



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université des frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا

Département de Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de Vie

Filière : Science biologiques

Spécialité : Biotechnologie fongique / fermentation et production de substances fongiques

Intitulé

Production des protéases par les mycètes isolés de milieux sahariens

Présenté et soutenu par : Lakba Hadjer

Le : 25/06/2015.

Soucha Hayet

Jury de soutenance :

Président du jury : Mme. MIHOUBI I.

(MC. UFM.Constantine).

Encadreur : Mr. KACEM CHAOUCHE N.

(Prof. UFM.Constantine).

Examineur : Mlle YOUCEF ALI M.

(Doc.UFM.Constantine).

Tutrice : Mlle TALHI I.

(Doc.UFM.Constantine).

Année Universitaire
2014-2015

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de mémoire de master, les mots justes sont difficiles à trouver pour exprimer nos remerciements.

À « Allah », le tout puissant, qui nous a accordés le courage et la patience pour élaborer ce modeste travail.

Nous rendons un vibrant hommage aux du jury de ce mémoire qui ont accepté de juger travail :

*Un merci particulier à notre présidente de jury, **Mme. MIHOUBI I.**, de nous avoir faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de mémoire.*

*Nous tenons à adresser nos remerciements les plus sincères et chaleureux à **Pr. KACEM CHAUCHE N.**, maitre de conférences à l'université MENTOURI Constantine d'avoir assuré notre encadrement.*

*Un Merci Particulier à l'examinatrice de ce mémoire ; **Melle YUCEF ALI M.**, pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.*

*Egalement ; nous remercions **Melle TALHI I.**, pour sa gentille, ses précieux conseils, sa bienveillance et son soutien tout au long de la réalisation de notre mémoire.*

En fin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail

À mes très chers parents ma mère Dalila et mon père Ali que je chéris tant, et à qui le mérite revient pour tout l'amour et l'aide

qu'ils m'ont apporté.

À la mémoire de mon petit frère Nedjmedinne ; je t'aime

Énormément.

À ma soeur Amira Hind et mon frère Mohamed lamine

À ma grande mère mama Chrifa

À ma tante Nawel et ses enfants Nour, Zineb, Belkisse

À tout ma famille

À mon amie Safia et toute sa famille

À toutes mes amies et mes camarades surtout Hayet et tout sa

famille

khadidja, Romayssa, Narimmen, Rokaya, Nour

À toute la promotion de Biotechnologie fongique

À toute personne me connait

Hadjer

Dédicace

Je dédie ce travail

*A mes très chers parents ma mère Nora et mon père Djamel El dine
que je chéris tant, et à qui le mérite revient pour tout l'amour et
l'aide qu'ils m'ont apporté.*

A ma grande mère Om Hani

A mes très chères sœurs

Soraya, Wissam

A mes très chers frères

Omer, Hossam El dine, Alae Eldine

A mes adorables nieces et neveu

A tout ma famille

*A toutes mes amies et mes camarades surtout Hadjer et tout sa
famille*

Sara, Chobayla, Imen, Chahla, Mariem, Saliha

A toute la promotion de Biotechnologie des mycètes

Hayet

Table des matières

1-Introduction	1
2-Revue bibliographique	3
2.1-Les enzymes	3
2.1.1-Définition	3
2.1.2-Marché des enzymes	3
2.2-Enzyme protéolytique	3
2.2.1-Source de protéase	4
2.2.1.1- Protéases d'origine végétale	4
2.2.1.2-Protéases d'origine animale	4
2.2.1.3-Protéases d'origine microbienne	4
➤ Protéases des bactéries.....	5
➤ Protéases des moisissures.....	5
➤ Protéases des levures.....	5
2.2.2-Classification de protéase	7
2.2.2.1-Selon longueur de la chaîne polypeptidique	7
2.2.2.2-Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique	7
2.2.2.3-Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif	8
➤ Sérilylprotéases.....	8
➤ Cystéylprotéases.....	8
➤ Aspartylprotéases.....	9
➤ Métalloprotéases.....	9
2.2.2.4-Selon le pH d'activité	9
2.2.3-Mode d'action	9
2.2.4-Application industriel des protéases	10
2.2.4.1-Industrie alimentaire	10
➤ Boulangerie.....	10
➤ Produits à base de soja.....	10

➤ La fabrication du fromage.....	10
2.2.4.2-Domaine pharmaceutique et médical.....	11
2.2.4.3-Industrie des détergents.....	11
2.2.4.4-Traitement des eaux usées industrielles.....	12
2.2.4.5-Industrie photographique.....	12
2.3-La fermentation	12
2.3.1-Fermentation sur milieu liquide.....	12
2.3.2-Fermentation sur milieu solide.....	13
2.3.2.1-Avantages et inconvénients de la fermentation solide.....	14
2.3.2.2-Substrats utilisés.....	15
2.3.2.3-Micro-organismes utilisés.....	15
2.3.2.4-Applications industrielles.....	16
2.4-Le Son de blé.....	19
2.4.1-Composition du son de blé.....	19
2.4.2-Utilisations principales du son de blé.....	20
2.4.2.1-Alimentation animale.....	20
2.4.2.2-Alimentation humaine.....	20
2.4.2.3- Industrie papetière.....	21
2.4.2.4-Applications diverses.....	21
3-Matériel et Méthodes	22
3.1-Echantillonnage.....	22
3.2-Isolement.....	28
3.2.1-A partir du sol.....	28
3.2.2-A partir des plantes.....	28
3.3-Ensemencement.....	28
3.3.1-A partir du sol.....	28
3.3.2-Les plantes.....	29
3.4-Purification des souches.....	29
3.5-Conservation.....	29
3.6-Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	29
3.7-Identification de la souche sélectionnée.....	29

3.7.1-Identification macroscopique.....	29
3.7.2-Identification microscopique.....	30
3.8-Méthode de fermentation et de production.....	30
3.8.1-Préparation du milieu de fermentation.....	30
3.8.2-Préparation de l'inoculum.....	31
3.8.3-Ensemencement des milieux de fermentation.....	31
3.9-Etude de l'activité protéolytique produite.....	31
3.9.1-Préparation des extraits enzymatiques.....	31
3.9.2-Méthode de dosage de l'activité protéolytique.....	31
3.9.2.1-Principe.....	31
3.9.2.2-Réaction enzymatique.....	32
3.9.2.3-Protocole de dosage.....	32
3.10-Etude des propriétés de l'enzyme.....	33
3.10.1-Influence du pH.....	33
3.10.2-Influence de la température.....	33
4-Résultats	34
4.1-Isolement.....	34
4.2-Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	35
4.3-Identification de la souche sélectionnée.....	36
4.3.1-Identification macroscopique.....	36
4.3.2-Identification microscopique.....	37
4.4-Cinétique de production de protéase.....	38
4.5-Effet du pH sur l'activité de l'enzyme.....	38
4.6-Effet de la température.....	39
5-Discussio	41
6-Conclusion	44
7-Abstract	45

8-المخلص	46
9-Références bibliographique	47
10-Annexes	

Liste des abréviations

EC : Enzyme Commission.

