coagulant le lait d'*A. oryzae*, exige jusqu'à quatre lavages afin de libérer presque toute la quantité de l'enzyme dans le solvant d'extraction (CaCl₂ à 0,05%; p/v) (**Shata, 2005**).

La répétition au-delà de ces optimums pour les trois cas n'a pas favorisée des améliorations remarquables.

1.5. Effet de la température d'extraction

Pour évaluer l'effet de ce paramètre sur le processus d'extraction du coagulant d'*A. oryzae*, une série d'expériences a été réalisée sur la gamme de température variant de 10 à 70°C avec un intervalle de 10°C où les autres conditions du processus ont été maintenues à un niveau optimal. Les résultats présentés dans le **Tableau VI**, montrent que l'activité coagulante récupérée augmente avec l'augmentation de la température, vu son effet positif sur l'amélioration de la diffusion et la solubilité de l'enzyme, jusqu'à atteindre l'optimum qui est de 30°C. Par contre, au-delà de cette valeur, l'activité enzymatique diminue jusqu'à l'inactivation totale à 70°C (perte de stabilité et dénaturation), induite par l'effet prolongé de la chaleur (3 h d'agitation) sur les propriétés structurales de l'enzyme d'intérêt (**Shata, 2005**).

Tableau VI : Effet de la température sur l'extraction de la protéase coagulante d'*A. oryzae* (Shata, 2005).

Température (°C)	Activité coagulante	
	(U/mL d'extrait)	(U/g de substrat)
10	16	80
20	26	133
30	505	2526
45	231	1154
50	53	267
60	20	100
70	0	0

Un comportement similaire a été noté durant l'optimisation de la température d'extraction pour la protéase de *R. oryzae* NRRL-21498, montrant un optimum à 30°C avec une sensibilité un peu plus élevée à l'augmentation de la température par rapport l'étude précédente (Tunga *et al.*, 1999).

I.6. Effet de l'agitation

Dans les deux études menées par Tunga *et al.* (1999) et Shata (2005), les résultats obtenus révèlent que l'extraction des protéases fongiques d'intérêt a été plus rentable sous agitation par rapport à l'état statique et elle a été sélectionnée comme la meilleure condition pour la récupération du maximum d'enzyme. Dans le cas de la protéase coagulant le lait d'*A. oryzae*, l'activité enzymatique a été améliorée par un facteur de 5,8 fois en modifiant l'état statique de l'extraction (Shata, 2005). Mais une amélioration plus faible a été observée durant l'extraction de la protéase de *R. oryzae* (un facteur de 1,25 fois) (Tunga *et al.*, 1999). Ce mouvement mécanique (agitation) aide à réduire l'adhésion de l'enzyme à la biomasse cellulaire et disperse également la masse fermentée uniformément dans la phase continue du solvant d'extraction (Tunga *et al.*, 1999; Shata, 2005).

I.7. Effet du pH de solvant d'extraction

Afin d'éclaircir l'effet de ce paramètre sur le processus d'extraction, trois solutions tampons ont été sélectionnées par Ikasari et Mitchell (1996) couvrant les trois domaines du pH : acide, neutre et basique. Il s'agit du : tampon citrate 0,1 M ; tampon phosphate 0,1 M et le tampon glycine-NaOH 0,1 M. Une augmentation progressive de l'activité récupérée à partir du son de riz fermenté par *Rhizopus oligosporus* a été repérée avec l'augmentation du pH de

la solution d'extraction (tampon) jusqu'à atteindre un maximum à pH 7, par la suite une chute rapide de l'activité a été observée au-delà de cette valeur.

La solubilité de l'enzyme dépend de l'interaction polaire avec la phase aqueuse et par conséquent, elle diminue près de son pHi. Le point isoélectrique de la protéase de *Rhizopus oligosporus* est probablement inférieur à pH 1 car il appartient au groupe de *pepsin-like enzyme*, ce qui explique la diminution de la solubilité en parallèle à la diminution du pH. Par contre, à pH alcalin, la stabilité de la protéase diminue suite au déploiement de la structure fonctionnelle (dénaturation) et perte de la stabilité (Ikasari et Mitchell, 1996)

Aikat et Bhattacharvya (2000) ont essayé d'optimiser le pH du tampon phosphate (0,2 M) comme solvant d'extraction. L'étude a été effectuée sous les conditions optimales par comparaison à l'eau distillée. L'intervalle du pH choisi est entre 4,5 et 8,0. Les résultats illustrés dans le **Tableau VII** démontrent que le pH du tampon a un effet faible sur l'extraction de la protéase de *R. oryzae* RO IIT RB-13, dont aucune différence de l'activité protéolytique récupérée n'a été détectée par rapport à l'eau distillée (Aikat et Bhattacharvya, 2000). Les autres travaux n'ont pas étudié l'influence de ce paramètre malgré l'utilisation des solutions salines et des tampons durant l'extraction (Ikrem et al., 2003 ; Shata, 2005 ; Irfan et al., 2011).

Tableau VII : Effet du pH de tampon phosphate 0,1 M sur l'extraction de la protéase de *R. oryzae* RO IIT RB-13 (Aikat et Bhattacharvya, 2000).

pH du tampon	Activité protéolytique (U/g)	Teneur en protéines (mg/g)	Activité spécifique (U/mg)
Eau distillée	59,83	33,84	1,77
Tampon phosphate			
4,5	58,75	32,76	1,79
6,0	58,86	34,13	1,73
7,0	60,52	33,36	1,81
8,0	60,84	34,34	1,77

II. Fabrication du fromage

Le fromage Edam est un fromage affiné à pâte ferme/semi-dure conformément à la *Norme générale pour le fromage* (CODEX STAN 283-1978). La pâte a une couleur allant du blanc cassé ou de l'ivoire au jaune pâle ou jaune et une texture ferme (lorsqu'on appuie dessus avec le pouce), se prêtant à la coupe, avec peu de trous de gaz, plus ou moins arrondis,

de la taille d'un grain de riz à celle d'un petit pois (ou principalement d'un diamètre allant jusqu'à 10 mm), dont la répartition est raisonnablement régulière dans tout l'intérieur du fromage, mais la présence de quelques ouvertures et fissures est acceptable. La forme est sphérique, en bloc plat ou en forme de pain. Le fromage est fabriqué et vendu avec une croûte sèche qui peut être enrobée (Codex Alimentarius, 2011). La Fig. 14 résume les principales étapes de fabrication des fromages à pâte semi-dure (exemples : Edam, Gouda).

