

République Algérienne Démocratique et Populaire.  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.  
Université Mentouri Constantine.  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.  
Département de Biochimie-Microbiologie.

N° d'ordre : .....

N° de série : .....

# Mémoire

*Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTÈRE en :*

*Microbiologie Appliquée*

*Option : Biotechnologie microbienne*

Par : BOUCHERIT Zeyneb

*S.H.E.M.*

## Production et étude des propriétés de la protéase acide d'une moisissure isolée de Sebkha

Soutenu le : 07/04/2011

Devant le Jury

Président :	BOULAHROUF A.	Prof. U. M. Constantine.
Rapporteur :	MECHAKRA A.	Prof. U. M. Constantine.
Examineurs :	MERAIHI Z.	Prof. U. M. Constantine.
	DJEGHRI B.	M.C. U. B. M. Annaba.



# Remerciements

*Mes remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à mon honorable encadreur M<sup>e</sup> le Professeur MECHAKRA A pour ses orientations, sa rigueur scientifique et pour la confiance qu'elle m'a accordé tout au long de cette étude. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.*

*Mes remerciements s'adressent également*

*à M. BOUIAHROUF A. Professeur à l'U.M. Constantine pour le grand honneur de présider le jury.*

*à M<sup>e</sup> MERAIHI Z., Professeur à l'U.M. Constantine, ainsi qu'à M<sup>e</sup> DJEGHRI B. M.C. à l'U.B.M. Annaba, pour avoir bien voulu examiner ce travail.*

*Je tiens également à remercier tout le personnel du laboratoire de biologie et environnement en particulier Dalel pour sa patience, ses conseils et sa grande disponibilité.*

*J'adresse particulièrement mes vifs remerciements à M. Yaou A. pour son soutien et ses encouragements qui m'ont été d'une grande utilité.*

*Enfin, un grand merci à tous qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>1. Enzymes de coagulation du lait</b> .....	3
1.1. Généralités sur les enzymes.....	3
1.1.1. Enzymes .....	3
1.1.2. Protéases.....	3
1.2. Propriétés et mécanisme d'action de la présure.....	4
1.2.1. Propriétés.....	4
1.2.2. Mécanisme d'action sur le lait.....	5
1.3. Sources des enzymes de coagulation du lait.....	5
1.3.1. Coagulases animales.....	5
1.3.2. Coagulases végétales.....	5
1.3.3. Coagulases recombinantes.....	6
1.3.4. Coagulases fongiques.....	6
<b>2. Moisissures halophiles</b> .....	7
2.1. Généralités sur les moisissures.....	7
2.1.1. Définition.....	7
2.1.2. Position systématique.....	7
2.1.3. Généralités sur les microorganismes extrêmophiles.....	8
2.2. Microorganismes halophiles.....	8
2.3. Principaux groupes des moisissures halophiles.....	9
2.4. Stratégies d'adaptation des moisissures aux milieux hyper salins.....	9
2.4.1. Équilibre ionique.....	9
2.4.2. Accumulation des solutés compatibles.....	9
2.4.3. Fluidité de la membrane cytoplasmique.....	10
2.5. Applications biotechnologiques des moisissures halophiles.....	10
<b>3. Lactosérum</b> .....	11
3.1. Généralités.....	11
3.2. Valorisation.....	12

3.2.1. Domaine médical.....	12
3.2.2. Domaine alimentaire.....	12
3.2.3. Domaine biotechnologique.....	12

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

<b>1. Matériel biologique.....</b>	<b>13</b>
1.1. Prélèvements.....	13
1.2. Méthodes d'isolement et de purification.....	13
1.3. Méthode de conservation.....	13
1.4. Sélection des souches protéolytiques.....	13
1.5. Identification de la souche sélectionnée.....	13
1.5.1. Identification macroscopique.....	15
1.5.2. Identification microscopique.....	15
<b>2. Méthodes analytiques.....</b>	<b>15</b>
2.1. Mesure du pH du sol.....	15
2.2. Mesure de la matière sèche.....	15
2.2.1. Du sol.....	15
2.2.2. Du lactosérum.....	15
2.3. Mesure des cendres.....	16
2.3.1. Du sol.....	16
2.3.2. Du lactosérum.....	16
2.4. Mesure de la conductivité électrique du sol.....	16
2.5. Mesure de l'acidité Dornic du lactosérum.....	16
2.6. Mesure des sucres totaux.....	17
2.7. Mesure des protéines totales.....	17
2.8. Mesure de l'activité protéolytique.....	17
<b>3. Méthodes de fermentation et de production.....</b>	<b>17</b>
3.1. Préparation du milieu de fermentation.....	17
3.2. Préparation de l'inoculum.....	18
3.2.1. Sporulation.....	18
3.2.2. Dénombrement des spores.....	18
3.3. Ensemencement des milieux de fermentation.....	18
3.4. Préparation des extraits bruts.....	18

<b>4. Purification de l'enzyme</b> .....	18
4.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	19
4.2. Dialyse.....	19
4.3. Chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex G100.....	19
<b>5. Étude des propriétés de l'enzyme purifiée</b> .....	19
5.1. Effet du pH.....	19
5.2. Effet de la température.....	19
5.3. Stabilité thermique.....	20
5.4. Étude cinétique de l'enzyme.....	20
5.5. Effet de la concentration en NaCl.....	20
5.6. Effet de la concentration en Ca <sup>++</sup> .....	20
<b>6. Test de coagulation du lait</b> .....	20

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

<b>1. Analyses physicochimiques du sol</b> .....	21
<b>2. Isolement des moisissures à partir du sol</b> .....	23
<b>3. Mise en évidence de l'activité protéolytique</b> .....	23
<b>4. Analyse du lactosérum</b> .....	25
<b>5. Activité protéolytique des souches sélectionnées</b> .....	25
<b>6. Identification de la souche sélectionnée</b> .....	27
6.1. Identification macroscopique.....	27
6.2. Identification microscopique.....	27
<b>7. Cinétique de croissance de la souche S12<sub>5</sub></b> .....	29
7.1. Évolution de la biomasse.....	29
7.2. Évolution de l'activité protéolytique.....	29
<b>8. Purification de l'extrait enzymatique</b> .....	31
8.1. Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium et dialyse.....	31
8.2. Chromatographie sur Sephadex G100.....	31
<b>9. Propriétés de la protéase purifiée</b> .....	31
9.1. Effet du pH sur l'activité de l'enzyme.....	33
9.2. Effet de la température sur l'activité de l'enzyme.....	33
9.3. Étude de la thermo-stabilité de l'enzyme.....	33
9.4. Paramètres cinétiques de l'enzyme.....	35
9.5. Effet du NaCl sur l'activité enzymatique.....	35
9.6. Effet du calcium sur l'activité enzymatique.....	35

<b>10. Test de coagulase.....</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>37</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>39</b>
<b>ANNEXES</b>	
<b>RÉSUMÉS</b>	

# Liste des abréviations

°D : Degré DORNIC.

µg : Microgramme.

BSA : Bovin Serum Albumin (Sérum Albumine Bovine).

EC : Enzyme Commission.

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique.

I.U.B.: International Union Biochemistry.

kDa : Kilo Dalton.

M : Molarité.

Met : Méthionine.

mM : milli Molarité.

mS : milliSiemens.

N : Normalité.

nm : Nanomètre.

Phe : Phénylalanine.

rpm : Rotation par minute.

TCA : Tri Chloroacetic Acid (Acide Trichloracétique).

# Liste des figures

- Figure 1 : Photographies des trois sites de prélèvements.
- Figure 2 : Schéma des isolats fongiques (souche 1 et 2) destinés à leurs identifications.
- Figure 3. Résultats de la croissance des souches protéolytiques sur caséine gélosée.
- Figure 4 : Diamètre des zones de croissance et d'hydrolyse sur la gélose caséinée.
- Figure 5 : Activité protéolytique exocellulaire des souches après fermentation du milieu.
- Figure 6 : Pourcentage des activités produites après culture.
- Figure 7 : Répartition des activités endo et exocellulaire.
- Figure 8 : Aspect des colonies de la souche S12<sub>5</sub> après 7 j à 25° C.
- Figure 9 : Aspect des colonies de la souche S12<sub>5</sub> sous microscope optique.
- Figure 10 : Cinétique de croissance *d'Aspergillus sp.*
- Figure 11 : Cinétique de production de la protéase acide par *Aspergillus sp.*
- Figure 12. Profil d'élution de la chromatographie sur gel de Sephadex G100.
- Figure 13 : Effet du pH sur l'activité de l'enzyme.
- Figure 14 : Représentation de Dixon.
- Figure 15 : Effet de la température sur l'activité de l'enzyme.
- Figure 16 : Effet de la température sur la stabilité de l'enzyme.
- Figure 17 : Effet de la concentration de substrat sur l'activité de l'enzyme.
- Figure 18 : Représentation de Hill de la protéase acide étudiée.
- Figure 19 : Effet du NaCl sur l'activité de l'enzyme.



Figure 20 : Effet du NaCl sur l'activité de l'enzyme.

Figure 21 : Courbe étalon pour le dosage du lactose.

Figure 22 : Courbe étalon pour le dosage des protéines.

Figure 23 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de la tyrosine.

Figure 24 : Courbe étalon pour le dénombrement des spores de *Penicillium sp.*

Figure 25 : Courbe étalon pour le dénombrement des spores d'*Aspergillus sp.*

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques de classification des moisissures.

Tableau 2 : Différents types de lactosérum.

Tableau 3 : Composition chimique du lactosérum.

Tableau 4 : Résultats de l'analyse physicochimique des 3 échantillons du sol.

Tableau 5 : Type de sol en fonction de la conductivité électrique.

Tableau 6 : Nombre de souches obtenus des 3 échantillons du sol.

Tableau 7 : Composition physicochimique du lactosérum.

Tableau 8 : Caractères macroscopiques de la souche S12<sub>5</sub>.

Tableau 9 : Résultats de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium.

Tableau 10 : Bilan de purification de l'extrait enzymatique.

# Introduction

Depuis bien longtemps, l'enzyme coagulante du lait la plus utilisée était la présure ; elle est extraite de l'estomac des jeunes ruminants. Sa production est de nos jours très limitée, cela, à cause d'une augmentation accrue de la demande des industries fromagères ; ce qui a engendré la recherche des produits de remplacement de différentes origines ; animale, végétale et microbienne. Parmi ces sources, les protéases fongiques sont de loin les plus exploitées dans la production des fromages (Wang, 2005). En effet, les moisissures sont de plus en plus utilisées dans la production d'enzymes, en particulier les protéases (Scriban *et al.*, 1999).

D'autre part, nous assistons à la production de quantités importantes de lactosérum par les industries fromagères, ce qui pose de nombreux problèmes économiques et écologiques. D'un coté, son transport et son recyclage reviennent chers, d'un autre coté, son rejet dans la nature provoque la pollution de l'environnement. En effet, sa richesse en lactose, en protéines solubles et en sels minéraux a incité plusieurs laboratoires à tenter de valoriser le lactosérum en l'utilisant comme substrat de production de différents produits : levure de boulangerie (Gana et Touzi, 2001), acide lactique (Mehaia et Cheryan, 1986), éthanol (Tin et Mawson, 1993) et enzymes (Miyakawa, 1992). Utilisé comme milieu de culture à moindre coût, il permet en particulier la production de protéases (Mechakra *et al.*, 1999).

Dans cet objectif, nous nous proposons d'étudier la production d'une protéase, éventuelle substitut de présure, par des moisissures isolées d'un sol salé. Pour cela le travail est réalisé en 7 étapes :

- Isolement des souches fongiques à partir du sol de la Sebkha de Ain-Ezzmoul.
- Mise en évidence de l'activité protéolytique chez les moisissures purifiées.
- Production des protéases par fermentation submergée sur milieu à base de lactosérum.
- Sélection de la souche la plus productrice de protéase acide exocellulaire.

- Identification de la souche sélectionnée et étude de ses cinétiques de croissance et de production.
- Extraction, purification et étude des caractéristiques physicochimiques et cinétiques de la protéase.
- Test de coagulation du lait écrémé par la protéase partiellement purifiée.

# Synthèse bibliographique

## 1. ENZYMES DE COAGULATION DU LAIT

### 1.1. Généralités sur les enzymes

#### 1.1.1. Enzymes

Les enzymes sont des polymères biologiques qui catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins  $10^6$  par rapport à la réaction en leur absence (Granner, 2008).

À part un petit groupe de RNA catalytiques, les ribozymes, toutes les enzymes sont des protéines globulaires (Scriban, 1999).

Outre leur grande efficacité, les enzymes sont des catalyseurs extrêmement sélectifs. Elles sont à la fois spécifiques du type de réaction catalysée et d'un seul substrat ou d'un petit ensemble de substrats fortement apparentés ; ceci est dû à l'existence d'un environnement taillé sur mesure pour une seule réaction appelé *site actif* (Granner, 2008).

Selon l'I.U.B, les enzymes sont répertoriées en six classes.

- Classe 1 : Oxydoréductases.
- Classe 2 : Transférases.
- Classe 3 : Hydrolases.
- Classe 4 : Lyases.
- Classe 5 : Isomérases.
- Classe 6 : Ligases.

#### 1.1.2. Protéases

##### ➤ Définition

Les protéases appartiennent à la classe 3 des enzymes, les hydrolases, la sous classe 4 : les peptidases. Elles hydrolysent les protéines par rupture d'une ou de plusieurs liaisons peptidiques. (Pelmont, 1995).

##### ➤ Classification

Les peptidases peuvent être classées selon la nature chimique du site actif, le type de réaction catalysée et la structure et l'homologie moléculaire (Polaina et MacCabe, 2007).

- **Selon la nature chimique du site actif** : elle se base sur les travaux de Hartley (1960) qui a organisé les protéases en 6 groupes selon le résidu participant à la catalyse au niveau du site actif. On trouve ainsi la sérine, la thréonine, la cystéine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et un métal.

- **Selon le type de réaction** : l'hydrolyse du substrat ne se fait pas dans le même emplacement ; si elle est interne, l'enzyme est qualifiée d'endopeptidase ; sinon, l'enzyme est exopeptidase.

- **Selon la structure et l'homologie moléculaire** : c'est la classification la plus récente, organisée par Rawlings et Barrett (1993) ; elle est basée sur la disposition des données des séquences des acides aminés et les structures en 3D. Les peptidases sont assemblées en famille, les familles sont groupées en clans selon le degré d'homologie, ce qui a permis de créer la base de données *MEROPS* qui suit le même schéma que cette classification.

## 1.2. Propriétés et mécanisme d'action de la présure

La présure est l'enzyme extraite du 4<sup>e</sup> estomac (abomasum) des veaux pré-ruminants traditionnellement utilisée comme agent coagulant dans l'industrie fromagère (Polaina et MacCabe, 2007).

### 1.2.1. Propriétés

La présure est composée de deux enzymes en proportions variables : la chymosine à 80 % et la pepsine à 20 % (Alais, 1975; Scriban, 1999).

#### ➤ *Chymosine* (EC 3.4.23.4)

C'est une holoprotéine de 35,6 kDa, appartenant au groupe des protéases acides (pH optimal entre 4 et 5), stable à pH 5,3 – 6,3, inactivée à 7,5, dénaturée à 8 ; l'inactivation thermique a lieu à 50° C, elle est totale à 61° C (Alais, 1975; Scriban, 1999).

#### ➤ *Pepsine*

C'est une protéase acide de 35 kDa, constituée de 3 fractions : A (EC 3.4.23.1), B (EC 3.4.23.2) et C (EC 3.4.23.3), son activité est la plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 ; elle dénaturée à 55° C (Scriban, 1999).

### ***1.2.2. Mécanisme d'action sur le lait***

La coagulation du lait est un processus qui s'effectue en 2 phases.