I.U.B.: International Union Biochemistry .

SSF : solid state fermentation.

TCA : Tri Chloroacetic Acid.

UI: unité international.

Liste des tableaux

Tableau 1 : quelques espèces fongiques productrices de la protéase.....	6
Tableau 2 : Les applications industrielles de la fermentation sur milieu solide.....	12
Tableau 3 : Pourcentage des monosaccharides dans le son de blé.....	20
Tableau 4 : Teneur en minéraux et en vitamines du son de blé.....	20
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des sites d'échantillonnages, types d'échantillons et caractéristiques des sols explorés.....	23
Tableau 6 : isolement des champignons sur milieux PDA et YPGA.....	34
Tableau 7 : Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieu lait gélosé.....	36
Tableau 8 : Caractères morphologiques de la Souche fongique obtenu.....	37
Tableau 9 : Caractères microscopiques de l'isolat sélectionné.....	37
Tableau 10 : préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine (annexe).	

Liste des figures

Figure 1 : Les liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) sont hydrolysées par les protéases.....	4
Figure 2 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	8
Figure 3 : Mécanisme d'action des protéases.....	10
Figure 4 : Modèle de développement d'un champignon filamenteux en fermentation solide.....	14
Figure 5 : Localisation géographique des régions d'échantillonnages.....	22
Figure 6 : Dilutions décimales obtenues	28
Figure 7 :Résultat de la croissance de quelque souches protéolytique sur lait gélosé.....	35
Figure 8 : Evaluation de l'activité protéolytique développé par la souche <i>Aspergillus sp</i> dans le milieu de fermentation solide (son de blé).....	38
Figure 9 : Effet du pH sur l'activité protéolytique.....	39
Figure 10 : Effet de la température sur l'activité protéolytique de la souche <i>Aspergillus sp</i>	40

1-Introduction

La plus grande part du marché des enzymes correspond aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les amylases, les lipases et les cellulases. De toutes les enzymes industrielles, les protéases sont le groupe le plus important qui représente 60% du total des ventes d'enzymes. Elles ont plusieurs utilisations dans : les détergents, l'industrie alimentaire, les produits pharmaceutiques, et les traitements des eaux usées industrielles.

Les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les microorganismes que chez les animaux et les plantes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, quarante pourcent des enzymes sont produites par les microorganismes parmi les quels, des souches fongiques ((Botton *et al.* ; 1999 ; García-Gómez *et al.*, 2009). Celles-ci possèdent plusieurs avantages comme leur qualité *GRAS* (*Generally Regarded As Safe*) et leur aptitude à produire une large gamme d'enzymes extracellulaires.

Beaucoup d'enzymes industrielles sont exigées pour fonctionner dans des conditions extrêmes, il y a également une demande de plus en plus croissante en biocatalyseurs stables, utilisables en biotechnologie moderne. L'Algérie est un pays riche par sa diversité écologique et géologique, il existe ainsi des écosystèmes extrêmes tels que les sebkhas, les sources chaudes et surtout les sols désertiques, exploitées pour leurs bienfaits, notamment thérapeutiques. Cependant, ces sources n'ont été que très peu étudiées d'un point de vue biodiversité et ce n'est que récemment qu'on a commencé à s'intéresser aux microorganismes habitants ces environnements locaux et les publications concernant le sujet sont encore très rares (Kecha *et al.*, 2007 ; Bouanane- Darenfed *et al.*, 2011). Les enzymes produites par ces organismes sont extrêmement thermoactives, rigoureusement thermostables ayant même des activités à des températures dépassant les températures maximales de croissance de leurs organismes. Elles résistent souvent aux dénaturants chimiques tels que les détergents, les solvants organiques et les valeurs extrêmes du pH (Antranikian *et al.*, 2005).

En industrie, il ne s'agit pas seulement d'utiliser des souches productrices, mais il est également nécessaire de définir un milieu de production favorable et à faible coût.

Dans notre étude Le son de blé est utilisé comme substrat de base pour la production de protéase sur milieu solide, vue sa richesse en fibres alimentaires insolubles, en protéines et en sels minéraux (Marlett *et al.*, 2002). En plus, il a été prouvé que certaines protéases fongiques ont une très grande spécificité d'action vis-à-vis les protéines des céréales et plus

Introduction

particulièrement celles du blé (gliadines et gluténines), ce qui le rend un excellent substrat pour la production des protéases par fermentation solide (Kumar *et al.*, 2005; Sumantha *et al.*, 2005; Chutmanop *et al.*, 2008; Vishwanatha *et al.*, 2009-2010).

L'objectif principal de ce travail est la production de protéases par les mycètes isolées de milieux extrêmes. Pour cela nous nous sommes fixés plusieurs objectifs, réalisés en 4 étapes :

La 1ère étape est l'isolement des souches fongiques à partir des échantillons du sol et des plantes ;

La 2ème étape porte sur la mise en évidence de l'activité protéolytique des isolats fongiques sur milieu gélosé à base de lait, dans le but de sélectionner la souche la plus performante ;

La 3ème étape est la production de protéase par fermentation sur milieu solide (SSF), en utilisant un résidu agroalimentaire peu coûteux (son de blé) ;

La 4ème étape consiste à l'étude de la cinétique de production d'enzyme et l'influence du pH et de la température sur l'activité protéolytique.

2- Revue bibliographique

2.1- Les enzymes

2.1.1- Définition

Les enzymes sont des polymères biologiques qui catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 10⁶ 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), ayant des structures primaires, secondaires, tertiaire, voire quaternaires dans certains, parfois, cette partie protéique, appelée *apoenzyme*, n'est pas suffisante pour l'action catalytique et nécessite la présence d'un cofacteur ou coenzyme. 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 : Isoméras.
- Classe 6 : Ligases.

2.1.2- Marché des enzymes

De toutes les enzymes industrielles, les protéases sont de loin le groupe le plus important. En effet, les protéases représentent à elles seules entre 60% du total des ventes d'enzymes. La dominance des protéases dans le marché des enzymes industrielles devrait s'accroître (García-Gómez et al., 2009; Rai et Mukherjee, 2010) (Fig. 1). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions \$ annuellement (Kumar et al., 2008).