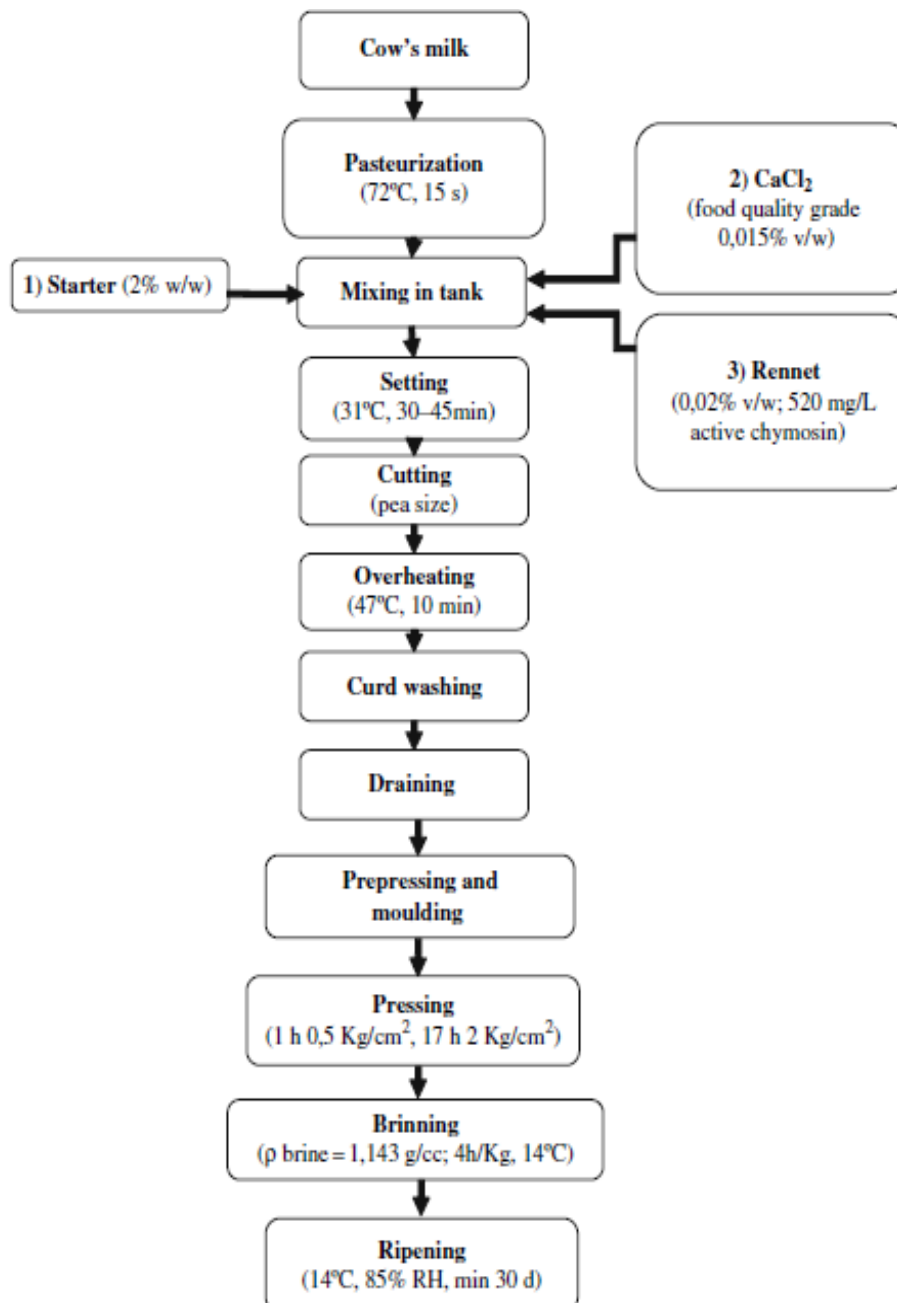


Figure 14 : Les étapes de transformation des fromages à pâte semi-dure (Ferragut et Trujillo, 2008).

Le nombre des articles publiés sur l'implication des protéases coagulant le lait d'origine fongique dans la production des différents types de fromages est très limité où nous n'avons pas trouvé des travaux qui utilisent les protéases produites par les espèces *Rhizopus* spp. et *Mucor* spp. Dans la production du fromage Edam. Pour cette raison, nous avons choisi à développer les résultats obtenus suite à l'application de la protéase pure de *M. circinelloides* dans la fabrication du fromage Cheddar qui appartient à la même famille que l'Edam. L'étude a porté sur la différence entre les rendements obtenus par l'application de cette enzyme par comparaison à la présure commerciale (Rennilase, Denmark). Le rendement obtenu dans le premier cas est de 163 g/L du lait alors que dans le deuxième était 172 g/L. La différence entre les deux rendements est estimée à seulement 5%. Cette différence peut être expliquée par la non spécificité d'action de la protéase fongique sur les caséines du lait par comparaison à celle de la présure commerciale (activité protéolytique sur les caséine- α et - β avec perte des fragments peptidiques dans le lactosérum). Par contre, aucune évaluation n'a été réalisée pour estimer les propriétés physicochimiques et sensorielles des fromages fabriqués (Sathya *et al.*, 2009).

Une autre protéase coagulante produite par *Aspergillus flavus* a été utilisée également dans des essais de fabrication du fromage Cheddar, toujours par comparaison à un témoin. Les résultats de cette étude ont suggéré la possibilité d'utiliser cette enzyme comme un succédané de la présure commerciale à l'échelle industrielle, suite à l'absence d'une différence significative pour l'ensemble des propriétés sensorielles étudiées par rapport à celles développées par la présure témoin. Ils sont arrivés également à proposer la réduction du temps d'affinage nécessaire pour la maturation du fromage et qui est induit par les propriétés protéolytiques de la protéase fongique (Sathya *et al.*, 2011).

Conclusion & perspectives

L'objectif de notre travail était l'étude de l'influence du processus d'extraction sur l'activité enzymatique de deux coagulants fongiques produits par *Mucor circinelloides* et *Rhizopus stolonifer*, pour une possible exploitation en fromagerie en tant qu'agents coagulant le lait.

En raison de la situation prolongée du confinement à cause de la pandémie du COVID-19, la nature de notre travail a été modifiée d'une étude pratique à celle théorique, où nous avons basé pour la préparation de ce manuscrit sur les articles publiés en relation étroite avec notre sujet.

Le peu des articles publiés sont menés sur l'étude de l'influence des conditions de l'extraction (type du solvant d'extraction et son volume, effet du temps et la température d'extraction, le pH du solvant et l'agitation) sur les protéases coagulant le lait produites par les souches fongiques du genre *Rhizopus* et *Aspergillus*.

Selon les travaux consultés, nous avons constaté que dans la majorité des cas, l'utilisation des solutions minérales assure des rendements d'extraction plus élevés par comparaison à l'eau distillée. La même conclusion concerne l'addition des alcools au moût de fermentation comme solvant d'extraction. Dans certains cas, l'introduction des solvants organiques et des tampons ont un effet inhibiteur sur l'activité coagulante.

En ce qui concerne le volume du solvant ajouté, les résultats obtenus par les chercheurs ont été similaires pour un maximum d'activité avec un rapport de 1:5 p/v. L'augmentation de ce rapport a un effet atténuant, ce qui conduit à une diminution des rendements de l'extraction et de l'activité des protéases.

Pour l'optimum du temps d'extraction et le nombre de lavage ou de répétition, ils diffèrent d'une souche fongique à une autre et qui sont probablement en relation étroite avec le type du substrat utilisé, la température d'extraction et le volume du solvant ajouté au milieu de fermentation.

Nous avons constaté également que l'augmentation de la température d'extraction améliore la récupération des protéases coagulant le lait. Pour le pH du solvant, les résultats des travaux publiés reflètent l'effet très important de ce paramètre, qui exige son maintien dans la zone de stabilité de la protéase d'intérêt.

Il a été conclu que l'agitation du mélange substrat-solvant d'extraction améliore de façon significative les taux des rendements en protéases récupérées après l'étape d'extraction par comparaison à l'état statique.