- **Phase de protéolyse spécifique** : l'enzyme hydrolyse la liaison Phe<sup>105</sup>- Met<sup>106</sup> de la  $\kappa$ -caséine, en présence des ions Ca<sup>++</sup>, donnant ainsi le para caséine  $\kappa$  (hydrophobe) et un macropeptide (hydrophile).
- **Phase de protéolyse générale** : l'attaque protéolytique sur les micelles de caséine provoquant ainsi leur déstabilisation.

## **1.3. Sources des enzymes de coagulation du lait**

La pénurie de la présure bovine, due à la demande croissante par les fromageries, a encouragé la recherche de substituts de différentes origines : animale, végétale, recombinante et fongique.

### ***1.3.1. Coagulases animales***

Des substituts de présure sont produits par plusieurs mammifères comme le chameau (Elagamy, 2000, Siboukeur, 2005), le porc (Houen *et al.*, 1996) et le buffle (Mohanty *et al.*, 2003). L'étude comparative des activités coagulantes et protéolytiques de ces enzymes a révélée qu'elles présentent des caractéristiques proches de celles de la présure (Polaina et MacCabe, 2007).

### ***1.3.2. Coagulases végétales***

Au contraire de la présure qui est spécifique à la  $\kappa$ -caséine, les aspartyl-protéases des plantes peuvent hydrolyser les caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ , ce qui provoque une acidité excessive, une amertume et des défauts de texture des fromages ; ce qui limite leur utilisation industrielle (Simões et Faro, 2004). Les cardosines, les cyprosins et cenprosines sont des protéases acides à activité coagulante sur le lait ; elles sont extraites des fleurs de chardons (*Cynara cardunculus* et *C. scolymus*) très utilisées pour la production traditionnelle des fromages en Espagne (Roserio *et al.*, 2003).



### **1.3.3. Coagulases recombinantes**

La présure bovine recombinante est produite en utilisant comme hôtes les espèces microbiennes suivantes : *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger* et *Trichoderma reesei* (Mohanty *et al.*, 1999). Par ailleurs, la protéase recombinante d'agneau a été produite par Rogelj *et al.* (2001) en utilisant *E.coli*.

### **1.3.4. Coagulases fongiques**

L'utilisation des protéases fongiques dans la coagulation du lait au niveau des industries alimentaires remonte à plus de 30 ans ; les enzymes produites par les 3 espèces *Mucor miehei*, *M. pusillus* et *Cryphonectria* (anciennement *Endothia*) *parasitica* sont largement utilisées dans l'industrie pour la production de différents types de fromages.

#### **➤ Protéases de *Mucor***

Ce sont des aspartyl-protéases produites extra-cellulairement par 2 espèces de zygomycètes *M. pusillus* et *M. miehei*. Elles possèdent une haute activité coagulante relative due à leur pouvoir de rompre sélectivement la  $\kappa$ -caséine et une faible activité protéolytique. Les noms commerciaux des différentes préparations des *mucor*-protéases sont : Rennilase<sup>®</sup>, Fromase<sup>®</sup>, Marzyme<sup>®</sup>, Hannilase<sup>®</sup> (Awad *et al.*, 1999).

#### **➤ Protéases d'*Endothia***

*Cryphonectria parasitica* produit la coagulase du lait avec des propriétés proches de celles de la présure bovine (Awad *et al.*, 1999), l'enzyme est particulièrement utilisée dans les fromages italiens à cause de sa haute thermostabilité, mais son activité protéolytique est plus grande que celle des autres coagulases fongiques. Elle est commercialisée sous le nom de *Suparen*<sup>®</sup> (Polaina et MacCabe, 2007).

## 2. MOISSURES HALOPHILES

### 2.1. Généralités sur les moisissures

#### 2.1.1. Définition

Les moisissures ou micromycètes sont des organismes filamenteux eucaryotes ; l'hyphes en est l'élément structural. La paroi des hyphes contient souvent de la chitine et la croissance apicale du filament est suivie d'une ramification qui conduit à la formation d'un mycélium ou thalle. (Larpen, 1997).

Le mycélium est dit « septé » lorsque des cloisons transversales s'y forment et donne une apparence subdivisée en éléments uni- ou plurinucléés ; les moisissures sont ainsi qualifiées de septomycètes. Les siphomycètes sont ceux dépourvus de cloisons et présentent un appareil végétatif formé d'une série de boyaux (Lanier, 1978).

Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination auxquels on accorde la dénomination globale de *spores*.

Le mode de vie des moisissures est généralement saprophytique, celles-ci se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1996). Certains sont parasites des animaux ou végétaux, d'autres sont symbiotes comme ceux des mycorhizes (Lanier, 1978).

#### 2.1.2. Position systématique

Selon Mc Neill et al. (2006) les moisissures sont classées en 3 grands Phylum :

- *Zygomycotina*.
- *Ascomycotyna*.
- *Basidiomycotyna*.

Leurs principales caractéristiques sont regroupées dans le tableau 1 (Boiron, 1996 ; Botton, 1985).

Tableau 1. Principales caractéristiques de classification des moisissures.

Phylum	<i>Zygomycotina</i>	<i>Ascomycotyna</i>	<i>Basidiomycotyna</i>
Vitesse de croissance	rapide	moyenne	lente
Type de thalle	septé	cloisonné	cloisonné
Spores sexuées	Sporangiospores	Ascospores	Basidiospores

### 2.1.3. Généralités sur les microorganismes extrémophiles

Les micro-organismes extrémophiles sont des organismes capables de survivre dans des conditions inhabituelles (extrêmes). Ces extrémités peuvent être soit physiques (température, pression et radiations ; les microorganismes sont alors qualifiés respectivement de thermophiles, barophiles et radiophiles) soit géochimiques (pH et salinité caractérisant les microorganismes acido/alcaliphiles et halophiles) (Burg, 2003).

## 2.2. Microorganismes halophiles

Les halophiles appartiennent aux trois domaines des microorganismes, ils sont classés en plusieurs catégories selon leur comportement vis-à-vis du NaCl (Das Sarma et Arora, 2001) :

- **Non halophiles** : ne tolérant pas plus de 0,2 M de NaCl.
- **Halotolérants** : tolèrent de 0,2 à 0,85 M de NaCl (2 – 5 %).
- **Halophiles** : supportent des concentrations en NaCl allant de 0,85 jusqu'à 3,4 M (5 - 20 %).
- **Halophiles extrêmes** : peuvent croître de 3,4 à 5,1 M (20 - 30 %) de NaCl.

Pour bien longtemps on a considéré que les environnements salins ne sont peuplés que par les procaryotes (Oren, 2002) et ont donc été monopolisés par les bactériologistes. Ce n'est qu'en 2000 que la mise en évidence de l'existence des eucaryotes dans les habitats hypersalins a été effectuée par Gunde-Cimerman et *al.* Depuis cette date, plusieurs études se sont orientées vers l'exploitation des moisissures halophiles et halotolérantes.

Dans ces milieux, les moisissures diffèrent des procaryotes halophiles par leur capacité à survivre sans utiliser le sel et leur pouvoir de croître et d'ajuster le taux de salinité dans l'intervalle eau douce jusqu'aux solutions saturées en NaCl (Plemenitas et *al.*, 2008).

La distribution des moisissures dans ces environnements dépend du phosphore, de l'azote, de l'oxygène dissous, de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) et du pH (Gunde-Cimerman et *al.*, 2009).

### 2.3. Principaux groupes des moisissures halophiles

Les moisissures isolées des milieux naturels où la salinité excède les 10 % et qui peuvent croître *in vitro* à 17 % de NaCl, sont considérées halophiles (Gunde-Cimerman et *al.*, 2005).

La flore fongique des environnements hypersalins naturels comprend principalement les ascomycètes et les basidiomycètes (Gunde-Cimerman et *al.*, 2009).

- **Les ascomycètes** dont les ordres les plus importants sont
  - Capnodiales.
  - Dothideales.
  - Eurothiales.
- **Les basidiomycètes** avec leurs 3 principaux ordres
  - Trichosporales.
  - Sporidiales.
  - Wallemiales.

### 2.4. Stratégies d'adaptation des moisissures aux milieux hyper salins

Dans les milieux à forte salinité et à faible activité en l'eau, les espèces fongiques développent des mécanismes d'adaptation nécessaires pour la survie dans ces conditions difficiles (Stivaletta et *al.*, 2009).

#### 2.4.1. Équilibre ionique

Les cellules qui vivent dans les environnements hypersalins maintiennent un faible potentiel hydrique par rapport à leur entourage pour pouvoir survivre. L'état d'équilibre est atteint par l'accumulation dans le milieu intracellulaire des ions  $K^+$  à l'aide de la pompe  $Na^+/K^+$  (Gunde-Cimerman et *al.*, 2009).

#### 2.4.2. Accumulation des solutés compatibles

Pour maintenir la concentration intracellulaire du  $Na^+$  au dessous du niveau toxique des cellules, les moisissures accumulent différents polyols, acides aminés libres et leurs dérivés. Certaines utilisent le glycérol, d'autres le sorbitol, le mannitol, l'acide glutamique et l'alanine (Hohman, 2002).

### **2.4.3. Fluidité de la membrane cytoplasmique**

Le changement des propriétés de la membrane plasmique a un rôle important dans l'adaptation des moisissures au stress. La diminution du rapport stérol/ phospholipides rend la membrane plus fluide, donc plus résistante à la pression osmotique. D'autre part, en accumulant les acides gras insaturés, la membrane subit un changement de la composition lipidique et permet donc la rétention des solutés compatibles dans le milieu intracellulaire (Turk et *al.* 2007).

## **2.5. Applications biotechnologiques des moisissures halophiles**

L'utilisation des halophiles en biotechnologie peut être divisée en trois catégories (Oren, 2002).

- **1<sup>ère</sup> catégorie** : l'halo-tolérance de plusieurs enzymes extraites de micro-organismes halophiles peut être exploitée chaque fois que les transformations enzymatiques requièrent une faible activité d'eau. C'est le cas d'un milieu à concentration élevée en sel.

- **2<sup>ème</sup> catégorie** : certains stabilisateurs osmotiques organiques présentent des applications intéressantes lors de l'utilisation de certaines enzymes thermolabiles.

- **3<sup>ème</sup> catégorie** : certains microorganismes halophiles peuvent produire des composés de valeur le plus souvent sans aucune relation directe avec leurs propriétés halophiles. Ces composés sont également produits par des micro-organismes non halophiles mais les halophiles peuvent présenter des avantages distinctifs pour le développement de processus biotechnologiques de production.

### 3. LACTOSÉRUM

#### 3.1. Généralités

Le lactosérum est le liquide jaune pâle qui reste après la coagulation du lait lors de la fabrication du fromage ou de la caséine (Kosikowski, 1979). Selon son degré d'acidité on peut distinguer 2 types ; le lactosérum acide et le lactosérum doux (tableau 2). Leur composition chimique varie considérablement d'un lait à un autre (tableau 3) ; selon la source du lait, les traitements chimiques et les procédés de fabrication (Laplanche, 2004).

Tableau 2. Différents types de lactosérum (Adrian et al., 1991).

Degré d'acidité	Type	pH	Production
< 18° D	Lactosérum doux	6,5 – 6,7	- Fromagerie à pâte pressée - Fromagerie à pâte cuite - Caséinerie présure.
> 18° D	Lactosérum acide	4,5 - 5	- Fromagerie à pâte fraîche - Fromagerie à pâte molle - Caséinerie acide.

Tableau 3. Composition chimique du lactosérum (Alais, 1981).

Paramètres	Lactosérum doux (g/l)	Lactosérum acide (g/l)
Acidité	13,83 <sub>1</sub>	67,16 <sub>1</sub>
Humidité	93,5 <sub>2</sub>	93 <sub>2</sub>
Matières sèches	55 - 75	55 - 65
Cendres	4 - 6	6 - 8
Lactose	40 - 57	40 - 50
Matière azotée totale	7 - 11	4,8 - 10,5
Matière grasse	0 - 5	0 - 2
Acide lactique	0 - 0,3	7 - 8
Chlorure	2,3 - 2,9	2,0 - 2,2
Calcium	0,4 - 0,6	1,2 - 1,4
Phosphore	0,4 - 0,7	0,5 - 0,8
Potassium	1,4 - 1,6	1,2 - 1,5

(1): Degré DORNIC. (2): %.

### 3.2. Valorisation

Avec sa quantité considérable (80 % du lait), le lactosérum pose un problème majeure d'eau résiduaire dans les industries laitières ; mais avec les progrès des sciences on a ré-estimé la valeur nutritive de ce sous-produit qui a souffert autrefois d'un discrédit injustifié. (Alais, 1975).

Son utilisation s'étale sur différents domaines, en particulier le domaine médical, le domaine alimentaire et le domaine biotechnologique.

**3.2.1. Domaine médical :** l'utilisation des fractions protéiques du lactosérum est efficace contre les maladies du cœur, les ulcères, les cancers (Berry, 2000).

**3.2.2. Domaine alimentaire :** une quantité considérable de lactosérum est utilisée dans l'alimentation du bétail. Dans l'alimentation humaine il est utilisé pour les diabétiques ou les sujets souffrant de malnutrition et en alimentation de soutien pour les sportifs et les personnes âgées (Dryer, 2001).

**3.2.3. Domaine biotechnologique :** le lactosérum est un bon milieu de culture pour les microorganismes utilisant le lactose (Alais, 1975).

- **Les levures :** comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr* et *Kluveromyces fragilis*. (Gana et Touzi, 2001 ; Longhi et al., 2004).

- **Les bactéries :** à titre d'exemple *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus lactis* pour la production d'acide lactique. (Mehaia et Cheryan, 1986).

- **Les moisissures :** comme *Penicillium camemberti* producteur de protéases (Mechakra et al., 1999) ; *Mucor miehei* et *Endothia parasitica* produisant des acidoprotéases (Seker et al., 1999).

# Matériel et méthodes



## **1. Matériel biologique**

### **1.1. Prélèvements**

Les prélèvements sont effectués au niveau de 3 sites différents du sol de la sebkha d'Ain Ezzmoul-Ain-mlila Wilaya d'Oum-el-Bouaghi (figure 1) selon le protocole décrit par Pochon et Tardieux (1962) et sont transportés au laboratoire dans les conditions d'asepsies rigoureuses.

### **1.2. Méthodes d'isolement et de purification**

L'isolement et la purification des moisissures prélevées sont réalisés sur milieu de culture PDA (Tournas, 2005) (annexe 1) additionné de 5 mg/ l de gentamycine (Botton, 1985) avec 2 concentrations différentes en NaCl 5 et 20 %.

Une solution-mère de chaque échantillon est préparée avec 1 g de sol dans 10 ml d'eau distillée stérile. Des dilutions décimales de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  sont effectuées ; chaque dilution subit une homogénéisation à l'aide du Vortex. Un volume de 0,1 ml de chaque dilution est ensuiteensemencé dans des boîtes de Pétri sur PDA puis incubé à 30° C pendant 15 j. Les moisissures développées sont repiquées au centre sur le même milieu dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures.

### **1.3. Méthode de conservation**

Les souches fongiques purifiées sont repiquées sur gélose inclinée, incubées à 30° C pendant 7 j puis stockées à 4° C (Takahashi et *al.*, 2008 ; Patidar et *al.*, 2007).

### **1.4. Sélection des souches protéolytiques**

Les souches protéolytiques sont sélectionnées sur gélose à 10 % de caséine (annexe 2) par repiquage au centre. L'incubation a lieu à 25° C pendant 15 j. À partir du 2<sup>e</sup> j, les diamètres des colonies et des zones d'hydrolyses sont mesurés. Chaque opération est réalisée en triple (Ronald et Harold, 1970).

### **1.5. Identification de la souche sélectionnée**

La souche protéolytique la plus performante est soumise à une identification microscopique (caractères morphologiques) et macroscopique (caractères culturels) selon Pitt et Hoecking (2009).



Figure 1. Photographies des trois sites de prélèvements.  
(a : site 1 ; b : site 2 ; c : site 3).