2.2. Enzyme protéolytique

Les protéases sont un groupe d'enzymes très complexe, elles appartiennent à la classe d'hydrolases (EC 3.4.21-24.x), formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (Kumar et al., 2008). Les protéases

catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique, elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés offrant une multitude de structures (Frazier, 1967 ; Scriban, 1999). La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysat de protéines ou d'un mélange d'acides aminés.

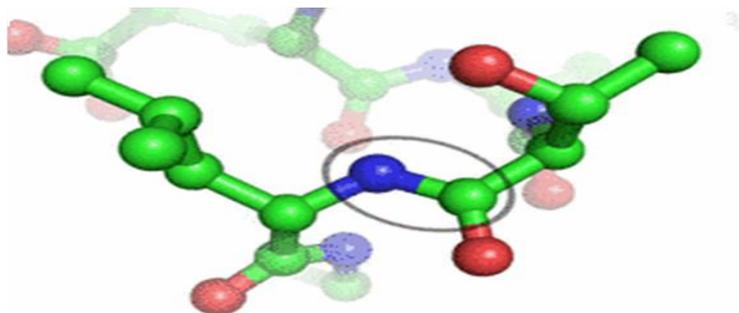


Figure 1 : Les liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) sont hydrolysées par les protéases.

2.2.1- Source de protéase

2.2.1.1- Protéases d'origine végétale

Les enzymes d'origine végétale, en particulier les protéases sont par ordre décroissant en technologie. La papaine, la bromélaïne, la kératinase et la ficine représentent une partie des protéases les plus répandues (Rao et *al.*, 1998).

2.2.1.2- Protéases d'origine animale

Une grande partie de protéases animales sont synthétisées par le pancréas sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon autocatalytique dans des conditions bien déterminées (Rao et *al.*, 1998). Parmi ces protéases on peut citer : la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine.

2.2.1.3- Protéases d'origine microbienne

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya et *al.*, 2005). Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries, (Devi et *al.*, 2008).

➤ Protéases des bactéries

Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus Subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification (Calk et *al.*, 2000 ; Frazier, 1967). Les

bactéries psychrotrophes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* produisent des métalloprotéases thermorésistantes utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage des fromages. Ces bactéries sont détruites par la pasteurisation mais les protéases extracellulaires qu'elles produisent ne sont que partiellement inactivées (Cousin et *al.*, 1982). Les protéases extracellulaires de *Streptococcus lactis* jouent un rôle très important dans l'affinage des fromages (Desmazeaud, 1978).

➤ *Protéases des moisissures*

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc (Frazier, 1967 ; Ul-haq et *al.*, 2003).

➤ *Protéases des levures*

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases ; une aspartylprotéase, une sérine protéase et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (Kresze, 1991 ; Boiron, 1996).

Tableau 1 : quelques espèces fongiques productrices de la protéase

Source	Espèces	Référence
Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i>	García-Gómez et al., 2009
	<i>Mucor circinelloides</i>	Sathya et al., 2009
	<i>Conidiobolus coronatus</i>	Laxman et al., 2005
	<i>Penicillium</i> sp.	Germano et al., 2003
	<i>Aspergillus terreus</i>	Wu et al., 2006
	<i>Bauveria felina</i>	Agrawal et al., 2005
	<i>Aspergillus clavatus</i>	Hajji et al., 2008
	<i>ESI Endothia parasitica</i>	Durand et Monson, 1982
	<i>Aspergillus niger</i>	Jernejc et Cimerman, 2001
	<i>Aspergillus flavus</i>	Jernejc et Cimerman, 2001
	<i>Aspergillus Candidus</i>	//
	<i>Aspergillus saitoi</i>	Dahot, 1987
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	//
	<i>Aspergillus sojae</i>	Botton et al., 1990
	<i>Aspergillus melleus</i>	Dahot, 1987
	<i>Fusarium culmorum</i>	Urbanek et Yirdaw, 1984
	<i>Geotrichum candidum</i>	Boiron, 1996
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Boiron, 1996
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Delgado-Jarana et al., 2002
	<i>Trichoderma viride</i>	Uchicoba et al., 2001
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Ul-Haq et al., 2003	
<i>Mucor bacilliformis</i>	Fernandez-Lahore et al., 1998	
<i>Mucor miehei</i>	Durand et Monson, 1982	
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Miller, 2002	
Levures	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Chi et al., 2007 Tobe et al., 1976
	<i>Candida lypolytica</i>	

2.2.2- Classification de protéase

La classification des protéases se base sur plusieurs critères tels que la longueur de la chaîne polypeptidique, le mode d'attaque de la chaîne, le pH d'activité et la nature de résidu impliqué dans le site actif (Colwell et Grigorova, 1989 ; Rao et *al.*, 1998).

2.2.2.1- Selon longueur de la chaîne polypeptidique

C'est le premier critère de classification des enzymes protéolytiques. Il existe deux catégories; les protéases qui scindent la molécule protéique en fragments polypeptidiques et les peptidases qui hydrolysent les polypeptides et les transforment en acides aminés libres (Frazier, 1967 ; Colwell et Grigorova, 1989).

2.2.2.2- Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisés en deux classes ; les endopeptidases et les exopeptidases (Scriban, 1999 ; Moodie, 2001). Ces dernières sont elles mêmes subdivisées en deux sous-classes les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Les aminopeptidases commencent leur action par l'extrémité NH₂ libre du polypeptide et leur activité dépend souvent de la présence d'ion métallique ; les carboxypeptidases commencent leur attaque par l'extrémité COOH libre du polypeptide. (Scriban, 1999 ; Trap et Boireau, 2000). L'activation de ces différentes enzymes conduit à la libération de di et tripeptides qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés (Scriban, 1999).