Les résultats promoteurs des essais de fabrication du fromage en se basant sur l'utilisation des coagulants fongiques révèlent la possibilité de les considérer comme des succédanés de la chymosine bovine, mais qui nécessitent plus de travail afin d'améliorer leur performance, réduire les pertes du rendement fromager et d'améliorer les caractéristiques organoléptiques des fromages obtenus pour une éventuelle application à grande échelle.

Afin de poursuivre ce travail, il serait intéressant de fixer les points suivants comme perspectives :

- Compléter le présent travail par l'étude de l'influence des différents paramètres de l'extraction sur les activités coagulantes des deux protéases fongiques de *M. circinelloides* et *R. stolonifer* ;
- Optimisation du processus d'extraction par application des plans d'expériences ;
- Effectuer des essais de fabrication de différents types de fromage en utilisant les protéases purifiés produits par les deux souches fongiques ;
- Approfondir les recherches sur d'autres souches fongiques productrices des protéases caractérisées par des hautes activités coagulantes.

« A »

- Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T., & Patil, S. (2005). Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1131-1136. [doi: 10.1016/j.procbio.2004.03.006](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.03.006) .
- Ainsworth, G. C. (1973). Introduction and keys to higher taxa. *The fungi*, vol. IV A, 1-7.
- Aikat, K., & Bhattacharyya, B. C. (2000). Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. *Process Biochemistry*, 35(9), 907-914.
- Anderson, T. M. (2009). Industrial fermentation processes.
- Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, 22(1), 79. [doi :10.1085/jgp.22.1.79](https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79)
- Alessi, A., Fontana, A., Risso, P., Gatti, C., & Pires, M. (2007). Identification des interactions impliquées dans les structures de gel de présure à l'aide d'agents chimiques dissociants. *Colloid and Polymer Science*, 285 (11), 1281-1286.
- Alves, M. H., Campos-Takaki, G. M., Porto, A. L. F., & Milanez, A. I. (2002). Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(4), 325-330.
- Arima, K., Yu, J. & Iwasaki, S. (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In Perlmann, G., Lorand, L. (eds.) *Methods in Enzymology*. (pp. 446-459). New York: Academic Press. [doi:10.1016/0076-6879\(70\)19033-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(70)19033-1)

« B »

- Bahri, A., Henriquet, C., Pugnère, M., Marchesseau, S., et Chevalier-Lucia, D. (2019). Analyse de liaison entre la β -caséine monomère et les composés bioactifs hydrophobes étudiés par résonance plasmonique de surface et spectroscopie de fluorescence. *Chimie alimentaire*, 286, 289-296.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (No. Ed. 4). American Phytopathological Society (APS Press).
- Batt, C. A. (2016). Microbiology of Fermentations.
- Bensmail, S., Boudjema, K., & Naimi-Fazouane, F. (2020). Production of Extracellular Rennin-Like Enzyme by a Newly Isolate *Mucor circinelloides* (von Tieghem) and its Application in Camembert Cheese Making. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(1), 16-24. [doi:10.30491/jabr.2020.105914](https://doi.org/10.30491/jabr.2020.105914)
- Bensmail, S., & Naimi-Fazouane, F. (2020). Purification and biochemical characterization of aspartic peptidase produced by novel isolate *Mucor circinelloides* (Von Tieghem) using SSF

process. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(4), 590-598. [doi:10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.590-598](https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.590-598)

- Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P. H., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [doi:10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brulé, G., Lenoir, J., & Remeuf, F. (1997). La micelle de caséine et la coagulation du lait. *Le Fromage, Lavoisier Tec & Doc, Paris*, 7-41.

« C »

- Carlile, MJ (1995). Le succès de l'hyphe et du mycélium. Dans *Le champignon en croissance* (pp. 3-19). Springer, Dordrecht.
- Codex Alimentarius. (2011). Lait et produits laitiers, 2^{ème} édition. Rome : FAO/OMS. ISBN 978-92-5-205837-3, 261 P.
- Coker, CJ, Crawford, RA, Johnston, KA, Singh, H. et Creamer, LK (2005). Vers une classification de la variété et de la maturité des fromages sur la base d'une analyse statistique des données de protéolyse - une revue. *International Dairy Journal*, 15 (6-9), 631-643.
- Cole, G. T. (1996). Basic biology of fungi. In *Medical Microbiology. 4th edition*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Corpe, W. A., & Winters, H. (1972). Hydrolytic enzymes of some periphytic marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 18(9), 1483-1490.
- Corredig, M., & Salvatore, E. (2016). Enzymatic coagulation of milk. In McSweeney, P. H. L. & O'Mahony, J. A. (eds.) *Advanced Dairy Chemistry, Proteins: Applied Aspects (Volume 1B)*, 4th Ed. (pp. 287-307). New York, NY: Springer Science Business Media. [doi:10.1007/978-1-4939-2800-2_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_11)

« D »

- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.
- De Castro, A. M., dos Santos, A. F., Kachrimanidou, V., Koutinas, A. A., & Freire, D. M. (2018). Solid-State Fermentation for the Production of Proteases and Amylases and Their Application in Nutrient Medium Production. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 185-210). Elsevier.
- Dolatabadi, S., Scherlach, K., Figge, M., Hertweck, C., Dijksterhuis, J., Menken, S. B., & de Hoog, G. S. (2016). Food preparation with mucoralean fungi: A potential biosafety issue? *Fungal biology*, 120(3), 393-401.

- Doriya, K., Jose, N., Gowda, M., & Kumar, D. S. (2016). Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of L-asparaginase. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 78, pp. 115-135). Academic Press.

« E »

- Emanuelli, T., Milbradt, B. G., Callegaro, M. D. G. K., & Augusti, P. R. (2014). Wheat bran and cadmium in human health. In *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health* (pp. 241-260). Academic Press.
- Eskin, N. M., & Goff, H. D. (2013). Milk. In *Biochemistry of Foods* (pp. 187-214). Academic Press.

« F »

- Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Luis Rodriguez-Rama, J., Barros-Velázquez, J., de Miguel, T., Sánchez-Pérez, A., & G Villa, T. (2014). Recent patents on microbial proteases for the dairy industry. *Recent Advances in DNA & Gene Sequences* (Formerly *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*), 8(1), 44-55. [doi:10.2174/2352092208666141013231720](https://doi.org/10.2174/2352092208666141013231720)
- Fellows, PJ (2009). *Technologie de transformation des aliments : principes et pratique*. Elsevier.
- Ferragut, V., & Trujillo, T. (2008). Semi-hard cheese—cheese making technology. In *Experiments in Unit Operations and Processing of Foods* (pp. 155-160). Springer, Boston, MA.
- Fox, PF (1993). Fromage : un aperçu. In *Cheese : chimie, physique et microbiologie* (pp. 1-36). Springer, Boston, MA.
- Fox, PF, Guinee, TP, Cogan, TM et McSweeney, PL (2017). Coagulation enzymatique du lait. Dans *Fundamentals of cheese science* (pp. 185-229). Springer, Boston, MA.
- Fuc, E., Złotkowska, D., Stachurska, E., & Wróblewska, B. (2018). Immunoreactive properties of α -casein and κ -casein: Ex Vivo and In Vivo studies. *Journal of dairy science*, 101(12), 10703-10713.
- Fuerer, C., Jenni, R., Cardinaux, L., Andetson, F., Wagnière, S., Moulin, J., et Affolter, M. (2020). Empreinte protéique et quantification des variantes de la caséine β par chromatographie liquide ultra-performante - spectrométrie de masse à haute résolution. *Journal of Dairy Science*, 103 (2), 1193-1207.