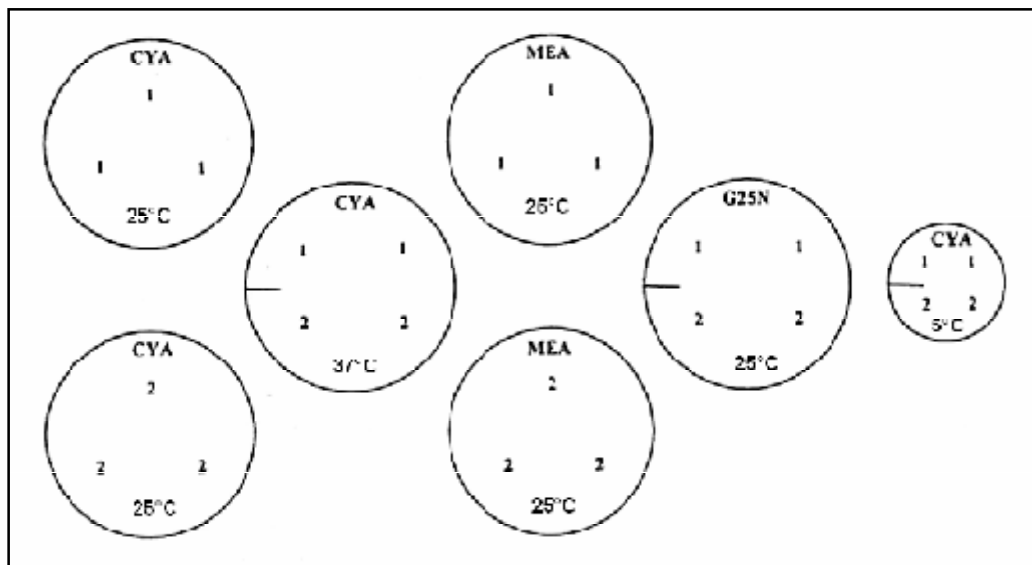


Figure 2. Schéma des isolats fongiques (souche 1 et 2) destinés à leurs identifications.

**1.5.1. Identification macroscopique :** Les cultures sont identifiées sur trois milieux différents, CYA, MEA et G25N (annexes 5, 6 et 7) à 25° C et CYA à 5 et 37° C pendant une durée d'incubation de 7 j. Tous les milieux sont inoculés selon le schéma décrit dans la figure 2.

L'examen à l'œil nu permet la détermination des caractères suivants.

- Vitesse de croissance.
- Texture et couleur du thalle.
- Mode de sporulation.
- Couleur du revers de la colonie.

**1.5.2. Identification microscopique :** Des petits fragments de la moisissure sont prélevés à l'aide d'une anse de platine stérile puis déposés sur une lame et dilués avec le lactofuschine (annexe 8). L'observation microscopique est réalisée aux grossissements x25, x40 et x100.

## **2. Méthodes analytiques**

### **2.1. Mesure du pH du sol**

5 g du sol sont rajoutés à 12,5 ml d'eau distillée stérile ; après agitation le pH de la suspension est mesuré (Pochon et Tradieux, 1962) à l'aide d'un pH-mètre (PHM210. Meterlab)

### **2.2. Mesure de la matière sèche**

#### **2.2.1. Du sol**

Les échantillons de sol sont séchés à l'étuve à 105° C  $\pm$  5° C jusqu'à obtention d'une masse constante, soit en moyenne après 15 heures. La différence entre le poids avant et après séchage exprime la teneur en eau de l'échantillon initial. Le poids après séchage représente la matière sèche (CIRAD, 2004).

#### **2.2.2. Du lactosérum**

Un volume déterminé de lactosérum est séché également à l'étuve à 105° C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La matière sèche est exprimée par la formule suivante (AFNOR, 1986).

$$MS = (M_2 - M_1) (1000 / V) \text{ mg/ml.}$$

$M_1$  : Masse en gramme de la capsule vide.

$M_2$  : Masse en gramme de la capsule et le résidu.

$V$  : Volume en millilitre de l'échantillon.

L'humidité (%) est donnée par la formule :  $H = 100 (\%) - MS (\%)$ .

### 2.3. Mesure des cendres

#### 2.3.1. Du sol

Les échantillons sont calcinés à 480° C dans un four à moufle pendant 5 h. La perte de masse par combustion correspond à la quantité de la matière organique (CIRAD, 2004).

#### 2.3.2. Du lactosérum

La prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche est suivie par une incinération au four à moufle à 550° C pendant 5 h. La formule utilisée est la suivante (AFNOR, 1986).

$$C = (M_0 - M_1 / M_2 - M_1) \times 100 (\%)$$

$M_0$  : Masse de la capsule et les cendres.

$M_1$  : Masse de la capsule vide.

$M_2$  : Masse de la capsule et la prise d'essai

### 2.4. Mesure de la conductivité électrique du sol

10 g de sol sont mélangés avec 50 ml d'eau distillée. Après agitation de 30 min, la décantation est accélérée par centrifugation pendant 2 min. la conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre (CIRAD, 2004).

### 2.5. Mesure de l'acidité Dornic du lactosérum

L'acidité Dornic est mesurée par titration d'un volume déterminé de lactosérum additionné de 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine (1 %) par NaOH N/9. La réaction est arrêtée dès l'apparition d'une couleur rose qui dure quelques minutes par rapport à un témoin (AFNOR, 1986). L'acidité est donnée par la formule :

$$A = V / E.$$

**V** : Volume de soude (ml).

**E** : Volume du lactosérum (ml).

## **2.6. Mesure des sucres totaux**

La détermination de la concentration en sucres du lactosérum est réalisée par la méthode de Dubois (1956) (annexe 9) par rapport à une courbe d'étalonnage (annexe 10).

## **2.7. Mesure des protéines totales**

La méthode utilisée est celle de Lowry (1965) dont la principale réaction est la réduction de la tyrosine et le tryptophane entrant dans la composition de la protéine à doser (annexe 11). La concentration de protéines est déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage (annexe 12).

## **2.8. Mesure de l'activité protéolytique**

L'activité est déterminée par utilisation de la caséine comme substrat dans les conditions adoptées par Mechakra et *al.* (1999) (annexe 13). Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de tyrosine libérés par 1 ml d'extrait enzymatique pendant 1 h de digestion (U) par rapport à une courbe d'étalonnage de la tyrosine (annexe 14).

# **3. Méthodes de fermentation et de production**

## **3.1. Préparation du milieu de fermentation**

Le milieu de culture de base est préparé à partir du lactosérum provenant de l'unité de production laitière SAFILAIT de la région d'Ain Smara - Constantine. Celui-ci est chauffé à 100° C pendant 30 min, acidifié à pH 4,6, décanté, filtré puis son pH ajusté à 4, 7 et 8,5 par addition de tampons phosphate (2 : 1, v : v) (voir schéma du protocole en annexe 15) (Derouiche, 2002). Le milieu ainsi préparé est enrichi par addition de trypticase (11,4 g/l),  $\text{FeSO}_4$  (0,015 g/l) et  $\text{MgSO}_4$  (0,76 g/l) (Bellounissi., 2004).

### **3.2. Préparation de l'inoculum**

#### **3.2.1. Sporulation**

La sporulation des souches identifiées est réalisée sur PDA dans des tubes à gélose inclinée à température ambiante pendant 1 semaine. Les spores sont récupérées par addition de 9 ml d'eau distillée stérile et agitation (Patidar *et al.*, 2007 ; Zhao, 2010).

#### **3.2.2. Dénombrement des spores**

Le nombre des spores est estimé par mesure de l'absorbance à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 6315) par rapport à une courbe d'étalonnage établie par comptage des spores à l'aide de la cellule de Thomas (annexe 16).

### **3.3. Ensemencement des milieux de fermentation**

Les milieux sont ensemencés à un taux de  $10^6$  spores / ml. Les flacons Erlen-Meyer sont incubés à 25° C pendant 8 j sous agitation à 200 rpm. Tous les essais sont effectués en trois répétitions.

### **3.4. Préparation des extraits bruts**

Après fermentation, le milieu de culture est soumis à une centrifugation pendant 15 min à 3000 g ; le surnageant est réajusté à la valeur initiale du pH ; il représente l'extrait exocellulaire. Le culot est rincé à l'eau distillée puis égoutté sur linge propre pendant 30 min. Le mycélium humide est mélangé dans le tampon initial à une concentration de 10 % (w/v) puis additionné de 1 % de Tween 20 et broyé à l'ultra-Turax (IKA-WERKE) pendant une minute à vitesse maximale. Le broyat représente l'extrait endocellulaire (Derouiche, 2002).

L'activité protéolytique de chaque extrait est dosée afin de sélectionner la souche la plus active. Des prélèvements du milieu de fermentation sont effectués chaque 24 h afin d'établir les cinétiques de croissance et de production.

## **4. Purification de l'enzyme**

L'extrait enzymatique de la souche sélectionnée subit une purification par les techniques suivantes.

- Précipitation par le sulfate d'ammonium.
- Dialyse.
- Tamisage moléculaire sur gel Sephadex G100.

Après chaque étape, la concentration en protéines totales et l'activité enzymatique sont dosées.

#### **4.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium**

Le sel est utilisé à trois concentrations ; 30, 60 et 80 % de saturation, sous agitation modérée à 0° C. Le mélange est centrifugé à 6000 g pendant 10 min après chaque précipitation. Les culots sont remis en solution dans 10 ml de tampon phosphate (0,2 M pH 4).

#### **4.2. Dialyse**

La solution obtenue après chaque précipitation est dialysée dans des boudins en cellophane préalablement préparés (annexe 17) (Kamoun, 1991) contre un grand volume de tampon phosphate (0,2 M pH 4) sous agitation, à froid (4° C) pendant 24 h.

#### **4.3. Chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex G100**

La chromatographie est effectuée à l'aide d'une colonne en verre de dimension 90 cm x 2 cm (Pharmacia Fine Chemicals) de gel Sephadex G100 (Pharmacia Fine Chemicals) préalablement gonflé dans du tampon phosphate (0,2 M pH 4) pendant 3 j à température ambiante et stabilisé. Pour cela, 15 ml de l'extrait sont élués par le même tampon. L'éluat est récupéré par fractions de 5 ml ; l'absorbance de chaque fraction est mesurée à 280 nm.

### **5. Étude des propriétés de l'enzyme purifiée**

#### **5.1. Effet du pH**

Le pH optimal est estimé dans l'intervalle de 3 à 10 en utilisant les tampons suivant.

- Phosphate monosodique 0,2 M / citrate pour l'intervalle 3 à 5.
- Phosphate monosodique 0,2 M / phosphate disodique 0,2 M pour l'intervalle 5 à 8.
- Phosphate disodique 0,2 M / NaOH pour l'intervalle 8 à 10.

#### **5.2. Effet de la température**

L'effet de la température est étudié dans l'intervalle de 30 à 100° C en mesurant l'activité enzymatique au pH optimal.

### 5.3. Stabilité thermique

L'activité résiduelle de l'enzyme est estimée à 70, 80, 90 et 100° C chaque 10 min durant 120 min. La courbe de l'activité enzymatique en fonction du temps permet le calcul de la demi-vie de l'enzyme pour chaque température testée.

### 5.4. Étude cinétique de l'enzyme

L'activité de l'enzyme est mesurée en fonction des concentrations en caséine (substrat) variant de 0 à 5 % aux optima de pH et de température; ce qui permet d'établir la cinétique de l'enzyme et de calculer les paramètres  $K_M$  et  $V_m$ .

### 5.5. Effet de la concentration en NaCl

L'étude de l'influence du chlorure de sodium sur l'activité protéolytique est mesurée dans l'intervalle de 0 à 30 % avec un incrément de 5 % aux conditions optimales décrites plus haut.

### 5.6. Effet de la concentration en $Ca^{++}$

L'influence du calcium sur l'activité enzymatique est étudiée en ajoutant 0,5 ml d'une solution de  $CaCl_2$  à des concentrations allant de 0 à 0,1 M au mélange réactionnel dans les mêmes conditions précitées.

## 6. Test de coagulation du lait

L'activité coagulante de la protéase purifiée est mesurée par la méthode de Berridge (1945) modifiée par Siboukeur *et al.* (2005) en mélangeant :

- 10 ml de lait écrémé (10 %) additionnée de 0,01 M de  $CaCl_2, 2H_2O$ .
- 1 ml de la protéase purifiée ; Le mélange réactionnel est incubé à 37° C.

L'unité de coagulation est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour faire coaguler 10 ml de substrat en 40 min.



# Résultats et discussions

### 1. Analyses physicochimiques du sol

Les propriétés physicochimiques des échantillons du sol sont rapportées dans le tableau 4. La Sebkhah d'où les échantillons ont été prélevés se caractérise par une salinité extrêmement élevée et un taux de végétation très réduit.

Selon Richards (1969), on peut définir le type de sol en fonction de sa conductivité (tableau. 5). Ainsi l'échantillon E2 dont la conductivité est 3,67 mS/ cm est considéré comme étant un sol très salé, alors que les échantillons E1 et E3 sont considérés comme extrêmement salés avec respectivement des conductivités égales à 7,45 et 10,65 mS/ cm.

Le tableau 4 montre que le pH des échantillons est neutre tendant légèrement vers l'alcalinité ce qui concorde avec les résultats obtenus par Oren (2002) et Cantrell et al. (2006). Ces derniers ont observé un pH variant entre 7,3 et 8,2 après l'étude des milieux hypersalins au Puerto Rico ; c'est également ce qu'a révélé l'étude de Stivaletta et al. (2009) (pH entre 7,4 et 7,8) pour les sebkhas de Tunisie.

Les analyses des échantillons ont montré qu'E1 et E3 sont pauvres en matière organique mais relativement riches en sel minéraux par rapport à l'échantillon E2. Ceci est probablement dû à la présence de la végétation au niveau du site. Elles ont également montré un taux d'humidité des sols faible pour E1 (9,44 %) est relativement élevé pour E2 et E3 (24,60 et 26,99 %).

Tableau 4. Résultats de l'analyse physicochimique des 3 échantillons du sol.

Paramètres	Échantillons		
	E1	E2	E3
pH	7,71	7,75	7,76
Conductivité électrique (mS/ cm)	7,45	3,67	10,65
Humidité (%)	9,44	24,605	26,995
Matières sèches (%)	90,56	75,395	73,005
Matières organiques (%)	4,41	7,53	3,98
Cendres (%)	95,58	92,46	96,01

Tableau 5. Type de sol en fonction de la conductivité électrique (Richards, 1969).