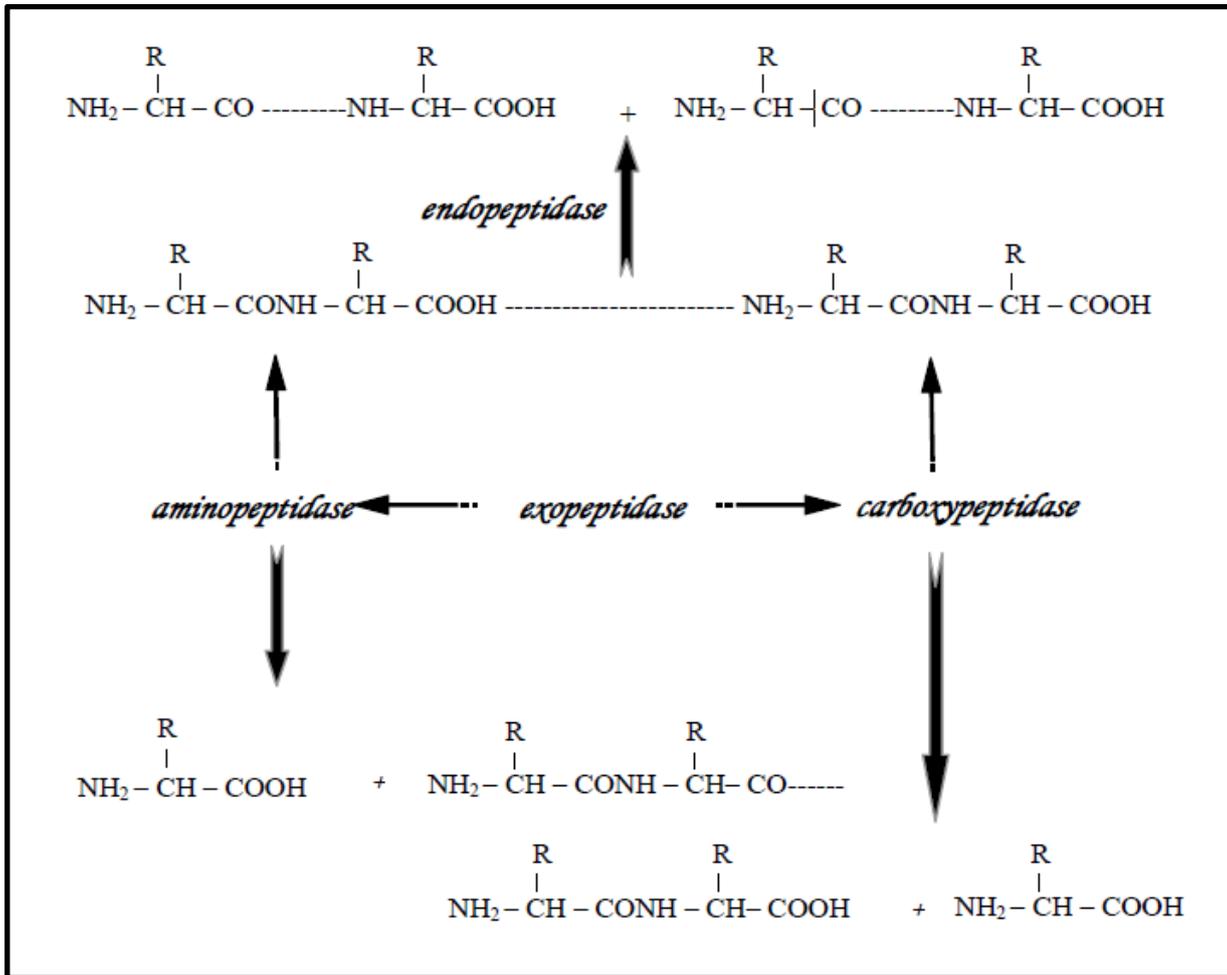


Figure 2 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).

2.2.2.3- Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif

Les séquences primaires et la spécificité des acides aminés de leur site actif ont permis la classification des endopeptidases en quatre grandes familles, les sérylprotéases, les cystéylprotéases, les aspartylprotéases et les métalloprotéases (IUBMB, 1998).

➤ Sérylprotéases

Les protéases à sérine sont très répandues dans la nature, aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Leur mécanisme catalytique implique l'intervention d'un résidu sérine (Reginald et al., 1975 ; Kortt et al., 1994 ; Pelmont, 1995 ; Trap et Boireau, 2000).

➤ Cystéylprotéases

Les protéases cystéines, ou thiols, sont très peu utilisées en industrie. Ces protéases sont présentes autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. La plupart des protéases de cette classe sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme l'histidine, l'aspartate et la cystéine (Kresze, 1991 ; Pelmont, 1995).

➤ *Aspartylprotéases*

Les protéases aspartiques appelées également protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu d'acide aspartique présent au niveau du site actif de l'enzyme. Ces enzymes présentent un intérêt industriel dans les secteurs où l'hydrolyse des protéines à faible pH est désirée (Pelmont, 1995 ; Rao *et al.*, 1998).

➤ *Métalloprotéases*

Les métallo-protéases forment un groupe de protéases très variées. Ces enzymes contiennent un ion métallique divalent, le plus souvent le Zn^{2+} nécessaire à leur activité. Ces enzymes sont habituellement des protéases dites neutres, ayant un pH optimum se situant près de 7,0. Toutefois, certaines métallo-protéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10 (Wilkesman et Kurz, 2009; Belitz *et al.*, 2009).

2.2.2.4- Selon le pH d'activité

Selon ce paramètre, les enzymes protéolytiques de différentes origines sont classées en trois groupes : des protéases acides, neutre et alcalines (CINGÖZ, 2009).

2.2.3- Mode d'action

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre par la nature de leur site actif, bien qu'elles aient toutes le même principe de base. Ce processus catalytique est résumé dans trois étapes : Dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce-la polarité du carbonyle, qui facilite son attaque nucléophile conduisant à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) protoné par un proton cédé d'un résidu enzymatique. Dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH^- d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton (de l' H_2O) (Pelmont, 1995).

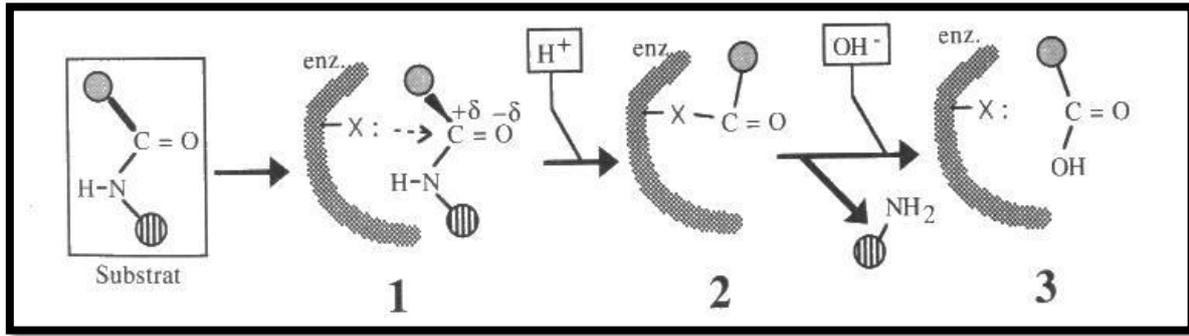


Figure 3: Mécanisme d'action des protéases (Pelmont, 1995).