« G »

- Grappin, R., & Beuvier, E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7(12), 751-761.
- Gryganskyi, AP, Golan, J., Dolatabadi, S., Mondo, S., Robb, S., Idnurm, A., ... & Gajdeczka, MT (2018). Définition phylogénétique et phylogénomique des espèces de *Rhizopus*. *G3 : Genes, Genomes, Genetics*, 8 (6), 2007-2018.
- Guiraud, J. P. (2012). *Microbiologie Alimentaire*. Paris, France: DUNOD, 652 p.
- Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International journal of biological macromolecules*, 128, 254-267.

« H »

- Harboe, M., Broe, M. L., & K. B. Qvist. (2010). The production, action and application of rennet and coagulants. In Law, B. A. & Tamime Y. A. (eds.) *Technology of cheesemaking*. (pp. 98-129). 2nd ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. [doi: 10.1002/9781444323740.ch3](https://doi.org/10.1002/9781444323740.ch3)
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... & Lumbsch, H. T. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.
- Higuchi, M. (2014). Propriétés antioxydantes du son de blé contre le stress oxydatif. In *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health* (pp. 181-199). Presse académique.
- Homaei, A., Lavajoo, F., et Sariri, R. (2016). Développement de la biotechnologie marine comme ressource pour de nouvelles protéases et leur rôle dans la biotechnologie moderne. *Journal international des macromolécules biologiques*, 88, 542-552.
- Hougaard, A. B., Ardö, Y., & Ipsen, R. H. (2010). Cheese made from instant infusion pasteurized milk: Rennet coagulation, cheese composition, texture and ripening. *International dairy journal*, 20(7), 449-458.
- Hyslop, D. B. (2003). Enzymatic coagulation of milk. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* (pp. 839-878). Springer, Boston, MA.

« I »

- Ikasari, L., & Mitchell, D. A. (1996). Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(3), 171-175.
- Ikram-ul-Haq, M. H., Daudi, S., Ali, S., & Qadeer, M. A. (2003). Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology*, 2(1), 30-36.

« J »

- Jabalia, N., Mishra, P. C., & Chaudhary, N. (2014). Applications, challenges and future prospects of proteases: An overview. *Journal of Agroecology and Natural Resource Management*, 1(3), 179-183.
- Jarocki, V. M., Tacchi, J. L., & Djordjevic, S. P. (2015). Non-proteolytic functions of microbial proteases increase pathological complexity. *Proteomics*, 15(5-6), 1075-1088.
- Jennings, D. H., & Lysek, G. (1996). *Fungal biology: understanding the fungal lifestyle*. Bios Scientific Publishers Ltd.
- Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, & Christopher J. Woolverton. (2018). *Microbiologie de Prescott*. De Boeck supérieur.

« K »

- Kapoor, R., & Metzger, L. E. (2004). Evaluation of salt whey as an ingredient in processed cheese. *Journal of dairy science*, 87(5), 1143-1150.
- Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems—An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1-2), 1-30. [doi:10.1080/07388550590925383](https://doi.org/10.1080/07388550590925383)
- Khatun, S., Absar, N., & Ashraduzzaman, M. (2001). Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(9), 1129-1132.

« L »

- Lapointe-Vignola, C. (2002). *Science et technologie du lait : transformation du lait*. Presses inter Polytechnique.
- Lebreton, A., Corre, E., Jany, J. L., Brillet-Guéguen, L., Pèrez-Arques, C., Garre, V., ... & Barbier, G. (2020). Comparative genomics applied to *Mucor* species with different lifestyles. *BMC genomics*, 21(1), 135.
- Legg, AK, Carr, AJ, Bennett, RJ et Johnston, KA (2017). Aspects généraux de la technologie fromagère. In *Cheese* (p. 643-675). Presse académique.
- Lenoir, J., Lamberet, G., & Schmidt, J. L. (1983). L'élaboration d'un fromage : l'exemple du camembert. *Pour la science*, (69), 30-42.
- Léonil, J., Michalski, M. C., & Martin, P. (2013). Les structures supramoléculaires du lait : structure et impact nutritionnel de la micelle de caséine et du globule gras. *INRA Prod. Anim*, 26(2), 129-144.
- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S., et Sanchis, V. (2016). Effets de la température, de l'activité de l'eau et du temps d'incubation sur la croissance fongique et la production d'aflatoxine B1 par les isolats toxinogènes d'*Aspergillus flavus* sur les graines de sorgho. *Revista Argentina de microbiologia*, 48 (1), 78-85.
- Larpent-Gourgand, M., & Sanglier, J. J. (1992). *Biotechnologies : principes et méthodes*.

- Lucey, JA (2011). Fromage | Fromage coagulé à l'acide et à l'acide / à la chaleur.

« M »

- Madadlou, A. et Azarikia, F. (2013). Nanoporteurs, films et composites à base de protéines de lait. Dans *Advances in Natural Polymers* (pp. 169-191). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Malakar, S., Paul, S. K., & Pou, K. J. (2020). Biotechnological Interventions in Beverage Production. In *Biotechnological Progress and Beverage Consumption* (pp. 1-37). Academic Press.
- Martinez-Medina, GA, Barragán, AP, Ruiz, HA, Ilyina, A., Hernández, JLM, Rodríguez-Jasso, RM, ... & Aguilar-González, CN (2019). Protéases fongiques et production de peptides bioactifs pour l'industrie alimentaire. Dans *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 221-246). Presse académique.
- Martins, I., Hartmann, D. O., Alves, P. C., Martins, C., Garcia, H., Leclercq, C. C., ... & Pereira, C. S. (2014). Elucidating how the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans* uses the plant polyester suberin as carbon source. *BMC genomics*, 15(1), 613.
- McMahon, DJ et Brown, RJ (1984). Composition, structure et intégrité des micelles de caséine : un examen. *Journal of Dairy Science*, 67 (3), 499-512.
- McSweeney, P. L. H. (2007). Conversion of milk to curd. In McSweeney, P. L. H. (ed.) *Cheese problems solved*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited & CRC Press LLC. (pp. 50-71). [doi:10.1533/9781845693534.50](https://doi.org/10.1533/9781845693534.50)
- McSweeney, P. L. H., Ottogalli, G., & Fox, P. F. (2017). Diversity and classification of cheese varieties: An overview. In McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., & Everett, D. W. (eds.) *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 4th ed. Vol 1: *General Aspects*. (pp. 781-808). Academic Press. [doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00031-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00031-4)
- Mistry, V. V. (2012). Chymosin in cheese making. In Simpson, K. B., Nollet, L. M. L., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G. & Hui, Y. H. (eds.) *Food biochemistry and food processing*. (pp. 223-231). Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Ltd Publication. [doi:10.1002/9781118308035.ch11](https://doi.org/10.1002/9781118308035.ch11)
- Mitchell, DA, de Lima Luz, LF, Krieger, N., et Berovič, M. (2011). Bioréacteurs pour la fermentation à l'état solide.
- Mohamed, H., Ali, C., & Atika, L. (2015). Fabrication d'un fromage camelin avec un extrait enzymatique immobilisé de la couche de kaolin du gésier de poules.
- Morin-Sardin, S., Nodet, P., Coton, E., et Jany, JL (2017). *Mucor* : genre fongique à face Janus ayant un impact sur la santé humaine et des applications industrielles. *Revue de biologie fongique*, 31 (1), 12-32.
- Muhammad, Irfan, Abdul, R., Quratualain, S., Muhammad, N., & Shahjahan, B. (2011). Exploitation of different agro-residues for acid protease production by *Rhizopus* sp. In *Koji*

fermentation. *International Journal of Agro Veterinary and Medical Sciences (IJAVMS)*, 5(1), 43-52.