Type du sol	Non salé	Peu salé	Salé	Très salé	Extrêmement salé
Conductivité (mS/cm)	< 0,6	0,6 – 1,2	1,2 – 2,4	2,4 - 6	> 6

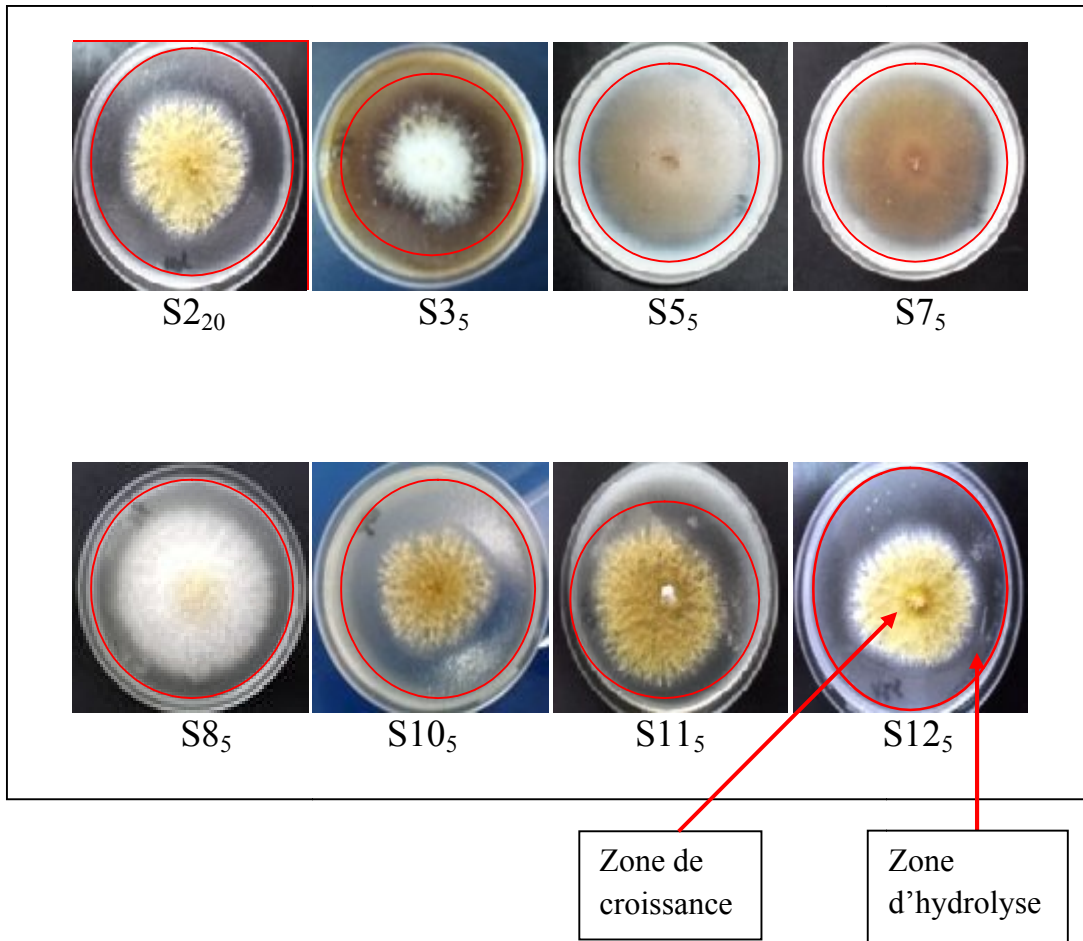


Figure 3. Résultats de la croissance des souches protéolytiques sur caséine gélifiée.

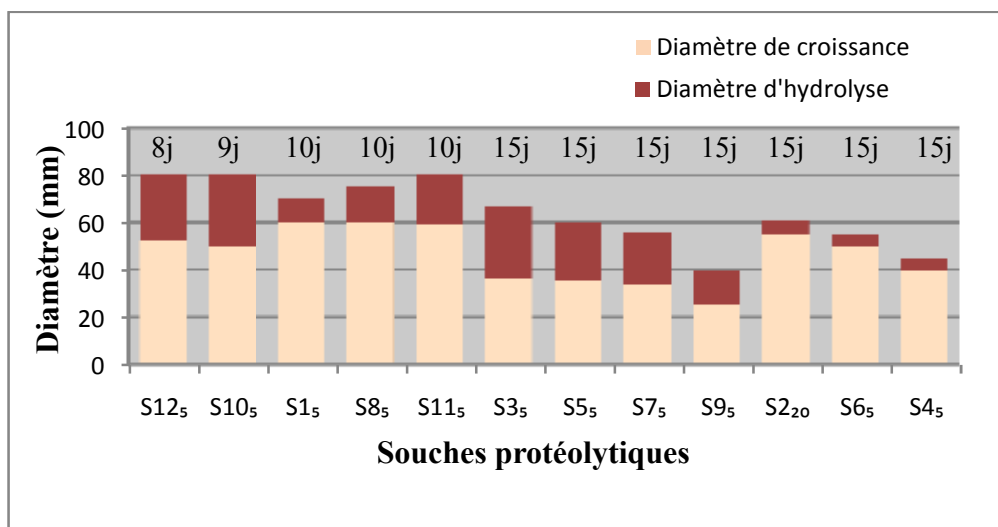


Figure 4. Diamètre des zones de croissance et d'hydrolyse sur la gélose caséinée.

## 2. Isolement des moisissures à partir du sol

Le tableau 6 résume la répartition du nombre de colonies des moisissures apparues dans les trois échantillons du sol. Le nombre total des souches isolées à partir de l'échantillon E2 est très élevé (14) par rapport à E1 (5) et E3 (4), cela s'explique par le taux relativement élevé de la matière organique du E2 comme décrit par Gunde-Cimerman *et al.* (2005) qui ont mentionné que le nombre des moisissures halophiles du sol est proportionnel à sa quantité en matière organique.

Tableau 6. Nombre de souches obtenus des 3 échantillons du sol.

Échantillon	Nombre de colonies	
	5 % NaCl	20 % NaCl
E1	2	3
E2	10	4
E3	3	1
Totale	15	8
	23	

## 3. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Les résultats obtenus après incubation sur gélose caséinée ont permis la sélection de 12 souches ayant une activité protéolytique parmi les 23 souches testées. Les souches protéolytiques sont reconnues par l'halo transparent résultant de la dégradation de la gélose caséinée par l'exoprotéase produite et qui entoure les colonies (figure 3) ; plus le halo est grand, plus la quantité d'enzyme est importante.

Les diamètres des zones de croissance et d'hydrolyse de chaque souche sont représentés dans la figure 4. Le temps d'incubation varie de 8 à 15 j comme indiqué sur la figure.

La comparaison des diamètres de croissance et d'hydrolyse a permis de retenir 8 souches pour la suite du travail ; à savoir l'identification et la fermentation. Les souches sélectionnées sont S3<sub>5</sub>, S5<sub>5</sub>, S7<sub>5</sub>, S8<sub>5</sub>, S10<sub>5</sub>, S11<sub>5</sub>, S12<sub>5</sub> et S2<sub>20</sub>.

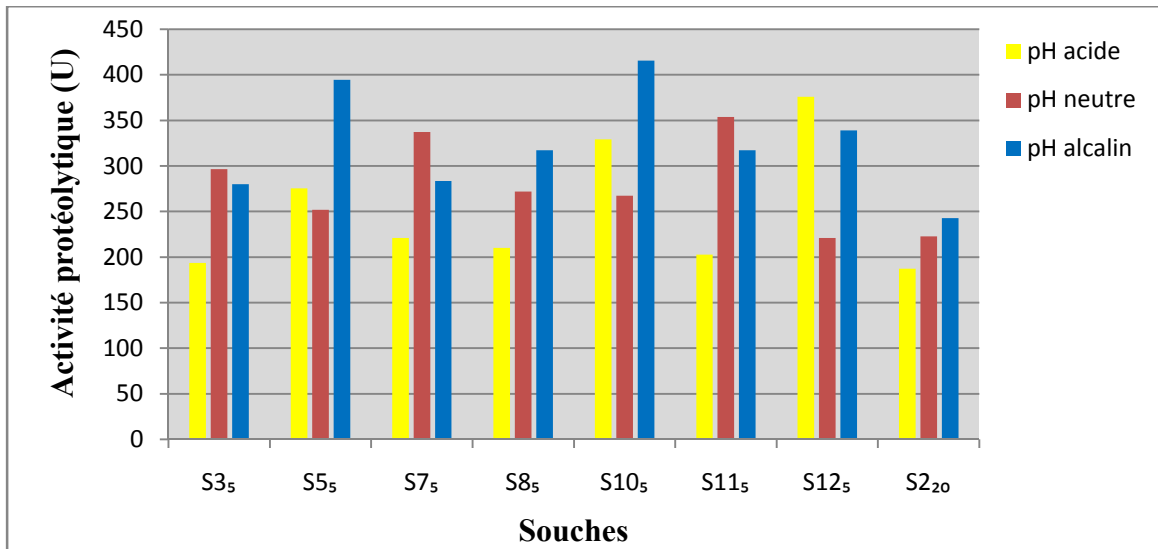


Figure 5. Activité protéolytique exocellulaire des souches après fermentation du milieu.

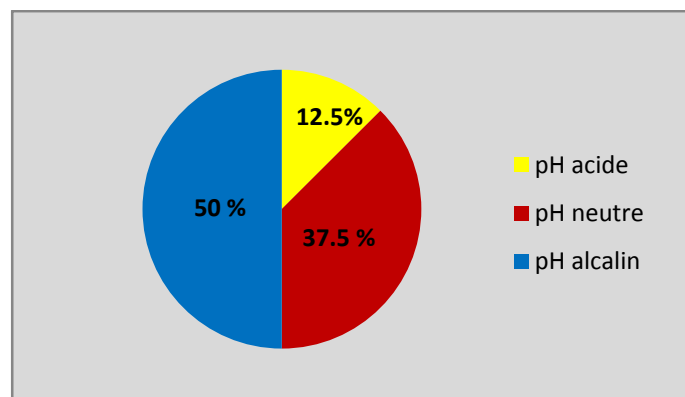


Figure 6. Pourcentage des activités produites après culture.

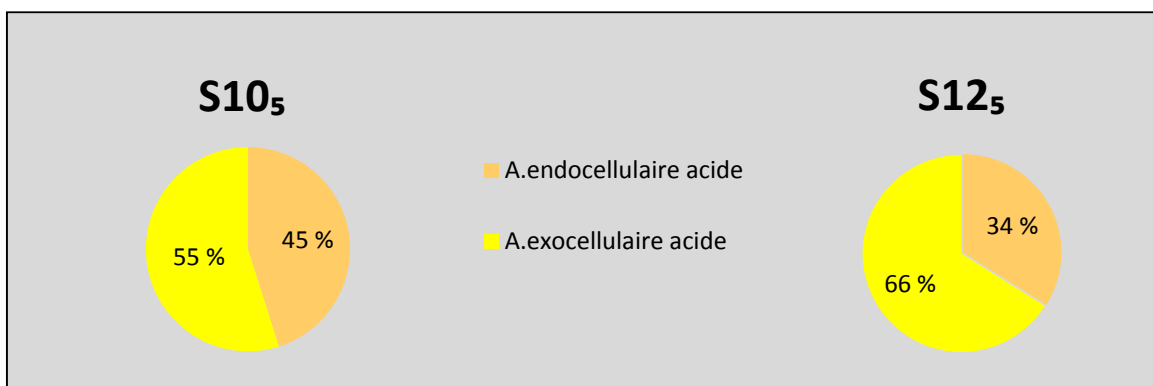


Figure 7. Répartition des activités endo et exocellulaire.

#### 4. Analyse du lactosérum

L'étude de la composition chimique du lactosérum a donné les résultats représentés dans le tableau 7. Ces résultats ont donné un pH de 5,09 et un degré d'acidité égal à 68° D ; ce qui indique qu'il s'agit d'un lactosérum acide. Le tableau indique également que notre échantillon contient 44,17 g/l de lactose et 60 g/l de matière sèche ; ce qui concorde avec la bibliographie (Alais, 1975 ; Adrian et *al.*, 1991 ; Jeantet, 2007).

Par ailleurs, la teneur en sels minéraux (10,4 g/l) est relativement élevée par rapport à celles rapportées par Alais (1975) et Jeantet (2007), soit 6-8 g/l et 9 g/l respectivement. Par contre, les protéines (1,221 g/l) sont présentes en quantité inférieure à celle rapportée par les mêmes auteurs. Ceci est dû aux nouvelles méthodes de préparations de fromages qui visent à minimiser les pertes pour des raisons économiques (Kelly et *al.*, 2008).

Tableau 7. Composition physicochimique du lactosérum.

Paramètres	Lactosérum industriel
pH	5,09
Acidité Dornic (° D)	68
Lactose (g/l)	44,17
Matière sèche (g/l)	60
Cendres (%)	1,04
Protéines (g/l)	1,221

#### 5. Activité protéolytique des souches sélectionnées

Les résultats des types d'activités protéolytiques exocellulaires produites par les souches sélectionnées sont représentés dans la figure 5. La comparaison entre les 8 souches fait apparaître des différences de production entre les activités acides, neutres et alcalines. En effet, 50 % des souches donnent une meilleure activité à pH alcalin, 37,5 % à pH neutre et seulement 12,5 % à pH acide (figure 6). Cela s'explique par la nature du milieu d'isolement se caractérisant par un pH neutre tendant vers l'alcalinité (sol salé) (tableau 4). Ces résultats sont confirmés par plusieurs études entre autres : Shivanand et *al.* (2010) et Vidyasagar et *al.* (2009) qui ont isolé à partir des milieux naturels salés des souches à activité protéolytique alcaline ou neutre mais pas acide.

La comparaison des activités protéasiques exocellulaires acides (pH 4) des différentes souches montre que les souches S12<sub>5</sub> et S10<sub>5</sub> sont les plus actives avec respectivement 376 U et 329 U (figure 5). Alors que les résultats des activités endocellulaires à ce pH

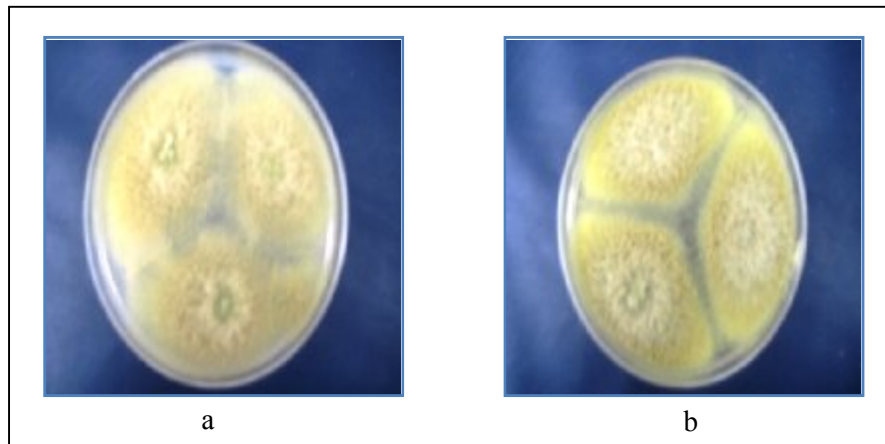


Figure 8. Aspect des colonies de la souche S12<sub>5</sub> après 7 j à 25° C.  
(a : sur CYA ; b : sur MEA)

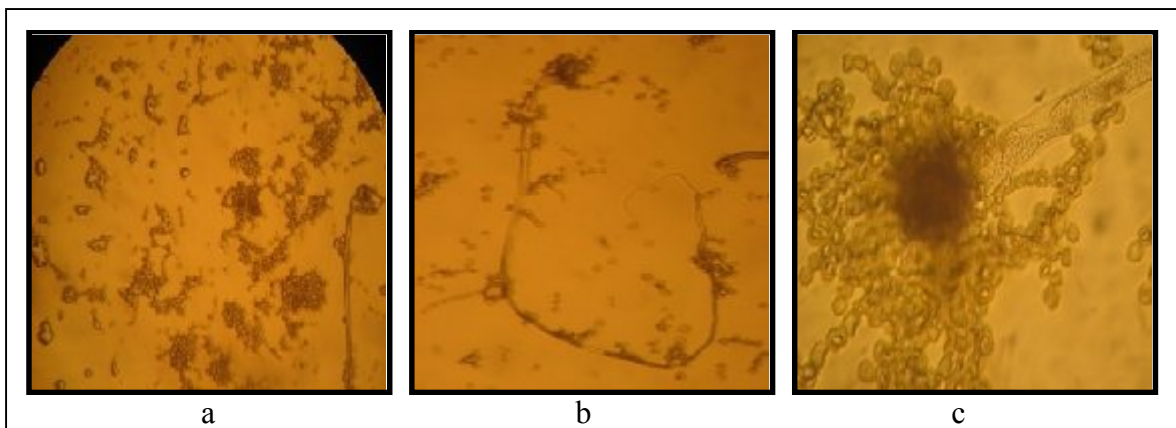


Figure 9. Aspect des colonies de la souche S12<sub>5</sub> sous microscope optique.  
(a : × 25 ; b : × 40 ; c : × 100)

pour ces deux souches sont respectivement de 193 U et 270 U. La répartition des activités exocellulaires et endocellulaires est représentée dans la figure 7 ; elle montre un rapport exo/endo de 1,94 pour S12<sub>5</sub> et de 1,21 pour S10<sub>5</sub>.

Ces résultats permettent de considérer la souche S12<sub>5</sub> comme étant la plus productrice de la protéase acide exocellulaire ; elle est sélectionnée pour la suite du travail.