2.2.4- Application industriel des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Cette section trace donc un portrait des principaux secteurs industriels employant des protéases.

2.2.4.1- Industrie alimentaire

➤ Boulangerie

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten, une protéine insoluble, qui est responsable des propriétés de la pâte. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte. Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Également des protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao *et al.*, 1998).

➤ Produits à base de soja

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à augmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles avec des propriétés nutritives très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans les formulations d'aliments diététiques (Rao *et al.*, 1998).

➤ *La fabrication du fromage*

Des recherches approfondies ont permis de prouver que la majorité des protéases microbiennes acides possède une grande capacité à coaguler le lait pour former le caillé, l'étape clé dans la production fromagère (Neelakantan *et al.*, 1999; Sumantha *et al.*, 2006), ce qui facilite l'expansion de l'industrie fromagère, dont le développement a été limité par la pénurie de la présure animale. Le traitement chimique, par des agents oxydants, appliqué à l'extrait enzymatique obtenue à partir de *Mucor meihei* permet d'obtenir une enzyme aux propriétés similaires à celles de la présure de veaux, en termes de productivité et la qualité du produit final (Aguilaret *et al.*, 2008). Dans l'industrie du lait, les protéases acides, neutres et basiques produites par *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Thermoascus aurantiacus*, *Irpex lactis*, *Endothia parasitica* et autres espèces du genre *Mucor* ont été également utilisées (Channe et Shewale, 1998; Merhebet *et al.*, 2007; Aguilaret *et al.*, 2008).

2.2.4.2- Domaine pharmaceutique et médical

Les enzymes protéolytiques sont également utilisées pour développer des produits d'importance médicale. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. Également, des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement de brûlures et de plaies. Une élastotérase provenant de *B subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles d'abcès et de plaies profondes (Kudrya et Simonenko, 1994). Enfin, une asparaginase provenant de *E. coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002).

2.2.4.3- Industrie des détergents

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à favoriser l'élimination des taches protéiques vue leur avantage unique qui ne peut autrement être obtenue avec la technologie des détergents classiques (Gupta *et al.*, 2002). Maintenant, elles sont ajoutées comme ingrédients clés, ce qui représente environ 25% des ventes totales dans le monde entier des enzymes. Parmi les principales conditions préalables pour l'utilisation des protéases dans la production des détergents sont : l'action sur une large gamme des substrats, l'activité et la stabilité à des pH et à des températures élevés et en présence des agents oxydants additionnés. Aujourd'hui, toutes les protéases des détergents actuellement commercialisés sont des protéases sérines produites par *Bacillus sp* (Chellappan *et al.*, 2006; Guo et Ma, 2008). Récemment, les protéases produites par un petit nombre de sources fongiques telles que *Penicillium sp*, *Aspergillus parasiticus*, *Condiobolus coronatus* et *Engyodontium album* ont été étudiées pour une telle application (Rashbehari *et al.*, 2003; Sandro *et al.*, 2003; Chellappan *et al.*, 2006).

2.2.4.4- Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. Des essais effectués dans différentes industries alimentaires produisant des rejets riches en protéines ont donné des résultats très intéressants, qui permettent de constater le potentiel des protéases pour le traitement de ces déchets (Kumar *et al.*, 1999). Les enzymes protéolytiques de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyliquefaciens*, *Streptomyces sp* et de différentes souches d'*Aspergillus* sont actuellement utilisées dans ce domaine (Gupta *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2006).

2.2.4.5- Industrie photographique

Les protéases alcalines et neutres jouent un rôle crucial dans le bio-traitement des films photographiques pour la récupération d'argent (Sumantha *et al.*, 2006). Ce type de films contient entre 1,5 et 2% d'argent dans leur couche de gélatine, qui peut être utilisée comme une bonne source d'argent pour des fins variées. Traditionnellement, cet argent est récupéré par la combustion, ce qui provoque une pollution environnementale indésirable. En plus, la base du film en polyester ne peut pas être recouverte par cette méthode. De fait que l'argent est lié à la gélatine, il est possible de procéder à une extraction de la couche protéique par des traitements protéolytiques. L'hydrolyse enzymatique de la gélatine permet non seulement l'extraction d'argent, mais aussi le recyclage de la base du film (Gupta *et al.*, 2002).

2.3- la fermentation

La nature de la fermentation, solide ou liquide (submergée), influe divers aspects de la croissance des microorganismes ainsi que la production des substances d'intérêt (Sumantha *et al.*, 2005).

2.3.1- Fermentation sur milieu liquide

La fermentation sur milieu liquide peut être considérée comme une violation de l'habitat naturel des microorganismes, en particulier les champignons. Elle consiste à faire croître les microorganismes sur un substrat nutritif liquide. Ce type de fermentation a été traditionnellement utilisé pour la production industrielle des enzymes, en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres comme le pH, la température, l'aération, l'oxygène dissous et l'humidité (Singhania *et al.*, 2009).

2.3.2- Fermentation sur milieu solide

La fermentation sur milieu solide est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (Durand, 2003 ; Gervais et *al.*, 2003 ; Rahardjo et *al.*, 2006). De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules. Le développement des champignons filamenteux en fermentation solide (figure 4) se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide) ou dans les espaces interparticulaires (par croissance) à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide. A des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz (aérobie), tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau (anaérobie). Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (Holker et Lenz, 2005 ; Rahardjo et *al.*, 2006).

2.3.2.1- Avantages et inconvénients de la fermentation solide

La production industrielle des enzymes et d'autres métabolites fait appel aux deux procédés de fermentation. La décision de choisir l'un ou l'autre est probablement basée sur le coût et l'efficacité du processus. Il est donc important de connaître les avantages et les inconvénients de la fermentation sur milieu solide par rapport à la fermentation liquide. Parmi ces avantages on note :

- L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes.
- Le peu d'eau disponible favorise la production de certains métabolites qui n'apparaissent pas ou peu en culture liquide. ainsi il minimise les contaminations bactériennes qui réclament des taux d'humidité élevés pour croître (Mathot, 1996).
- Les opérations de mélange étant facilement modulables, il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides.
- En calibrant bien les particules du substrat, l'aération peut être assurée passivement et/ou sans agitation ou par agitation discontinue (Durand, 1983).
- La réduction des coûts et du temps consommé pendant l'extraction et la récupération du produit (moins de techniques à appliquées et volumes réduits en solvants d'extraction), ainsi que pour le traitement des effluents (en raison de la faible teneur en eau).