« N »

- Nguyen, TT, Jeon, YJ, Mun, HY, Goh, J., Chung, N., et Lee, HB (2020). Isolement et caractérisation de quatre espèces de *Mucor* non enregistrées en Corée. *Mycobiologie*, 48 (1), 29-36.
- Nighojkar, A., Patidar, M. K., & Nighojkar, S. (2019). Pectinases: Production and Applications for Fruit Juice Beverages. In *Processing and Sustainability of Beverages* (pp. 235-273). Woodhead Publishing.

« O »

- Ojha, K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 410-417.
- Okafor, N. (2016). *Microbiologie et biotechnologie industrielles modernes*. CRC Press.
- Olson, NF (2003). FROMAGES | Types de fromage.

« P »

- Patil Pallavi, M., Kulkarni Avanti, A., & Kininge Pallavi, T. (2012). Production of milk clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* under solid-state fermentation using mixture of wheat bran and rice bran. *Int J Sci Res Pub*, 2(10), 1-12.
- Patnala, HS, Kabilan, U., Gopalakrishnan, L., Rao, RMD et Kumar, DS (2016). Isolats fongiques et bactériens marins pour la production de lipase : une étude comparative. Dans *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 78, pp. 71-94). Presse académique.
- Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., Bonazza, F., Palmieri, G. F., Pucciarelli, S., ... & Vincenzetti, S. (2019). A comparison among β -caseins purified from milk of different species: Self-assembling behaviour and immunogenicity potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 210-216.
- Powell, Ian & Broome, M.C. & Limsowtin, G.K.Y. (2016). Starter Cultures: General Aspects. [10.1016 / B978-0-08-100596-5.00689-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00689-2) .

« R »

- Ramet, J. P., & Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. (1985). *La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen*. Organisation des nations unies pour L'Alimentation et L'Agriculture.
- Ramos, OS et Malcata, FX (2011). 3.48 Enzymes de qualité alimentaire.
- Ray, P., & Craven, K. D. (2016). *Sebacina vermifera*: a unique root symbiont with vast agronomic potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(1), 16.

- Rijnkels, M., Elnitski, L., Miller, W., & Rosen, J. M. (2003). Multispecies comparative analysis of a mammalian-specific genomic domain encoding secretory proteins. *Genomics*, 82(4), 417-432.
- Roquebert, M. F. (2002). Moisissures contaminant les biens culturels. *Collection Patrimoine*.
- Rutigliano, M., Gagliardi, R., Santillo, A., Diurno, V., Di Luccia, A., et la Gatta, B. (2018). Évaluation des diminutions de la β -caséine pendant le stockage congelé du lait de bufflonne. *International Dairy Journal*, 86, 36-38.

« S »

- Sathya, R., Pradeep, B. V., Angayarkanni, J., & Palaniswamy, M. (2009). Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(6), 788-794.
- Sathya, R., Pradeep, F. S., Angayarkanni, J., & Palaniswamy, M. (2012). Influence of microbial rennet on the production of cheddar cheese made using cow milk. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, 1-7.
- Sawant, R., & Narendra, S. (2014). Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 568-579.
- Schlienger, J. L., & Rolling, A. C. (2011). *Nutrition clinique pratique*. Elsevier Masson.
- Schuster, M., & Kahmann, R. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 130, 43-53.
- Schipper, M. A. (1967). *Mucor strictus* Hagem, a psychrophilic fungus, and *Mucor falcatus* sp. n. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 33(1), 189-195.
- Schipper, MA (1969). Stades zygosporiques du mucor hétérothallique. *Antonie van Leeuwenhoek*, 35 (1), 189-208.
- Schipper, MA (1970). Deux espèces de *Mucor* avec des souches ovales et sphériques. *Antonie van Leeuwenhoek*, 36 (1), 475-488.
- Schipper, MA (1976). *Sur Mucor circinelloides, Mucor racemosus et espèces apparentées*. Baarn, Pays-Bas : Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Schipper, M. A. (1984). A Revision of the Genus *Rhizopus*. *Studies in Mycology*.
- Selvaggi, M., Laudadio, V., Dario, C., et Tufarelli, V. (2014). Principales protéines du lait de chèvre : un aperçu actualisé de la variabilité génétique. *Rapports de biologie moléculaire*, 41 (2), 1035-1048.
- Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, 94(1), 5-16. [doi:10.1007/s13594-013-0144-3](https://doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3)
- Shata, H. M. (2005). Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. *Polish Journal of Microbiology*, 54(3), 241-247.

- Shamsi, TN, Parveen, R. et Fatima, S. (2016). Caractérisation, applications biomédicales et agricoles des inhibiteurs de protéase : une revue. *Journal international des macromolécules biologiques*, 91, 1120-1133.
- Sharma, KM, Kumar, R., Panwar, S., et Kumar, A. (2017). Protéases alcalines microbiennes : Optimisation des paramètres de production et de leurs propriétés. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15 (1), 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>
- Silva, B. L., Geraldés, F. M., Murari, C. S., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2014). Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(4), 1999-2011. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0655-7>
- Singhanian, R. R., Patel, A. K., & Pandey, A. (2017). Biotechnology for agricultural waste recycling. In Wong, J. W.-C., Tyagi, D. R., & Pandey, A. (eds.) *Current developments in biotechnology and bioengineering: Solid waste management*. (pp. 223-240). Elsevier. [doi:10.1016/B978-0-444-63664-5.00010-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63664-5.00010-1)
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M. et Mehta, PK (2016a). Protéases microbiennes dans les applications commerciales. *J Pharm Chem Biol Sci*, 4 (3), 365-74.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., et Mehta, PK (2016b). Enzymes microbiennes : progrès industriel au 21e siècle. *3 Biotech*, 6 (2), 174.
- Slaviero, M., Vargas, T. P., Bianchi, M. V., Ehlers, L. P., Spanemberg, A., Ferreira, L., ... & Pavarini, S. P. (2020). *Rhizopus microsporus* segmental enteritis in a cow. *Medical Mycology Case Reports*.
- Souza, P. M. D., Bittencourt, M. L. D. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. D., Silveira, D., Fonseca, Y. M., Filho, F. E. X., Junior, A. P., & Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337-346. [doi:10.1590/s1517-838246220140359](https://doi.org/10.1590/s1517-838246220140359)
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., ... & James, T. Y. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028-1046.
- Spatafora, J. W., Aime, M. C., Grigoriev, I. V., Martin, F., Stajich, J. E., & Blackwell, M. (2017). The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *The fungal kingdom*, 1-34.
- Stajich, J. E., Berbee, M. L., Blackwell, M., Hibbett, D. S., James, T. Y., Spatafora, J. W., & Taylor, J. W. (2009). Primer--the fungi. *Current biology : CB*, 19(18), R840.
- Sundarraj, A. A., Rajathi, A. A., Vishal, S. C., Rohit, D., Prakash, M. S., Sam, A. A., & Seihenbalg, S. S. (2018). Food biotechnology applications in dairy and dairy products. *Journal of Pharmacy Research*, 12(4), 520-525.