## 6. Identification de la souche sélectionnée

La souche sélectionnée est identifiée après une étude macroscopique et microscopique.

### 6.1. Identification macroscopique

L'étude macroscopique de la souche S12<sub>5</sub> après incubation de 7 jours sur 3 milieux différents et à 3 températures donne les résultats rassemblés dans le tableau 8 ; l'aspect des colonies est représenté dans la figure 8. D'après Pitt et Hoecking (2009), ces résultats indiquent que la souche appartient au genre *Aspergillus*.

Tableau 8. Caractères macroscopiques de la souche S12<sub>5</sub>.

T (°C)	Milieu de culture	Ø (mm)	Aspect
25	MEA	55	Colonie verte claire, revers blanc sale, spores vertes.
	CYA	60	
	G25N	18	Colonie blanche, revers opaque, spores jaunes.
37	CYA	40	Colonie opaque, revers vert clair, spores vertes.
5	CYA	+	

T : Température d'incubation ; Ø : Diamètres des colonies après 7 j d'incubation.

### 6.2. Identification microscopique

La figure 9 représente la souche S12<sub>5</sub> observée sous microscope optique à différents grossissements ; elle montre les structures suivantes.

- Conidiophore non ramifié.
- Tête conidienne radiée avec vésicule globuleuse.
- Phialides emportées par les vésicules.

L'ensemble de ces structures caractérise le genre *Aspergillus* (Pitt et Hocking, 2009 ; Botton, 1985), ce qui confirme l'étude macroscopique.



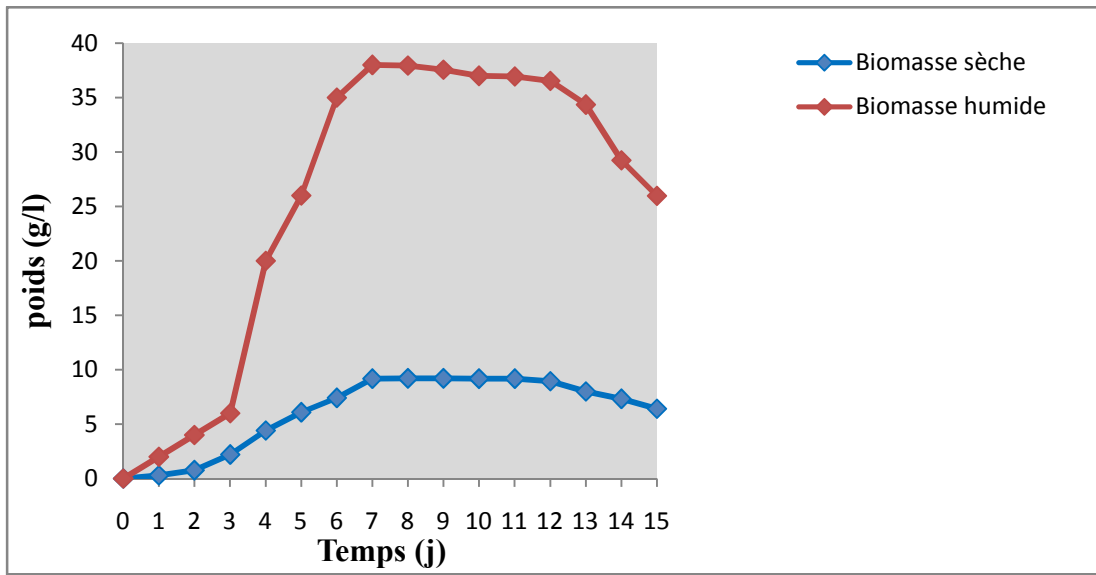


Figure 10. Cinétique de croissance d'*Aspergillus sp.*

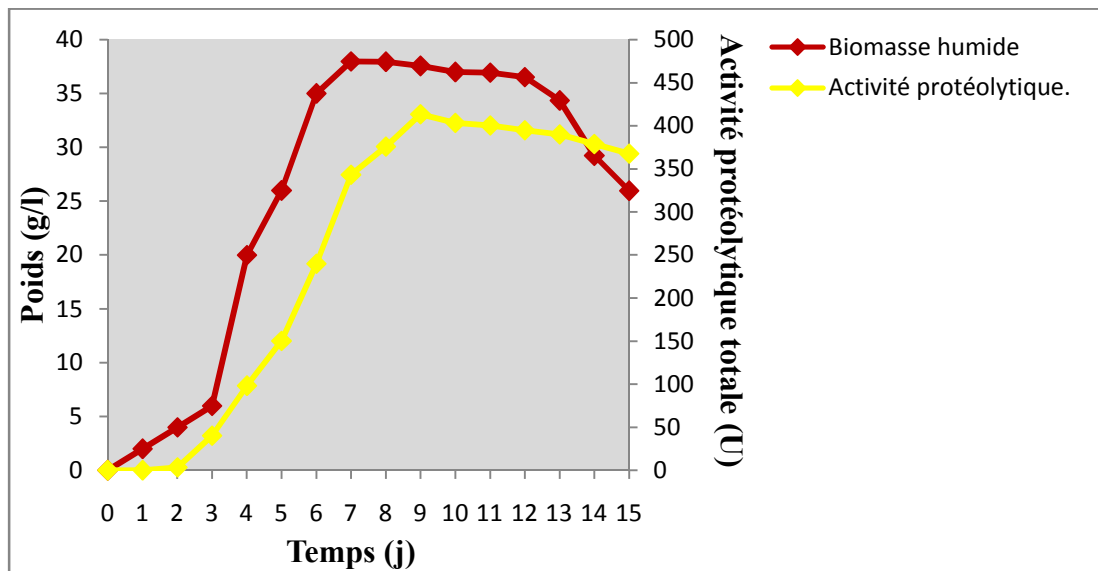


Figure 11. Cinétique de production de la protéase acide par *Aspergillus sp.*

## 7. Cinétique de croissance de la souche S12<sub>5</sub>

La croissance de la souche S12<sub>5</sub> est étudiée à travers l'évolution dans le temps de la biomasse cellulaire et de la production de la protéase exocellulaire.

### 7.1. Évolution de la biomasse

L'évolution de la biomasse en fonction du temps est représentée par la figure 10. Elle se traduit par une courbe de croissance classique avec ses quatre phases : de latence, exponentielle, stationnaire et de déclin (Scriban, 1999). La phase de latence dure 24 h et correspond à l'adaptation et à la germination de l'inoculum. La phase exponentielle dure 120 h (du 2<sup>e</sup> jusqu'au 7<sup>e</sup> j) ; elle est caractérisée par une croissance rapide où le poids humide atteint une valeur maximale de 38 g/l. La phase stationnaire s'étale du 7<sup>e</sup> au 12<sup>e</sup> j et se caractérise par un poids presque constant (38 g/l à 36,54 g/l) ; celle-ci correspond à l'égalité du nombre des cellules viables et des cellules mortes par autolyse cellulaire. La croissance se termine par la phase de déclin à partir du 12<sup>e</sup> où la biomasse diminue jusqu'à 25,97 g/l (au 15<sup>e</sup> j) ; le nombre des cellules viables diminue à cause de l'épuisement du milieu.

L'allure de l'évolution de la biomasse sèche en fonction du temps est identique à celle de la biomasse humide avec un poids sec maximal de 6,42 g/l.

### 7.2. Évolution de l'activité protéolytique

La cinétique de production de la protéase acide en fonction du temps (figure 11) montre que la production s'amorce au 3<sup>ème</sup> j, puis elle augmente tout au long des phases de croissance exponentielle et stationnaire ; elle atteint un pic de 413,636 U au 9<sup>e</sup> j, puis elle diminue jusqu'à 367,98 U au 15<sup>e</sup> j. Ces résultats indiquent que la production de la protéase acide est de type partiellement associé à la croissance, ce qui prouve que c'est un métabolite secondaire (Scriban, 1999).

La production maximale de l'enzyme est observée après 9 j d'incubation ; c'est le temps retenu pour la suite de l'étude.

Tableau 9. Résultats de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium.

Paramètres Préparations	Activité totale (U)		Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	
	Avant dialyse	Après dialyse		Avant dialyse	Après dialyse
Extrait brut	15040		35,96	418,24	
Culot 30%	726,85	3468.85	9,09	79.96	381.61
Culot 60%	623,11	5837	4,68	133,14	1247.22
Culot 80%	41,35	3178.20	4.57	9,04	695,44

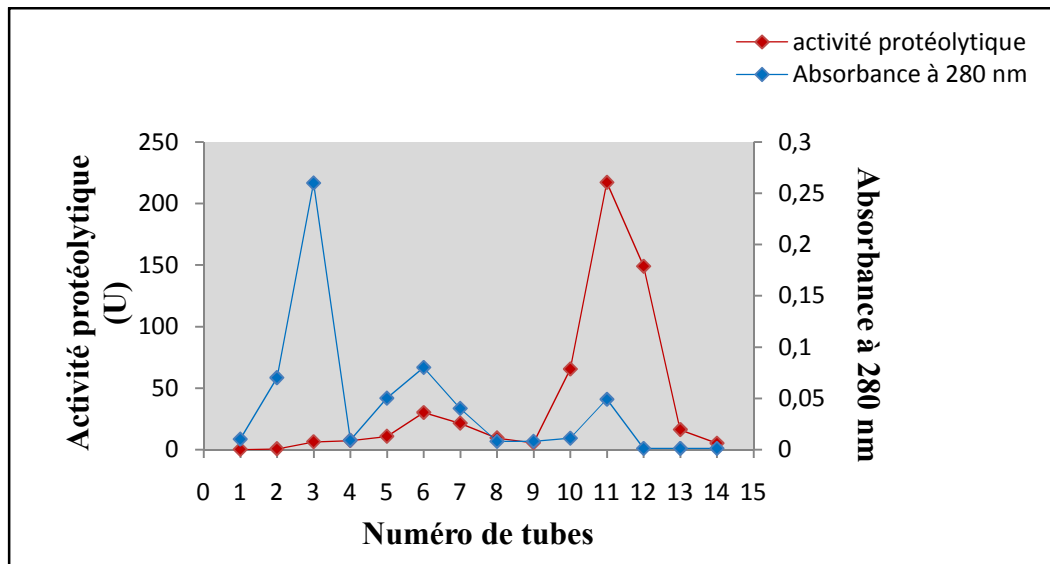


Figure 12. Profil d'éluion de la chromatographie sur gel de Sephadex G100.

Tableau 10. Bilan de purification de l'extrait enzymatique.

Étape de purification	Volume (ml)	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Degrés de purification
Extrait totale	40	15040	35,96	418,24	100	1
Fraction 60%	20	5837	4,68	1247,22	38,80	3
Chromatographie sur gel	5	1447	0,16	9043,81	9,62	21,62

## **8. Purification de l'extrait enzymatique**

L'extrait enzymatique produit par la souche S12<sub>5</sub> est purifié par les trois techniques : précipitation par le sulfate d'ammonium, dialyse et chromatographie sur Sephadex G100.

### **8.1. Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium et dialyse**

Les résultats de la précipitation par le sulfate d'ammonium et de la dialyse sont présentés dans le tableau 9. Avant dialyse, les extraits 30, 60 et 80 % avaient une activité très faible, cela s'explique par la présence de sel d'ammonium dans le milieu, ce qui entraîne la dénaturation de l'enzyme.

Après dialyse, l'activité enzymatique des extraits augmente beaucoup ; ceci est dû à la renaturation des protéines concentrées par élimination du sulfate d'ammonium et des impuretés diffusibles.

La comparaison des résultats des activités spécifiques des différentes fractions fait apparaître que le précipité à 60 % dialysé a donné le meilleur résultat donc il sera retenu pour la dernière étape de purification.

### **8.2. Chromatographie sur Sephadex G100**

Le profil d'élution de l'extrait enzymatique sur gel Sephadex G100 (figure 12) fait apparaître l'existence de deux fractions, une mineure, correspondant au pic relatif au 6<sup>ème</sup> tube (30 ml), l'autre majeure représentée par le pic maximal de l'activité au 11<sup>ème</sup> tube (55 ml). Cette dernière correspond à l'extrait enzymatique partiellement purifié.

Les résultats des différentes étapes de purification de l'enzyme sont résumés dans le tableau 10. La précipitation par le sulfate d'ammonium a permis d'augmenter l'activité spécifique de 3 fois avec un rendement de 38,80 %. La chromatographie a donné une fraction enzymatique avec un degré de purification de 21 fois et un rendement de 9,62 % par rapport à l'extrait initial ; ceci est dû à l'élimination totale du sulfate d'ammonium et de la plupart des protéines non enzymatiques.

## **9. Propriétés de la protéase purifiée**

L'effet de plusieurs paramètres (température, pH, concentration en substrat, en NaCl et en calcium) est étudié sur l'activité de la protéase afin de connaître ses propriétés.

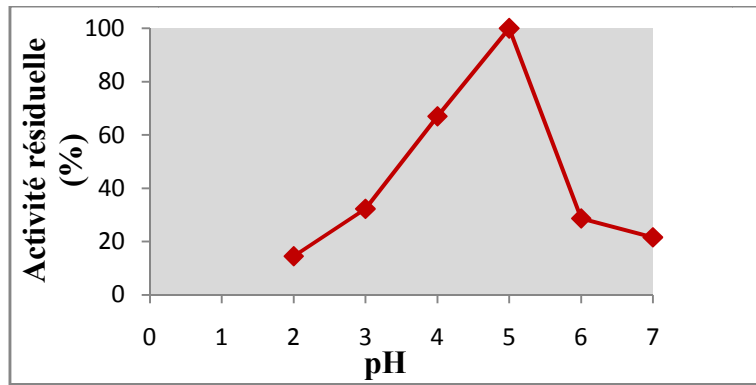


Figure 13. Effet du pH sur l'activité de l'enzyme.

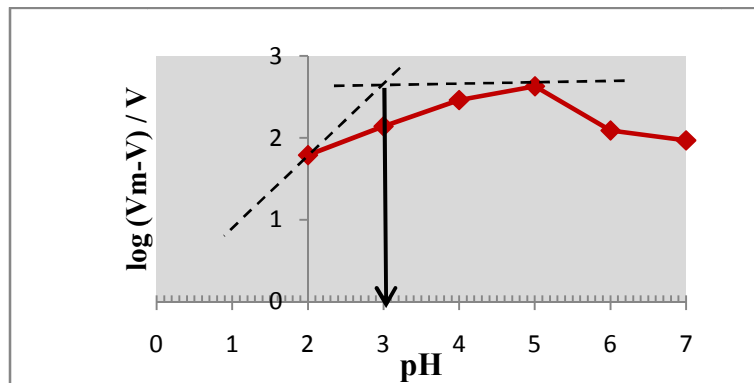


Figure 14. Représentation de Dixon.

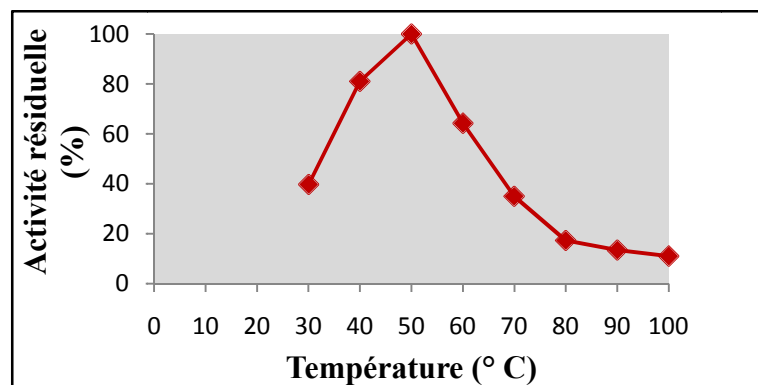


Figure 15. Effet de la température sur l'activité de l'enzyme.