Dans ces conditions et bien d'autres, la fermentation solide présente de nombreux inconvénients :

- Les microorganismes utilisés sont limités. En effet, seuls ceux qui se développent bien aux basses humidités peuvent être employés, cela s'applique aux champignons filamenteux et aux certaines bactéries xérophiles.
- Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles.
- La nature solide et hétérogène des substrats utilisés compliquent le suivi direct des paramètres de fermentation. Les sondes utilisées en fermentation liquide ne sont pas compatibles.
- Il est pratiquement difficile d'assurer le contrôle direct des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments, assez aléatoire.
- Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate (Couto et Sanroman, 2006; Wang et Yang, 2007 ; Aguilar *et al.*, 2008).

2.3.2.2 - Substrats utilisés

Parmi les nombreux facteurs qui influent la croissance et l'activité microbienne dans un substrat particulier en fermentation sur milieu solide: la taille des particules, le taux d'humidité et l'activité de l'eau sont les plus critiques. Le choix du substrat dépend de plusieurs paramètres économiques (coût, disponibilité) et biologiques. De ce fait, les résidus agro-alimentaires (son de blé, la canne de riz, le marc de raisin) semblent d'être les plus intéressants, en raison de leurs avantages potentiels surtout pour les champignons filamenteux, qui sont capables de pénétrer à l'intérieur de leur structure solide. Par contre, les bactéries et les levures sont caractérisées par un développement superficiel (Manpreet *et al.*, 2005; Singh et Pandey, 2009).

2.3.2.3- Micro-organismes utilisés

Les bactéries et les champignons peuvent se développer sur des substrats solides et avoir des applications dans des procédés de fermentation en milieu solide.

Les bactéries sont principalement impliquées dans le compostage, l'ensilage et les procédés alimentaires. Les levures sont utilisées pour la production d'éthanol et dans l'alimentation animale ou humaine. Mais les champignons filamenteux restent le groupe de micro-organismes le plus utilisé en fermentation en milieu solide avec des applications très variées, grâce à leurs propriétés physiologiques, enzymologiques et biochimiques. Ils sont considérés comme les mieux adaptés à ce type de cultures, car proches de leur habitat

naturel. Les différents genres fongiques utilisés dans ce processus de fermentation sont : *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Trichoderma* et certaines espèces de *Penicillium* (Raimbault, 1998; Manpreet *et al.*, 2005)

2.3.2.4- Applications industrielles

D'une manière générale, les applications de la fermentation solide concernent l'alimentation humaine, le compostage et l'ensilage, la bio-filtration des gaz malodorants, la production des aliments riches en protéines pour l'alimentation animale, la production des enzymes et des métabolites spécifiques.

Tableau 2: Les applications industrielles de la fermentation sur milieu solide (Pandey *et al.*, 2000; Manpreet *et al.*, 2005; Wang et Yang, 2007; Singh et Pandey, 2009).

Domaine d'application	Microorganismes utilisés	Substrats
Industrie pharmaceutique		
✓ Insecticides	<i>Bacillus thuringensis</i>	Les déchets de noix de coco.
✓ Antibiotiques:		
Pénicilline	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Canne à sucre de la bagasse.
Céphalosporine	<i>Cephalosporium armonium</i>	Orge.
Céphamycine C	<i>Streptomyces clamuligerus</i>	Blé avec graines de coton.
Tétracycline	<i>S. viridifaciens</i>	Résidu de pomme de terre sucrée.
Oxytétracycline	<i>S. rimosus</i>	Epi de maïs.
Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>	Résidu de soja.
Cyclosporine A	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Son de blé.
✓ Hormones de croissance		
acide gibbérellique	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Gibberella fujikuroi</i>	Canne à sucre de la bagasse, son de blé.
✓ Mycotoxine		
Aflatoxines	<i>A. oryzae</i> , <i>A. parasitica</i>	Son de blé, maïs, riz, arachides.
Ochratoxines	<i>A. ochraceus</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>A. carbonarius</i>	
✓ Anti-fongiques	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Collectotrichum truncatum</i>	Farine de maïs.
Production des enzymes :		

Revue bibliographique

Glucoamylase	<i>Aspergillus sp.</i>	Les déchets de thé, riz, son de blé.
Lipase	<i>A.niger, Candida rugosa, Penicillium restrictum</i>	Tourteau de sésame, le gâteau de noix de coco.
Cellulases	<i>Bacillus subtilis, Aspergillus sp.,</i>	Déchets des fruits, tourteau de soja.
Pectinases	<i>A. niger, Talaromyces flavus,</i>	Déchets d'agrumes, le son de soja et de blé, la pectine de pomme.
Xylanases	<i>A.tamari, A. niger, Bacillus sp., Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei,</i>	Épi de maïs, son de blé, canne à sucre, farine de soja.
Protéases acides	<i>A.niger, Mucor miehei, Rhizopus oligosporus,</i>	Son de blé.
Phytases	<i>A. niger, A. ficuum, Mucor racemosus, Rhizopus oligosporus</i>	Le son de blé, farine de soja, maïs concassé.
Amylases	<i>Lentinula edodus, Bacillus licheniformis</i>	Son de blé.
Bio-pesticides :		
Bio-insecticide	<i>Coniothyrium minitans, Beauveria bassiana</i>	Imprégné de chanvre, granules d'argile + milieu liquide.
Bio-remédiation	<i>Phanerochaete chrysosporium, Lentinula edodes</i>	Canne à sucre colonial de la bagasse.
Industrie alimentaire:		
Aliments Fermentés	<i>A. oryzae, A. sojae</i>	Écorce des fruits divers.
Délicatification	Champignons de la pourriture blanche	La paille de blé.