- Suriya, J., Bharathiraja, S., Krishnan, M., Manivasagan, P., et Kim, SK (2016). Amylases microbiennes marines : propriétés et applications. Dans *Advances in food and nutrition research* (Vol. 79, pp. 161-177). Presse académique.

« T »

- Thatoi, H., Mohapatra, P. K. D., Mohapatra, S., & Mondal, K. C. (Eds.). (2020). *Microbial Fermentation and Enzyme Technology*. CRC Press.
- Tunga, R., Banerjee, R., & Bhattacharyya, B. C. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. *Bioprocess Engineering*, 19(3), 187-190. [doi:10.1007/s004490050504](https://doi.org/10.1007/s004490050504)
- Tunga, R., Banerjee, R., & Bhattacharya, B. C. (1999). Some studies on optimization of extraction process for protease production in SSF. *Bioprocess Engineering*, 20(6), 485-489.
- Tunga, R., Shrivastava, B., & Banerjee, R. (2003). Purification and characterization of a protéase from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*, 38(11), 1553-1558.
- Turcot, S., St-Gelais, D., & Turgeon, S. L. (2002). Affinage de fromages allégés de type Cheddar fabriqués à partir de laits enrichis en phospholipides. *Le Lait*, 82(2), 209-223.

« V »

- Viel, M., Collet, F., Lecieux, Y., François, M. L., Colson, V., Lanos, C., ... & Lawrence, M. (2019). Développement d'une Méthode d'Évaluation de la Résistance au Développement des Moisissures : Application à des Composites Biosourcés. *Revue des composites et des matériaux avancés*, 29(4), 261-274.

« W »

- Walther, B., Schmid, A., Sieber, R. et Wehrmüller, K. (2008). Fromage en nutrition et santé. *Science et technologie laitières*, 88 (4-5), 389-405.
- Walther, G., Pawłowska, J., Alastruey-Izquierdo, A., Wrzosek, M., Rodriguez-Tudela, JL, Dolatabadi, S., ... & de Hoog, GS (2013). Code à barres ADN à Mucorales : un inventaire de la biodiversité. *Persoonia : Phylogeny Molecular and Evolution of Fungi*, 30, 11.
- Wang, H. L. (1967). Release of proteinase from mycelium of *Mucor hiemalis*. *Journal of bacteriology*, 93(6), 1794-1799.
- Warnock, D. W. (2012). Fungi: Superficial, subcutaneous and systemic mycoses. In *Medical Microbiology* (pp. 616-641). Churchill Livingstone.
- Wei, Z.-Y., Zhang, Y.-Y., Wang, Y.-P., Fan, M.-X., Zhong, X.-F., Xu, N., Lin, F., & Xing, S.-C. (2016). Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 624. [doi:10.3390/ijms17050624](https://doi.org/10.3390/ijms17050624)

- Woese, CR, Kandler, O., & Wheelis, ML (1990). Vers un système naturel d'organismes : proposition pour les domaines Archaea, Bacteria et Eucarya. *Actes de l'Académie nationale des sciences*, 87 (12), 4576-4579.

« Y »

- Yegin, S., Fernandez-Lahore, M., Salgado, A. J. G., Guvenc, U., Goksungur, Y., & Tari, C. (2011). Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 949-960. [doi:10.1007/s00253-010-3020-6](https://doi.org/10.1007/s00253-010-3020-6)

« Z »

- Zhang, J., Yang, H., Yu, Q. Y., Wu, M. D., Yang, L., Zhuang, W. Y., ... & Li, G. Q. (2016). *Botrytis pyriformis* sp. nov., a novel and likely saprophytic species of *Botrytis*. *Mycologia*, 108(4), 682-696.
- Zobrist, M. R., Huppertz, T., Uniacke, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). High-pressure-induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 655-662.
- Zycha, H., Siepmann, R., et Linnemann, G. (1969). Mucorales. *Mucorales*.