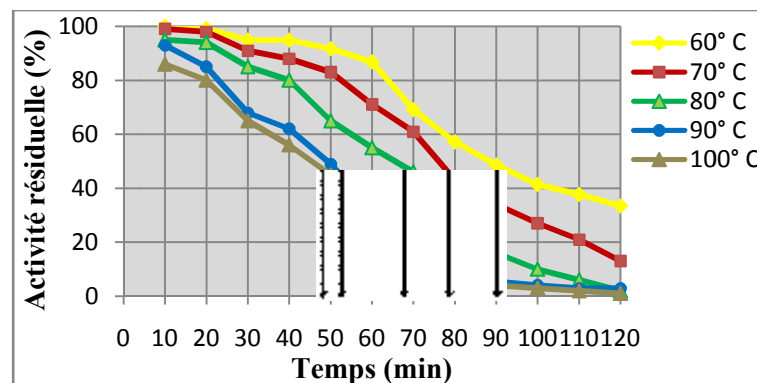


Figure 16. Effet de la température sur la stabilité de l'enzyme.

### 9.1. Effet du pH sur l'activité de l'enzyme

L'évolution de l'activité de la protéase en fonction du pH est représentée dans la figure 13. On remarque que le pH optimal de l'enzyme est de 5, le même que celui rapporté par Negi et Banerjee (2009) pour la protéase d'*Aspergillus awamori* MTCC 6652. Ce pH est par contre supérieur à celui rapporté par Vishwanatha et al. (2009) pour la protéase d'*A.oryzae* MTCC 5341 (3,2) et inférieur à celui de Lee et al., (2010) pour *A.oryzae* LK-101 (6,5). Ces écarts de pH sont dus à la nature du substrat utilisé ; Lee et al. (2010) ont utilisé la caséine comme substrat alors que Vishwanatha et al. (2009) ont utilisé l'hémoglobine. Le caractère acide de la protéase purifiée indique son importance dans les industries fromagères comme substitut de la présure.

La représentation de Dixon (figure 14) représente  $\log(V_m)$  en fonction du pH ; elle permet de calculer la constante d'ionisation apparente du site actif (pK). Selon le graphe le pK est égal à 3,1 (la projection du point d'intersection des deux tangentes +1 et 0 sur l'axe des abscisses) ; par comparaison aux valeurs de pKa des chaînes latérales des acides aminés, on conclut que le site actif contient probablement un acide aminé dicarboxylique ce qui indique que la protéase étudiée peut être une aspartyl- ou une glutamyl-protéase.

### 9.2. Effet de la température sur l'activité de l'enzyme

L'influence de la température sur l'activité protéolytique est représentée dans la figure 15. L'activité de l'enzyme est maximale à 50° C ; elle est similaire à celle obtenue par Lee et al. (2010) qui rapportent une température optimale de 50° C pour la protéase acide d'*Aspergillus oryzae* LK-101 ; elle est inférieure à celle trouvée par Negi et Banerjee (2009) et Vishwanatha et al. (2009) qui ont observé une température de 55° C pour *A.awamori* MTCC 6652 et pour *A.oryzae* MTCC 5341. Cela confirme également les travaux de Lim et al. (1999) indiquant une activité maximale des protéases acides dans l'intervalle de température compris entre 45 - 55° C.

### 9.3. Étude de la thermostabilité de l'enzyme

La figure 16 représente l'effet des températures élevées en fonction du temps sur l'activité de la protéase. Elle montre qu'après 1 heure de chauffage, la protéase acide purifiée garde plus de 80 % de son activité à 60° C, 70 % à 70° C et 50 % à 80° C. L'enzyme ne garde que 30 % de son activité à 90 et 100° C. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Negi et Banerjee (2009) pour la protéase acide d'*A.oryzae* MTCC 6652

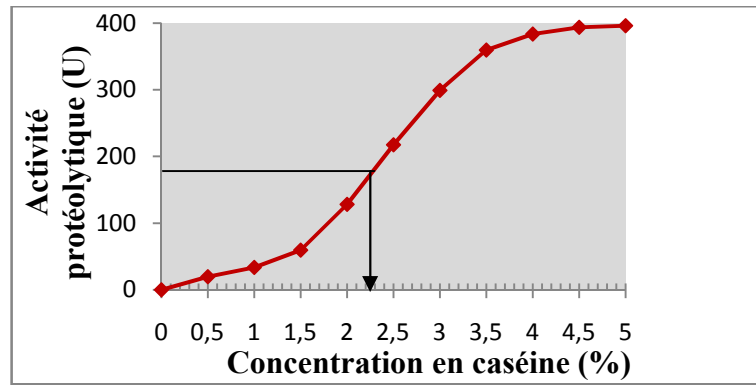


Figure 17. Effet de la concentration de substrat sur l'activité de l'enzyme.

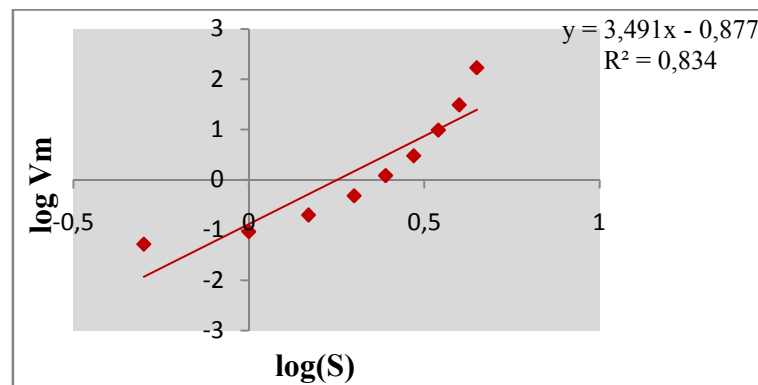


Figure 18. Représentation de Hill de la protéase acide étudiée.

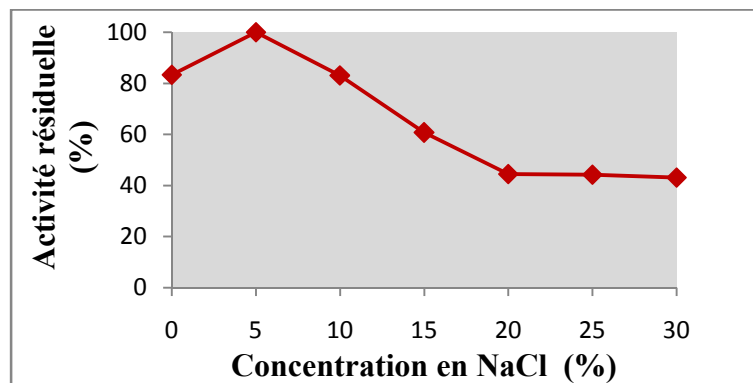


Figure 19. Effet du NaCl sur l'activité de l'enzyme.

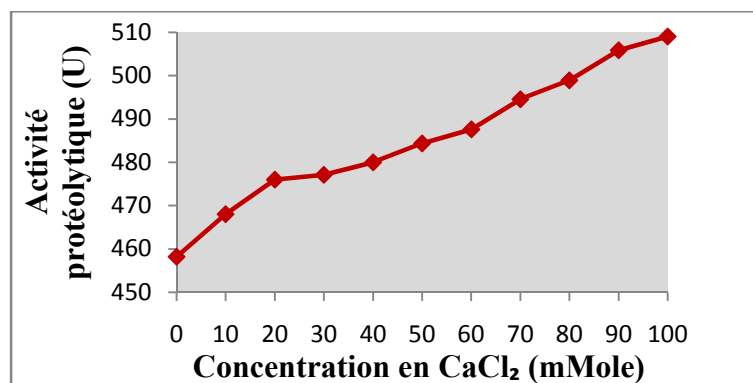


Figure 20. Effet du NaCl sur l'activité de l'enzyme.

qui après une heure de chauffage, n'a gardé que 60 % de son activité à 60° C et l'a totalement perdu à 70° C. Par ailleurs les protéases acides d'*A.oryzae LK-101* (Lee et al., 2010) et d' *A.awamori MTCC 5341* (Vishwanatha et al. 2009) ont présenté une faible thermostabilité en ne gardant après 30 min de réaction que 20 % de leur activité à 60° C et pas plus de 10 % à 70° C.

Les demi-vies de l'enzyme à 60, 70, 80, 90 et 100° C sont respectivement de 89, 76, 65, 49 et 44 min ; ce qui confirme son caractère thermostable comparé à la protéase d'*A.awamori MTCC 6652* qui des Tm de 65 et 15 min à 60 et 70° C (Negi et Banerjee, 2009).

#### 9.4. Paramètres cinétiques de l'enzyme

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique est représenté par la figure 17. Celle-ci montre une forme de la courbe sigmoïdale, ce qui indique que la protéase produite est une enzyme allostérique ayant une vitesse maximale ( $V_m$ ) de 393,959 U et une constante de Michaelis ( $K_M$ ) égal à 2,27 %.

La représentation de Hill dans la figure 18 a permis de calculer un nombre de coopérativité (nombre de Hill) proche de 4 ( $n_H = 3,49$ ). Sachant que  $n_H \leq N$  (Viratelle, 1974) ; ce résultat indique que le nombre des sous unités de l'enzyme (N) est au moins égal à 4. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Negi et Banerjee (2009), Lee et al. (2010) et Vishwanatha et al. (2009) qui montrent que les protéases acides extraites respectivement d'*A.awamori MTCC 6652*, *A. oryzae LK-101* et *A. oryzae MTCC 5341* agissent selon une cinétique Michaelienne.

#### 9.5. Effet du NaCl sur l'activité enzymatique

L'effet de la concentration en NaCl sur l'activité enzymatique est représenté dans la figure 19. L'activité maximale est obtenue à une concentration de 5 % en sel. Aux concentrations 0 et 10 % l'extrait garde plus de 80 %. Ces résultats sont différents de ceux obtenus pour la protéase produite par *A.oryzae LK-101* qui a donné les activités résiduelles de 100, 80, 50, 25 % aux concentrations en NaCl de 0, 5, 10, 20 % respectivement (Lee et al. 2010).

#### 9.6. Effet du calcium sur l'activité enzymatique

L'effet des ions  $Ca^{++}$  sur l'activité de la protéase est représenté dans la figure 20. Cette dernière montre que l'activité enzymatique augmente proportionnellement avec



la concentration du calcium jusqu'à une valeur de 510 U pour une concentration en  $\text{Ca}^{++}$  de 100 millimoles.

#### **10. Test de coagulase**

La protéase purifiée a donné une activité coagulante sur le lait écrémé de 0,05 U. Le coagulum obtenu est de couleur blanche avec une texture fragmentée et donnant un lactosérum trouble ; contrairement à celui obtenu en utilisant la présure qui est ferme, compact avec un lactosérum limpide. Ces résultats concordent avec ce qui a été rapporté par Benlounissi (2004) et Mokhtari (2004) pour la protéase acide extraite de *Penicillium camemberti* mais différent de ceux obtenus par Kassa-Laouar (2006) et Fazouane-Naimi (2010) avec respectivement une protéase acide végétale (extraite de *Silybum marianum*) et une coagulase extraite d'*Aspergillus niger* FFBI où elles ont obtenu un caillé blanc, compact avec un lactosérum clair.

# Conclusion

Le but de cette étude est de rechercher des moisissures capables de produire une protéase acide pouvant être utilisée comme substitut de la présure.

Pour cela, 3 échantillons de sol ont été prélevés à partir de la Sebkha d'Ain Ezzmoul. Leur culture sur milieu PDA a permis d'isoler 23 souches fongiques dont 12 souches ayant un pouvoir protéolytique sur le milieu gélose-caséinée. Parmi ces dernières, 8 ont été retenues pour la suite des tests et ce, en raison de leur activité importante.

La fermentation de milieu à base de lactosérum réalisée à 3 pH différents (4, 7 et 8,5) a permis de comparer les activités exocellulaires produites et de sélectionner les 2 souches dont l'activité à pH acide était maximale (nommées S10<sub>5</sub> et S12<sub>5</sub>). La mesure du rapport activité exocellulaire / activité endocellulaire de ces deux souches a donné une valeur plus élevée pour S12<sub>5</sub>, d'où sa sélection pour son identification et son utilisation dans la production de la protéase.

L'identification de la souche S12<sub>5</sub> par une étude macroscopique complétée par une étude microscopique sur 3 milieux différents et à 3 températures différentes assigne la souche au genre *Aspergillus*.

Les tests de croissance d'*Aspergillus sp* ont donné un rendement en biomasse humide de 38 g/l en 7 jours et une activité protéasique maximale de 413,636 U en 9 jours.

La purification de la protéase produite a été réalisée par précipitation par le sulfate d'ammonium à 60 % de saturation suivie de dialyse puis par tamisage moléculaire sur Sephadex G100 ; elle a donné un degré de purification égal à 21,62 et un rendement de 9,62 %.

L'étude des propriétés physicochimiques de la protéase partiellement purifiée a donné les paramètres suivants : pH optimum de 5, température optimale de 50° C, concentration optimale en NaCl de 5 % ; par ailleurs l'étude des propriétés cinétiques a montré qu'il s'agit d'une enzyme allostérique probablement tétramérique avec une V<sub>m</sub> de 394 U et un K<sub>M</sub> de 2,27 %, qui a comme activateur les ions Ca<sup>++</sup>.

La protéase purifiée a donné une activité coagulante de 0,05 U sur le lait écrémé, ce qui indique qu'elle ne présente pas les qualités nécessaires des agents coagulants utilisés en industries fromagères.

Ces résultats montrent que la protéase acide produite par *Aspergillus sp* isolée de sol salin possède les caractéristiques d'une enzyme intéressante à des applications industrielles (pH optimal acide, thermo et halostable) ; cependant, elle a montré une faible activité coagulante du lait.

Au terme de ce travail, il est nécessaire de compléter et de développer le sujet par les études suivantes.

- Recherche d'activité coagulante du lait parmi les autres souches isolées.
- Optimisation de la production de la souche *Aspergillus sp* (S12<sub>5</sub>) par l'adoption de plans d'expériences.
- Purifier l'enzyme et étudier sa structure.
- Tester l'activité de la protéase avec d'autres substrats pour évaluer son éventuel intérêt dans d'autres applications.

# Références bibliographiques

Adrian J., Legrand G., Frangne R. (1991). Dictionnaire de biochimie alimentaire et de nutrition. Tec. et doc. Lavoisier. 3<sup>ème</sup> édition : 116.

Alais C. (1975). Principes des techniques laitières, sciences du lait. 3<sup>ème</sup> édition. Masson. Paris.

Alais C. (1981). La valorisation du lactosérum, les bases et les problèmes. Techniques laitières : 7-10.

Awad S., Luthi-Peng Q.Q., Puhan Z. (1999). Proteolytic activities of suparen and rennilase on buffalo, cow, and goat whole casein and beta-casein. *J. Agric. Food Chem.* **47** : 3632–3639.

Benlounissi A. (2004). La protéase acide de *Penicillium camemberti*. Production sur lactosérum, précipitation par le sulfate d'ammonium et action sur le lait de chèvre. Mémoire de magistère. Univ. Mentouri Constantine.

Berridge N.J. (1945). The purification and crystallization of rennin. *J. Biochem.* **39**: 179-183.

Berry D. (2000). Ingredients foods. *Dairy foods.* **101**(4): 125-132.

Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. 29-36, 80.

Botton B., Breton A., Fevre M., Guy Ph., Larpent J.P., Veau P. (1985). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Masson. Paris. 35-276.

Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1996). Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. Lavoisier. Paris. 236-246.

Burg B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 213–218.

Cantrell S.A., Casillas-Martinez L., Molina M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Myco. res.* **110** : 962 – 970.

Das-Sarma S., Arora P. (2001). Halophiles, encyclopedia of life sciences. *Nat. Publ. Group.* **8**: 458-466.

Derouiche K. (2002). Production de l'aspartyl-protéase par *Penicillium camemberti* cultivée sur milieu à base de lactosérum. essai de purification et propriétés physico-chimiques de l'extrait enzymatique. Mémoire de magistère. Univ. Mentouri Constantine.