Revue bibliographique

<p>Amélioration de la nutrition</p> <p>L'enrichissement en protéines</p> <p>Composés aromatiques</p>	<p><i>Penicilium</i> sp.</p> <p><i>Neurospora sitophila</i></p> <p><i>Bjerkandera adusta</i> ,<i>Bacillus subtilis</i>, <i>Rhizopus oryzae</i>, <i>Ceratocystis fimbriata</i></p>	<p>Fruits de bergamote épluchés</p> <p>Pulpe de betterave à sucre ou des déchets d'agrumes.</p> <p>Son de blé, soja haché.</p>
<p>Composés organiques</p> <p>Acide citrique</p> <p>Acide kojique</p> <p>Acide lactique</p> <p>Acide oxalique</p> <p>Acide fumarique</p>	<p><i>A. niger</i></p> <p><i>A. oryzae</i></p> <p><i>R. oryzae</i> , <i>Lactobacillus casei</i> <i>L. helveticus</i>, <i>L. paracasei</i> <i>Streptococcus thermophilus</i></p> <p><i>A. niger</i></p> <p><i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Rhizopus</i> sp.</p> <p><i>Aspergillus niger</i></p>	<p>Poudre des écales de café, pomme de terre sucrée, caroubiers écorcés, déchets d'ananas, épis de maïs.</p> <p>Le manioc, carotte-traitement des déchets, canne à sucre de presse de boue, sorgho à sucre.</p> <p>Pomme de terre sucrée.</p> <p>Écorces d'orange amidon de manioc brut.</p> <p>Extrait de figues, le glucose, fruits des figues.</p> <p>Pomme de terre sucrée ou le sorgho sucré.</p>

Acide gluconique		
Ethanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schwanniomyces castelli</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Torula utilis</i>	Mixture des produits agricoles riches en tannins.
Acide gallique	<i>Aspergillus foetidus</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	

2.4- Le Son de blé

Le son de blé est l'un des sous-produits de la mouture sèche du blé tendre. Il se compose de couches extérieures du grain du blé avec une partie de l'albumen (couche d'aleurone et petite quantité de l'album en amylacée). Il représente 10 à 17% du blé moulu (Hassan et al.,2008).

2.4.1- Composition du son de blé

Le son de blé est principalement formé par les enveloppes et la couche à aleurone riches en carbohydrates, cellulose, hémicellulose protéines. La couche interne du son, l'aleurone, est enlevée lors de la mouture et elle retrouve dans le son (Peyron et al.,2003). Elle constitue 6 à 7 % du poids du grain et contient des cellules riches en protéines (Pyler, 1988) et renferme des concentrations importantes de molécules d'intérêt nutritionnel, soit 40 % de minéraux (Antoine et al.,2002) et 20 % de protéines du son (Pomeranz, 1988). Elle contient aussi d'autres composantes bioactives comme la lignine (phytoestrogène) et les acides phénoliques (Javed et al.,2011). Les enveloppes sont constituées de cellulose, hémicellulose (pentosane) et de lignine formées par un ensemble de monosaccharides dont la teneur est variable (Tableau 3). Il s'agit d'une source de fibres alimentaires insolubles et d'acides phénoliques (Rouau et al.,2010). Elles contiennent aussi des composés bioactifs comme la bétaine et la choline (Javed et al.,2011). Les pentosanes sont des polysaccharides appartenant à deux familles : les arabinoxylanes et les arabinogalactanes. La cellulose est un homopolysaccharide cristallin, principalement retrouvé dans le péricarpe, mais absent dans la couche à aleurone. Les chaînes de celluloses confèrent aux parois du grain une résistance chimique et physique.

Tableau 3 : Pourcentage des monosaccharides dans le son de blé (Benamrouche et al., 2002).

Monosaccharides	Pourcentage (%)
Xylose	43,7
Arabinose	23,7
Glucose	23,1
Galactose	2,1

Les parties périphériques du grain de blé représentent une source importante en protéine et en minéraux (Tableau 4). En effet, l'assise d'aleurone, représentant l'une des couches formant le son de blé, est très riche en vitamines (B1, B2, B3, B6, B9 et E) et en minéraux (P, K, Mg, Mn et Fe) (Pomeranz, 1988 ; Feillet, 2000 ; Antoine et al., 2002).

Tableau 4 : Teneur en minéraux et en vitamines du son de blé (Feillet, 2000)

Minéraux (mg/100g de son)		Vitamine (mg)	
potassium	1000-1500	Vitamine E	2-6
magnésium	500-700	Vitamine B1	0.4-0.8
calcium	100	Vitamine B2	0.1-0.2
sodium	5-30	Vitamine pp	4-6
Zinc	10-50	Vitamine B6	0.5-1

2.4.2- Utilisations principales du son de blé

2.4.2.1- Alimentation animale En France, la plus grande partie de la production annuelle de son de blé est destinée à l'alimentation animale, en particulier à celle des ruminants même si une petite partie est destinée à l'alimentation des monogastriques, tels les porcs. Le son est utilisé en tant que source de protéines et en tant qu'agent de charge grâce à ses propriétés de rétention des liquides.

2.4.2.2- Alimentation humaine

Les qualités nutritionnelles et physiologiques particulières du son font qu'il est aussi utilisé dans le domaine de l'alimentation humaine en tant que fibres alimentaires, notamment dans le domaine de la boulangerie sous la forme de pains et de biscuits. Ceci signifie qu'il fait alors partie des aliments, mais qu'il n'est pas dégradé par des enzymes propres à l'homme (Selvendran et al., 1980 ; Ralet et al., 1990). Sa consommation aurait des effets bénéfiques sur le transit intestinal en régulant sa durée, sur le foie et sur la modulation du

taux de cholestérol. Il aurait aussi un rôle dans la prévention d'un certain nombre de maladies et de cancers en agissant comme un inhibiteur d'agents mutagènes.

2.4.2.3- Industrie papetière

Le son de blé, plus ou moins traité pour éliminer l'amidon pourrait trouver des débouchés dans les domaines de l'industrie papetière où sa faible teneur en lignine peut représenter un avantage.

2.4.2.4- Applications diverses

Il pourrait être inclus comme agent de charge pour la fabrication des panneaux de particules. Il a aussi été étudié, pour la fermentation en vue de produire de l'éthanol, de l'acide citrique, des produits de cosmétologie, ou pour la production de champignons ou d'enzymes. Les arabinoxylanes de son de blé peuvent gélifier grâce aux substituant d'acides phénoliques. Cette propriété leur ouvre des applications médicales sous la forme de gels utilisés pour recouvrir des blessures et accélérer la cicatrisation (Greenshields, 1993). Les propriétés filmogènes des arabinoxylanes de son de blé permettent aussi d'envisager des débouchés dans le domaine de l'enrobage des semences. Toutes ces propriétés physiologiques sont actuellement des sujets de recherche et des débouchés possibles pour les hémicelluloses extraites, souvent limités par des problèmes de production de qualité constante. Le développement de procédés industriellement rentables est donc un enjeu très important. Ce type de procédé concernerait en réalité le fractionnement de la plante pour la production de fractions amylacées, polysaccharidiques et fibreuses.