Annexes

Annexe 1

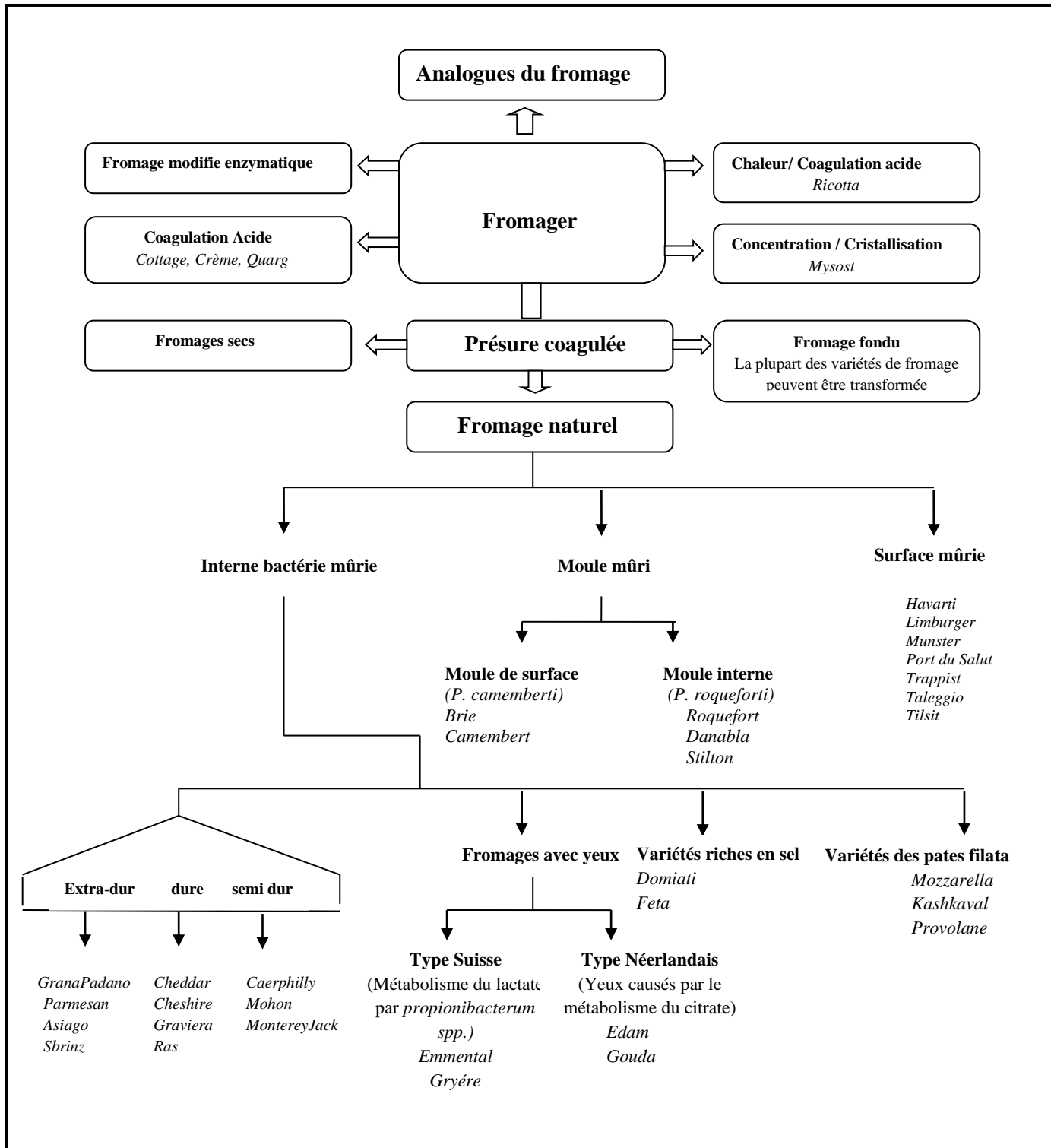
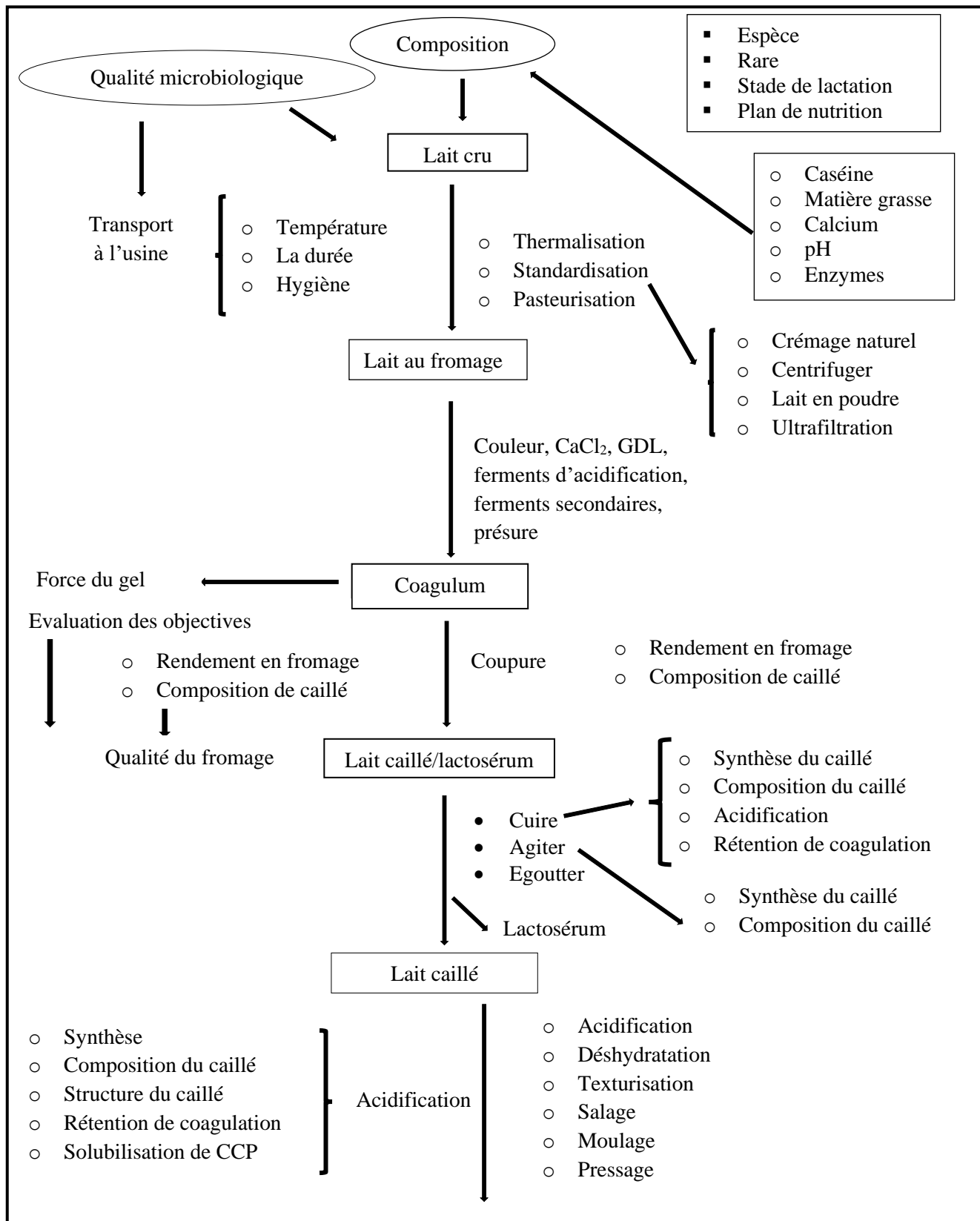


Figure 1 : Classification des fromages selon le type de coagulation et le procédé d'affinage (Mcsweeney *et al.*, 2017).