Dryer J. (2001). La grande diversité du lactosérum. *Dairy foods.* **102**(5): 35-41.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. chem.* **28** (3): 350-356.

Elagamy E.I. (2000) Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: a comparison with buffalo rennet. *J. Dairy Res.* **67** : 73–81.

Fazouane-Naimi F., Mechakra A., Abdellaoui R., Nouani A., Daga S.M., Alzouma A.M., Gais S., Pennickx M.J. (2010). Characterization and cheese-maturing properties of rennet-like enzyme produced by local Algerian isolate of *Aspergillus niger*. *Food biotechnol.* **24** :1-12.

Gana S., Touzi A. (2001). Valorisation du lactosérum pour la production des levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. *Rev. Energ. Ren. Production et valorisation-Biomasse*: 51-58.

- Granner D.K., Murray R.K., Rodwell V.W. (2008). Biochimie de HARPER. 3<sup>e</sup> édition. De Boeck. Bruxelles : 49-51, 483.
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitas A. (2000). Hypersaline water in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32** : 235–240.
- Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (2005). Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya. Springer. Netherlands.
- Gunde-Cimeraman N., Ramos J., Plemenitas A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol. res.* **113**: 1231-1241.
- Hartley B.S. (1960). Proteolytic enzymes. *Annu Rev Biochem* **29** : 45–72.
- Hohmann S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 300–372.
- Houen G., Madsen M.T., Harlow K.W., Lonblad P., Foltmann B. (1996). The primary structure and enzymic properties of porcine prochymosin and chymosin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **28** : 667–675.
- Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. (2007). Sciences des aliments. Lavoisier. Paris.
- Kamoun P. (1991). Appareils et méthodes en biochimie. 4<sup>e</sup> édition. Flammarion Medecine Science. Paris. 80-84.
- Kassa-Laouar M. (2006). La protéase de *Silybum marianum*, purification, étude des propriétés et effet sue la coagulation du lait. Mémoire de magistère. Univ. Mentouri Constantine.
- Kelly A.L., Huppertz T., Sheehan J.J. (2008). Pre-treatment of cheese milk: principles and developments. *Dairy Sci. Technol.* **88**: 549-572.

Kosikowski F.V. (1979). Utilisation du lactosérum et produits à base de lactosérum. *Rev. Laitière Française* : 11-21.

Lanier L., Joly P., Bondoux P., Bellemère A. (1978). Mycologie et pathologie forestière, mycologie forestière. Tome 1. Masson. Paris : 09-18.

Laplanche J. (2004). Système d'épuration du lactosérum d'alpage par culture fixée sur lit de compost. *Rev. suisse Agric.* **36**(5): 220-224.

Larpent J.P. (1997). Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoires. Lavoisier. Paris. 397- 400.

Lee S.K., Hwang J.Y., Choi S.H., Kim S.M. (2010). Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste. *Food. Sci. Biotechnol.* **19**(2): 327-334.

Lim S.I., Yoo J.Y. (1999). Purification of fungal protease produced by *Mucor racemosus* f. *racemosus* PDA 103 from Korean traditional meju. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 446-451.

Longhi L.G.S., Luvizetto D.J., Ferreira L.S., Rech R., Ayub M.A.Z., Secchi A.R. (2004). A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 35-40.

Lowry O.H., Rosebroughi N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1965). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1): 265-275.

McNeill J., Barrie F.R., Burdet H.M., Demoulin V., Hawksworth D.L., Marhold K., Nicolson D.H., Prado J., Silva P.C., Skog J.E., Wiersema J.H. & Turland N.J. (2006). International code of botanical nomenclature (Vienna Code). Ruggell, Liechtenstein: A.R.G. Ganter Verlag.

- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F., Lenoir J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. aliments*. **19**: 663-675.
- Mehaia M.A., Cheryan M. (1986). Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* **8**: 289-292.
- Miyakawa H., Kobayashi S., Shimamura S., Tomita M. (1992). Purification and characterization of aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-551. *J. Dairy Sci.* **75**: 27-35.
- Mohanty A.K., Mukhopadhyay U.K., Grover S., Batish V.K. (1999). Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol. Adv.* **17** : 205–217.
- Mohanty A.K., Mukhopadhyay U.K., Kaushik J.K., Grover S., Batish V.K. (2003). Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Dairy Res.* **70** : 37–43.
- Mokhtari A. (2004). Production de la protéase acide de *Penicillium camemberti* sur lactosérum de vache, précipitation par l'acétone et action sur le lait de vache. Mémoire de magistère. Univ. Mentouri Constantine.
- Negi S., Banerjee R. (2009). Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Res. Int.* **42**: 443–448.
- Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms : environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 56-63.
- Patidar P., Agrawal D., Banerjee T., Patil S. (2007). Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochem.* **40** : 2962–2967.



Pelmont J. (1995). *Catalyseurs du monde vivant*. Presse universitaire de Grenoble. Grenoble : 619-620.

Pitt J.I., Hocking A.D. (2009). *Fungi and food spoilage*. Springer. New York.

Plemenitas A., Vaupotic T., Lenassi M., Kogej T., Gunde-Cimerman N. (2008). Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Stud. Mycol.* **61**: 67–75.

Pochon J., Tardieux P. (1962). *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Edition la tourelle. St. Mandé. 110 - 111.

Polaina J., MacCabe A.P. (2007). *Industrial enzymes, structure, function and applications*. Springer. Netherlands.

Rawlings N.D., Barrett A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.* **290** : 205–218.

Richards L.A. (1969). Diagnostic and improvement of saline and alkaline soils. *Agr. Handbook*.

Rogelj I., Perko B., Francky A., Penca V., Pungercar J. (2001). Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. *J. Dairy Sci.* **84** : 1020-1026.

Ronald K.S., Harold S.L. (1970). Methods for the isolation of proteolytic marine bacteria. *Appl. Microbiol.* **20**: 991–992. In: Shivanand P., Jayaraman G. (2009). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium *Bacillus aquimaris* VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochem.* **44**: 1088–1094.

Roserio L. B., Barbosa M., Ames J. M., Wilbey R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of *Cynara* for the production of ovine milk cheeses. *Int. J. Dairy Tech.* **56**: 76–85.

Scriban R. (1999). Biotechnologie. 5<sup>e</sup> édition. Tec et Doc. Lavoisier. Paris.

Seker S., Beyenal H., Tanyolaç A. (1999). Modeling milk-clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*. *J. food sci.* **64** (3): 525-529.

Shivanand P., Jayaraman G. (2010). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium *Bacillus aquimaris strain VITP4* isolated from Kumta coast. *Process Biochem.* **44** :1088–1094.

Siboukeur O., Mati A., Hesses B. (2005). Amélioration de l’aptitude à la coagulation du lait camélien (*Camelus dromedarius*). Utilisation d’extraits enzymatiques coagulants gastrique de dromadaire. *Cahier d’études et de Recherches Francophones / Agriculture.* **14** : 473-483.

Simões I., Faro C. (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.* **271** : 2067–2075.

Stivaletta N., Barbieri R., Picard C., Bosco M. (2009). Astrobiological significance of the sabkha life and environments of southern Tunisia. *Planetary space sci.* **57**: 597- 605.

Takahashi J.A., Monteiro de Castro M.C., Souza G.G., Lucas E.M.F., Bracarense A.A.P., Abreu L.M., Marriel I.E., Oliveira M.S., Floreano M.B., Oliveira T.S. (2008). Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *J. med. mycol.* **18** : 198-204.

Tin C.S.F., Mawson A.J. (1993). Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. *Process biochem.* **28**: 217-221.

Tournas V.H., Katsoudas E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International J. Food Microbiol.* **105**: 11-17.

Turk M., Montiel V., Zigon D., Plemenitas A., Ramos J. (2007). Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapt to changes in pH and external salinity. *Microbiol.* **153**: 3586-3592.

Vidyasagar M., Prakash S., Mahajan V., Shouche Y.S., Sreeramulu K. (2009). Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. *Brazilian J. Microbiol.* **40**:12-19.

Viratelle O. (1974). *Enzymologie, travaux dirigés*. Hermann. Paris.

Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G., Singh S.A. (2009). Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chem.* **114**: 402-407.

Wang R., Law R.C.S., Webb C. (2005). Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochem.* **40**: 217-227.

Zhao R., Bao H., Liu Y. (2010). Isolation and characterization of *Penicillium oxalicum* ZHJ6 for biodegradation of methamidophos. *Agr Sci China.* **9**(5): 695-703.

# Annexes

## Annexe 1 : POTATO DEXTROSE AGAR (PDA)

Pomme de terre .....	250 g
Glucose .....	20 g
Agar .....	15 g
Eau distillée.....	compléter jusqu'à 1000 ml

- Laver la pomme de terre non pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min.
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Compléter le volume à 1000 ml.
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

## Annexe 2 : GÉLOSE CASÉINÉE

Caséine .....	100 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Stériliser par autoclavage à 115° C/ 10 min.

## Annexe 3 : SOLUTION TRACES DE MÉTAL

CuSO <sub>4</sub> _5H <sub>2</sub> O .....	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> _7H <sub>2</sub> O .....	1 g
Eau distillée .....	100 ml

#### **Annexe 4 : CZAPEK CONCENTRÉ**

NaNO <sub>3</sub> .....	30 g
KCl .....	5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	5 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
Eau distillée.....	100 ml

#### **Annexe 5: CZAPEK YEAST EXTRACT AGAR (CYA)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
Solution trace des métaux (annexe 3) .....	1 ml
Czapek concentré (annexe 4) .....	10 ml
Extrait de levure.....	5 g
Saccharose .....	30 g
Agar .....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

Stériliser par autoclavage 121° C/ 15 min. pH finale 6,7.

#### **Annexe 6: MALT EXTRACT AGAR (MEA)**

Extrait de malt.....	20 g
Peptone.....	1 g
Glucose .....	20 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Stériliser par autoclavage 121° C / 15 min. pH finale 5,6.

### Annexe 7 : 25 % GLYCEROL NITRATE AGAR (G25N)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,75 g
Czapek concentré.....	7,5 ml
Extrait de levure.....	3,7 g
Glycérol pour analyse.....	250 g
Agar .....	12 g
Eau distillée.....	750 ml

Stériliser par autoclavage 121° C / 15 min. pH finale 7,0.

### Annexe 8 : LACTOFUSHINE

0,1 % fushine dilué dans l'acide lactique (à plus de 85 % de pureté).

### Annexe 9 : DOSAGE DES SUCRES TOTAUX

#### - Solutions utilisées

- Solution mère : 100 mg/ml de lactose.
- Phénol 5 %.
- Acide sulfurique à 95 % de pureté, d = 1,83.

#### - Protocole

Dilution (mg/ml)	0	20	40	60	80	100	1 ml de l'échantillon à doser
Solution mère (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	
Phénol (ml)	1	1	1	1	1	1	
Repos à température ambiante pendant 10 min.							
Acide sulfurique (ml)	5	5	5	5	5	5	5
Agitation.							
Incubation à 30° C / 30 min.							
Lecture de l'absorbance à 488 nm.							

## Annexe 10 : COURBE D'ÉTALONNAGE POUR LE DOSAGE DES SUCRES

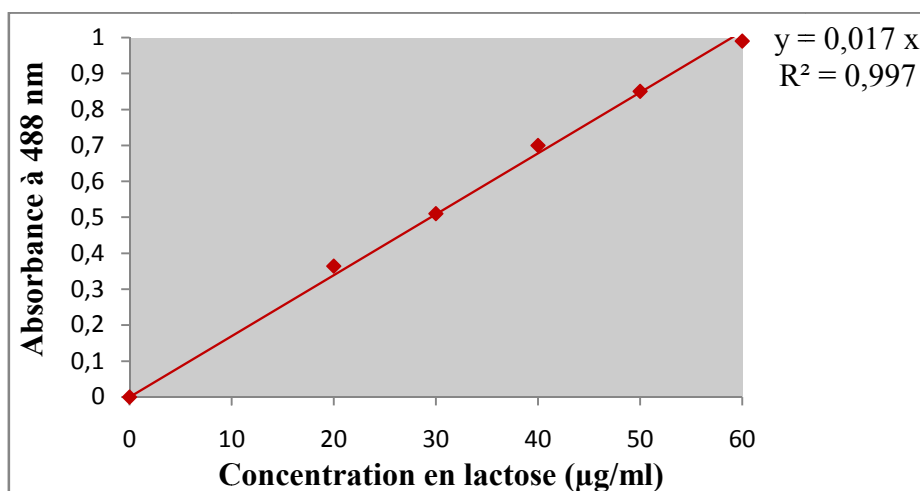


Figure 21. Courbe étalon pour le dosage du lactose.

## Annexe 11 : DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES.

### - Solutions utilisées

- Solution A : 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans NaOH (0,1 N).
- Solution B : 2 % Tartrate double du Sodium et Potassium.
- Solution C : 1 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- Solution M: 20 ml A + 1 ml B + 1 ml C.
- Solution E :  $1/10^6$  Folin-Ciocalteux.
- Solution mère : 500 µg/l BSA.

**- Protocole**

Dilution ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0	100	200	300	400	500	1 ml de l'échantillon à doser.
Solution mère (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	
Solution M (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Agitation.							
Incubation à température ambiante pendant 15 min.							
Solution E (ml)	3	3	3	3	3	3	3
Agitation							
Incubation à - l'obscurité ; - température ambiante ; pendant 45 min.							
Lecture de l'absorbance à 750 nm.							

**Annexe 12 : COURBE D'ÉTALONNAGE POUR LE DOSAGE DES PROTÉINES**

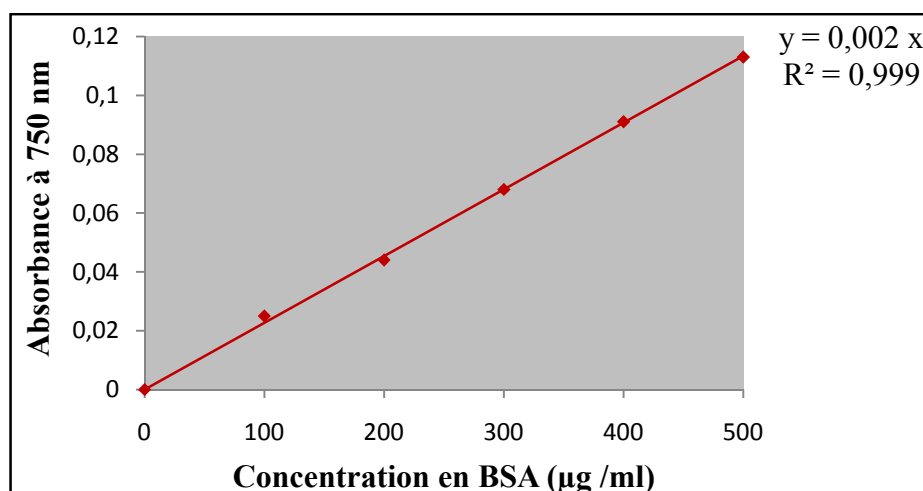


Figure 22. Courbe étalon pour le dosage des protéines.



## Annexe 13 : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.

### - Solutions utilisées

- Caséine 2,5 % dans Citrate de Sodium (0,02 M).
- Solution mère 100 µg /ml de Tyrosine.
- TCA 4 %.
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 % dans NaOH (0,1 N).
- Folin-Ciocalteux 1/10<sup>e</sup>.

### - Protocole

#### ▪ Courbe d'étalonnage

Dilution (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml)	2	2	2	2	2	2
Eau distillée (ml)	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Agitation.						
Repos à température ambiante pendant 10 min.						
Solution E (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Incubation à - l'obscurité ; -température ambiante ; pendant 5 h.						
Lecture de l'absorbance à 750 nm.						

▪ **Activité enzymatique** : Réalisé en 2 étapes

• **Étape 1** : Réaction enzymatique.