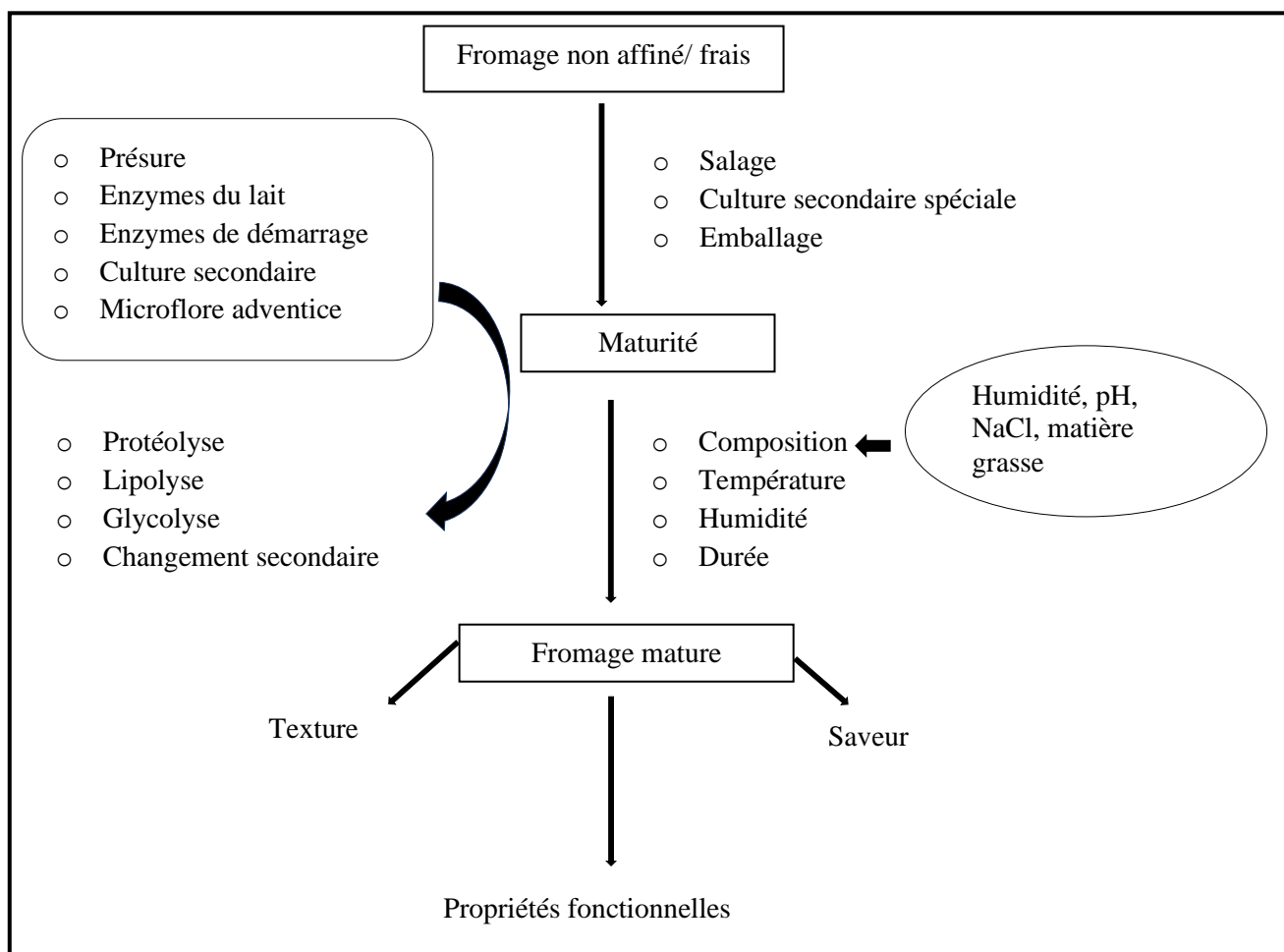


Figure 2 : Organigramme standard illustre les étapes de fabrication du fromage (Olson, 2003).

Annexe 2

- **Dosage des protéines (Bradford, 1976)**

La détermination de la teneur en protéines a été réalisée selon la méthode de Bradford, (1976) en utilisant la BSA comme standard (1 mg/mL). Pour chaque échantillon et la solution étalon, un volume précis a été prélevé puis mélangé avec 3 mL du réactif de Bradford (100 mg de BBC G-250, 50 mL éthanol, 100 mL acide orthophosphorique à 85%). Les absorbances développées après une incubation pendant 10 min sont lues à 595 nm.

- **Dosage de l'activité protéolytique (Anson, 1938)**

L'activité protéolytique a été mesurée par une modification de la méthode d'Anson. A 2,5 mL de la solution de caséine à 2,5% dans un tampon approprié, on ajoute 0,5 mL de la solution d'enzyme et 0,5 mL du même tampon. Le mélange a été incubé ensuite à 40°C pendant 30 min. Après incubation, 5 mL de l'acide trichloroacétique à 4% ont été ajoutés; puis le mélange a été filtré. L'estimation de la concentration des protéines hydrolysées a été effectuée selon la méthode de Lowry à 750 nm.

- **Détermination de l'activité de coagulation du lait (Arima *et al.*, 1970)**

A 0,5 mL de la solution d'enzyme dans un tube de 25 mL, 5 mL de la poudre du lait écrémé à 10% (p/p) dans une solution de chlorure de calcium 0,01M ont été ajoutés. Le tube a été incubé à 35°C. L'activité coagulante a été détectée par l'apparition des flocons sur la paroi interne de tube. La quantité d'enzyme qui coagule le substrat en 1 min a été définie comme 400 unités.

Résumé

Ce travail s'articule sur l'étude de l'influence du processus d'extraction sur l'activité enzymatique de deux coagulants fongiques produits par *Mucor circinelloides* et *Rhizopus stolonifer*, et leur utilisation dans la fabrication du fromage. Un nombre limité de travaux sont publiés sur l'influence des conditions du procédé d'extraction sur l'activité enzymatique des protéases produites par les souches fongiques. D'après ces travaux, différentes solutions minérales ainsi que des alcools se sont avérés être le meilleur solvant pour l'extraction de protéases avec des rendements plus élevés, ajoutés au moût de fermentation le plus souvent avec un rapport de 1:5 (p/v). L'optimum du temps d'extraction et le nombre de lavage ou de répétition varient d'une souche fongique à l'autre en fonction de plusieurs paramètres liés au processus de fermentation et d'extraction. Par contre dans tous les cas, l'agitation durant l'extraction améliore les rendements en protéases par rapport l'état statique. Les conditions physicochimiques (température et pH du solvant) sont également d'une grande importance pour atteindre le maximum de protéases récupérées. Les extraits fongiques coagulant le lait utilisés dans des essais de fabrication du fromage Cheddar révèlent leur potentiel effet en tant qu'alternatifs possible de la chymosine bovine.

Mots clé: Protéase, *Mucor circinelloides*, *Rhizopus stolonifer*, activité coagulante, SSF, extraction, fromage

Abstract

The aim of this work is to study the effect of extraction process on the enzymatic activity of two fungal coagulants produced by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus stolonifer*, and their use in cheese making. A limited number of works have been published on the influence of extraction process conditions on the enzymatic activity of proteases produced by fungal strains. According to this works, different mineral solutions as well as alcohols were determined as the best solvent for the extraction of proteases with higher yields, added to the fermentation medium most often with a ratio 1:5 (w/v). The optimum extraction time and the number of washing or repetitions varied from one fungal strain to another depending on several parameters related to the fermentation and extraction process. On the other hand in all cases, the stirring during extraction improves protease yields over static state. The physicochemical conditions (temperature and pH of the solvent) are also of great importance to achieve the maximum amount of proteases recovered from the fermentation medium. Milk-clotting fungal extracts used in Cheddar cheese making trials reveal their potential effect as possible alternatives to bovine chymosin.

Keywords: Protease, *Mucor circinelloides*, *Rhizopus stolonifer*, milk-clotting activity, SSF, extraction, cheese.

ملخص

يرتكز هذا العمل على دراسة تأثير عملية الاستخلاص على النشاط الأنزيمي لمخترين فطريين ينتجها *Mucor circinelloides* و *Rhizopus stolonifer*، واستخدامهما في صناعة الجبن. تم نشر عدد محدود من الأعمال حول تأثير ظروف عملية الاستخراج على النشاط الأنزيمي للبروتياز التي تنتجها السلالات الفطرية. وفقاً لهذا الاعمال، أثبتت المحاليل المعدنية المختلفة وكذلك الكحوليات أنها أفضل مذيب لاستخراج البروتياز مع إنتاجية أعلى، تضاف إلى وسط التخمر غالباً بنسبة 1:5 (p/v). يختلف وقت الاستخراج الأمثل وعدد مرات الغسيل أو التكرار من سلالة فطرية إلى أخرى اعتماداً على عدة عوامل تتعلق بعملية التخمر والاستخلاص. من ناحية أخرى، في جميع الحالات، يؤدي التحريك أثناء الاستخراج إلى تحسين إنتاج البروتياز مقارنة بالحالة الساكنة. تعتبر الظروف الفيزيائية والكيميائية (درجة الحرارة ودرجة الحموضة للمذيب) ذات أهمية كبيرة أيضاً لتحقيق أقصى قدر من البروتياز المستعاد. تكشف المستخلصات الفطرية المختررة للحليب المستخدمة في تجارب صنع جبن الشيدر عن تأثيرها المحتمل كبديل محتملة للكيموسين البقري.

الكلمات المفتاحية: البروتياز، *Mucor circinelloides*، *Rhizopus stolonifer*، نشاط التخثر، SSF، الاستخلاص، الجبن.