<ul style="list-style-type: none"><li>■ 2,5 ml Caséine 2,5% dissoute dans le Citrate de Sodium 0,02M.</li><li>■ 0,5 ml tampon <math>\text{NH}_2\text{PO}_4</math> (0,02M pH 4).</li><li>■ 1 ml extrait enzymatique.</li></ul>
Agitation.
Incubation 40° C/ 1 h.
<ul style="list-style-type: none"><li>■ 5 ml TCA.</li></ul>
Repos 15 – 20 min à température ambiante.
Filtration.

• **Étape 2** : Dosage colorimétrique (Anson, 1938).

<ul style="list-style-type: none"><li>■ 1 ml filtrat.</li><li>■ 2 ml <math>\text{Na}_2\text{CO}_3</math> à 15 % dans NaOH (0,1N).</li><li>■ 6,5 ml eau distillée.</li></ul>
Agitation.
Repos 15 min à température ambiante.
<ul style="list-style-type: none"><li>■ 0,5 ml Folin-Ciocalteux.</li></ul>
Agitation.
Incubation 5 h à température ambiante et l'obscurité.
Lecture de l'absorbance à 750 nm au spectrophotomètre.

#### Annexe 14 : COURBE D'ÉTALONNAGE POUR DOSAGE DE LA TYROSINE.

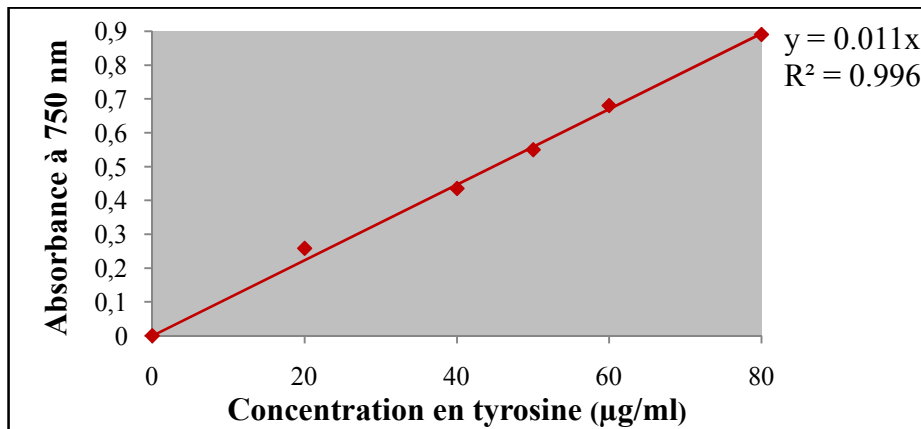
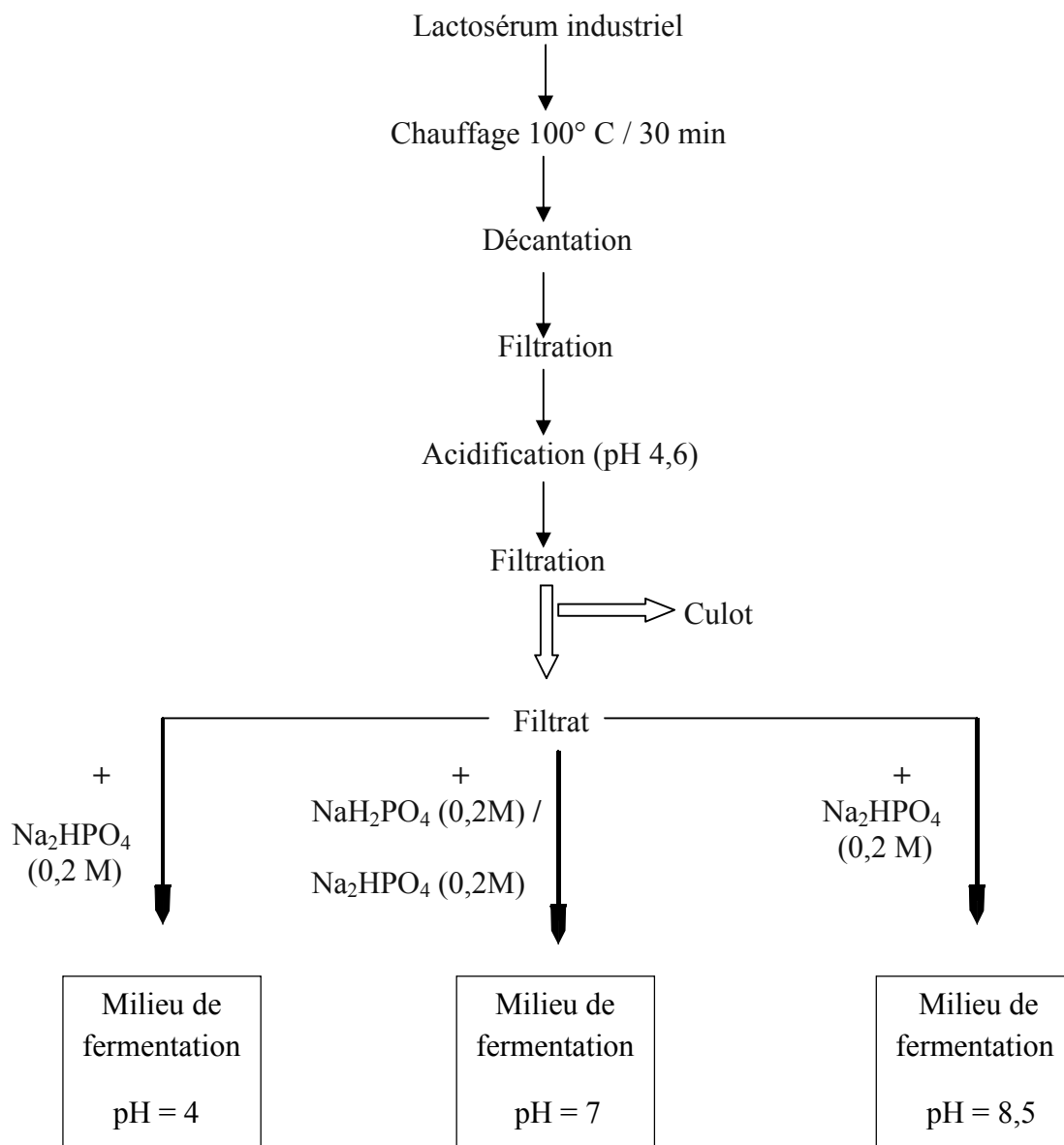


Figure 23. Courbe d'étalonnage pour le dosage de la tyrosine.

#### Annexe 15 : PRÉPARATION DU MILIEU DE FERMENTATION.



## Annexe 16 : COURBE D'ÉTALONNAGE POUR LE DÉNOMBREMENT DES SPORES.

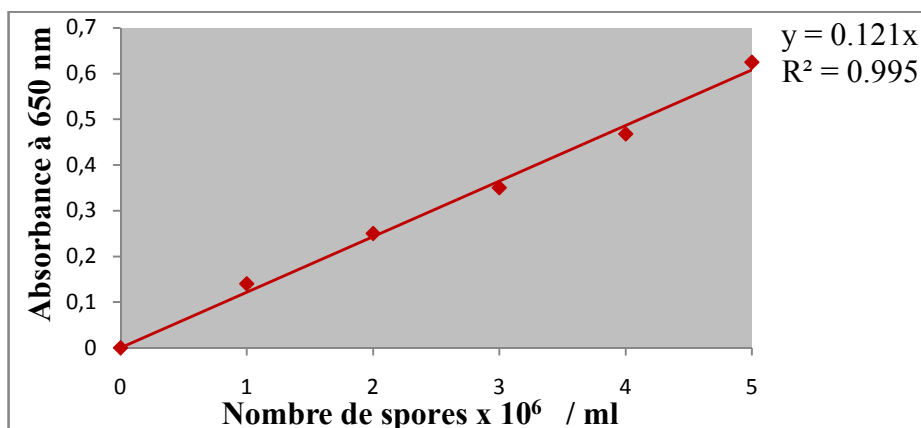


Figure 24. Courbe étalon pour le dénombrement des spores de *Penicillium sp.*

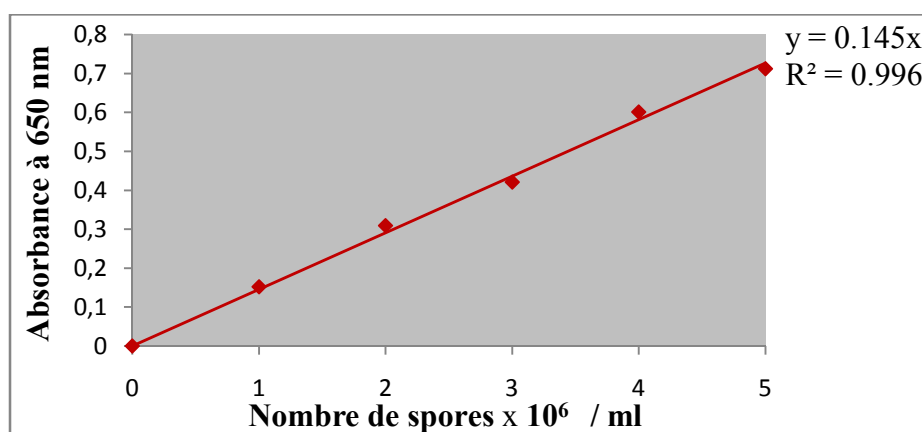


Figure 25. Courbe étalon pour le dénombrement des spores d'*Aspergillus sp.*

## Annexe 17 : PRÉPARATION DE LA MEMBRANE DE DIALYSE.

Placer la membrane de cellophane successivement dans

Mélange éthanol-eau (v/v) / 1h



Solution de bicarbonate de Sodium (10 mM) / 1h



Solution diluée d'EDTA / 1h



Eau distillée / 2h.

Rincer la membrane avec le tampon contre lequel s'effectuera la dialyse juste avant utilisation.

## Abstract

The aim of this work is about the extraction of a halostable acid protease produced by strain of fungi isolated from saline soil after fermentation on medium prepared from the whey. For these reasons, three samples were collected from soil of Sebkha. The first step of study was a screening for purification of proteolysis fungi. After isolation and purification on PDA, 23 strains were obtained in which 12 has a proteolytic activity on casein agar medium. Among these last 8 strains according to their growth speed and diameter of hydrolysis zone were selected for fermentation. The chemical analysis of the whey showed its height content of lactose (44.17 g/l), mineral salts (10.4 g/l) and its protein deficiency (1.221 g/l). The comparison of extracellular protease production on whey at different pH (4, 7, and 8.5) by the 8 selectionned stains allows the selection of 2 strains which have a maximal activity on acid pH. S12<sub>5</sub> and S10<sub>5</sub> produce respectively an activity of 376 U and 329 U. According to the ratio exo/ endoprotéase activities, the strain S12<sub>5</sub> was selectionned for the rest of the study. The microscopic and macroscopic identification of S12<sub>5</sub> revealed that the strain belong to genus of *Aspergillus*. The second step was the purification of the enzyme extract by 3 operations, precipitation with the ammonium sulfate at 60 %, dialysis and Sephadex gel chromatography G 100. The enzyme gives an output of 9 % and a purification rate higher than 21. The protease obtained presents the following values 5, 50° C, 89 min, 394 U, 2.27 %, 5 % and 0.05 U for respectively optimum pH, optimal temperature, the half-life duration at 60° C,  $V_m$ ,  $K_M$ , optimal concentration of NaCl and milk clotting activity.

**Key words** acid protease, molds, *Aspergillus*, Sebkha, whey, extraction.

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو استخلاص إنزيم حامضي محلل للبروتينات ثابت في وسط ملحي من فطريات معزولة من بيئة مالحة طبيعيا وإنتاجها على مصل الحليب. لهذا الغرض تم أخذ 3 عينات من مناطق مختلفة على مستوى سبخة عين ازمول. المرحلة الأولى من الدراسة تدور حول عزل الفطريات ذات النشاط الإنزيمي و بذلك تحصلنا على 23 فطر من بينها 12 أظهرت تحلل بروتيني على بروتين الحليب الجيلوزي. من هذه الأخيرة تم اختيار 8 لإنتاجها على مصل الحليب الذي اظهر تحليله الكيميائي غناه باللاكتوز (44.17غ/ل)، الأملاح المعدنية (10.4غ/ل) فقره من البروتينات(1.221غ/ل). مقارنة إنتاج الإنزيم الخارج خلوي أظهرت وجود سلالتين 12<sub>5</sub> و 10<sub>5</sub> ذات نشاط إنزيمي مرتفع في وسط حامضي. النسبة بين نشاط إنزيمي خارج خلوي و داخل خلوي حددت الفطر 12<sub>5</sub> لإكمال باقي الدراسة عليه. تم تحديد نوع الفطر 12<sub>5</sub> عبر دراسة مجهريه و عينية كسلالة منتمية الى النوع *Aspergillus*. استخلاص البروتياز أحامضي المنتج من قبل هذه الأخيرة تم على 3 مراحل الترسيب بسولفات الا مونيوم 60 ٪ الميز والكروماتوغرافيا أعطى مردودا يقدر ب 9 ٪ ودرجة نقاوة اكبر ب 21 مرة. الخصائص الفيزيائية و الكيميائية للإنزيم أظهرت القيم التالية على التوالي 5، 50° م، 394، 2.27٪، 0.05 و للمعايير التالية pH، حرارة مثلى، Km، Vm والنشاط على تخثير الحليب المنزوع الدسم.

**الكلمات المفتاحية:** بروتياز حامضي، فطريات، *Aspergillus*، سبخة، مصل الحليب، استخلاص.

**Titre :** Production et étude des propriétés de la protéase acide d'une moisissure isolée de Sebkhah d'Ain Ezzemoul

### Résumé

Ce travail s'articule autour de la production d'une protéase acide halostable par une moisissure isolée d'un sol salé, fermentée sur milieu à base de lactosérum. Pour cela des prélèvements ont été effectués au niveau de 3 sites différents de la Sebkhah d'Ain Ezzemoul située à Ain-Mlila. La première partie de l'étude consiste à purifier les souches fongiques ayant une activité protéolytique par un screening. Après isolement et purification sur PDA, on a obtenu 23 souches dont 12 possèdent une activité protéasique. Parmi ces dernières, 8 ont été sélectionnées pour la fermentation selon les diamètres des colonies et des zones d'hydrolyse mesurées sur milieu de caséine gélosée. Le milieu de fermentation a été préparé à base de lactosérum industriel. L'analyse de ce dernier a montré sa richesse en lactose (44,17 g/l), en sels minéraux (10,4 g/l) et une carence en protéines (1,221 g/l). La comparaison de la production des protéases exocellulaires sur lactosérum déprotéiné et tamponné à différents pH par les 8 souches a permis de sélectionner 2 souches S12<sub>5</sub> et S10<sub>5</sub> ayant une activité exocellulaire maximale à pH acide ; respectivement égale à 376 U et 329 U. D'après le rapport des activités exo/endo, respectivement 1,94 et 1,21, la souche S12<sub>5</sub> est retenue pour la suite des étapes. Son identification macroscopique et microscopique a révélé qu'elle appartient au genre *Aspergillus*. L'étude des paramètres de croissance de *Aspergillus sp* a donné une courbe classique avec les quatre phases de croissance habituelle ; la cinétique de production de la protéase montre qu'elle est du type partiellement associée à la croissance de la moisissure. La deuxième partie de l'étude consiste à purifier l'enzyme en 3 étapes ; précipitation par le sulfate d'ammonium, dialyse puis chromatographie sur gel Sephadex G100 ; l'enzyme obtenue présente un taux de purification de 21 fois et un rendement de 9 % avec les caractéristiques suivantes ; pH optimal de 5, la température optimale de 50° C, durée de demi-vie à 60° C de 89 min,  $V_m$  de 394 U,  $K_M$  de 2,27 %, concentration optimale en NaCl de 5 %, activité coagulante sur le lait écrémé de 0,05 U et activation en présence de concentrations croissantes de Ca<sup>++</sup>.

**Mots clés** Protéase acide, moisissures, *Aspergillus*, Sebkhah, lactosérum, extraction.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Biologie et environnement. Faculté des sciences de la nature et de la vie. U.M.C.