3- Matériel et Méthodes

La protéase est une enzyme à utilisation biotechnologique intéressante. En effet, elle peut être exploitée dans divers domaines, en l'occurrence : pharmaceutique, médicale, alimentaire et détergent etc. Le présent travail, s'inscrit dans le cadre de caractérisation des souches fongiques protéolytiques isolées à partir du sol et des plantes des milieux extrêmes; effet du pH et de la température sur l'activité protéasique. La partie expérimentale est réalisée au niveau du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri Constantine.

3.1- Echantillonnage

Les échantillons du sol et des plantes (feuilles, fruits, tiges et fleurs) étudiés, ont été prélevés entre les mois de Février et Mars 2015 à partir de 3 régions (Droue, Bala et Hadab), répartis entre les Wilayas de Biskra et Ouargla (Figure 5), dans le but d'isoler des souches productrices d'enzymes protéolytiques. Le choix des échantillons à traiter est réalisé de façon à varier la nature et le lieu de prélèvement de ces derniers. Les échantillons du sol sont prélevés à l'aide d'une spatule stérile, après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol. Ceux des plantes (feuilles, tiges, fleurs, et fruits) sont prélevés à l'aide d'une pince stérile. Les échantillons du sol et des plantes sont introduits dans des sachets stériles afin de les transporter jusqu'au laboratoire.

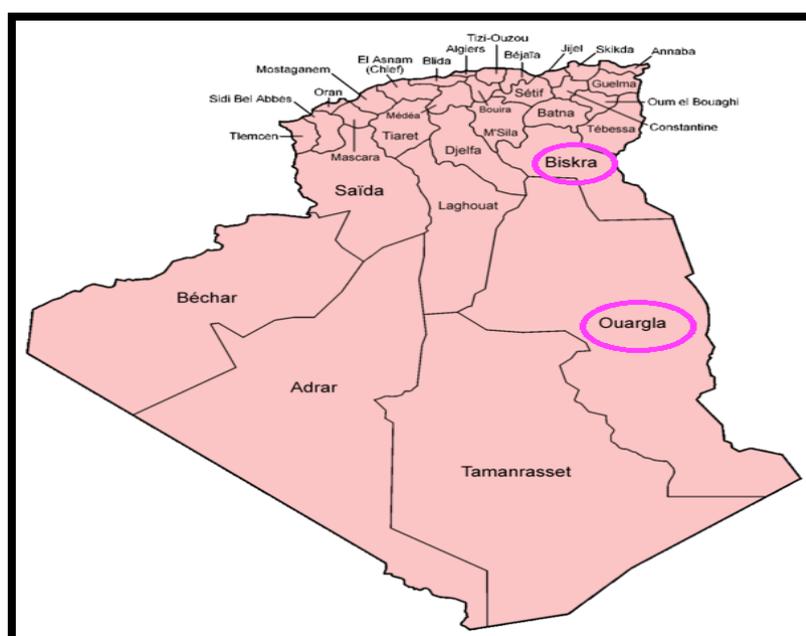


Figure 5 : Localisation géographique des régions d'échantillonnage

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des sites d'échantillonnages, types d'échantillons et caractéristiques des sols explorés.

Wilaya	Site d'échantillonnage	Types d'échantillon	Type du sol et de la plante	Caractérisation du sol		Image
				Profondeur (cm)	Couleur	
Biskra	Site 1 (Droue)	sol	Sol 1	10 à 20	Marron clair	
			Sol 2 Sous palmier	10 à 20	Marron clair	

Matériel et Méthodes

		Plante	Plante A	Feuille du palmier		
Ouargla	Site2 (bala)	sol	Sol 3	10 à 20	Marron clair	
			Sol 4 Sous palmier	10 à 20	Marron	

Matériel et Méthodes

		plante	Plante B (Datte)	Takarmoste	
			Plante C	Mlita	
			Plante D	Gnawiya	

Matériel et Méthodes

			Plante E	Elkasba		
Site 3 (Elhdab)	Sol	Sol 5	5 cm	Marron clair		
		Sol 6 Sous palmier	10 à 20	Marron		

Matériel et Méthodes

		Plante	Plante F		
		Plante	Plante G		
		Plante	Plante H		

3.2- Isolement

3.2.1- À partir du sol

La préparation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère du sol en ajoutant 1g du sol à 9ml d'eau physiologique stérile (9g d'NaCl dans 1 litre d'eau distillée), suivie d'une agitation pendant 3 min. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1 ml de la solution précédente à 9 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-4} (Jerome *et al.*, 2004).



Figure 6 : Dilutions décimales obtenues

3.2.2 -À partir des plantes

Les différentes parties des plantes (tiges, fruits, feuilles et fleurs) sont traitées, par le passage successif dans de l'éthanol, de l'eau de Javel et enfin de l'eau distillée et ce, à l'aide d'une pince stérile, ensuite coupées en fragments de quelques millimètres.

3.3- Ensemencement

3.3.1- À partir du sol

Un volume de 0.1 ml de chacune des dilutions indiquées ci-dessus, est déposé sur des boîtes de Pétri contenant la gélose PDA et YPGA (Annexe 1) avec l'addition d'un antibiotique, la Gentamicine (0.04g /l) afin d'inhiber la croissance des bactéries Gram positif et Gram négatif (Botton *et al.*, 1990). Ensuite, un étalement uniforme a été effectué avec un étaloir stérile, par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Grâce à cette méthode, toutes les colonies se développent sur la surface (Tortora *et al.*, 2003). Les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C pendant 3 à 7 jours.

3.3.2 - Les plantes

Des boîtes de Pétri contenant les milieux de culture PDA et YPGA ont étéensemencées par 3 ou 4 fragments (les feuilles, les fleurs, les fruits et les tiges). L'incubation des boîtesensemencées, est réalisée à 28°C pendant 3 à 7 jours.

3.4- Purification des souches

Les colonies des moisissures et des levures obtenues, sont repérées dès leur apparition, sur PDA pour les moisissures et sur YPGA pour les levures. Les moisissures sont, ensuite, repiquées sur le même milieu PDA et les levures sont réactivées sur le milieu YPGA, toujours supplémentés par la Gentamicine.

3.5- Conservation

Les moisissures sont conservées par la méthode la plus simple et la plus communément utilisée au laboratoire, qui consiste à repiquer ces souches à la fin de leur croissance en tubes sur gélose inclinée, en utilisant comme milieu de conservation la gélose PDA. Après une semaine d'incubation à 30°C, les cultures sont conservées à +4°C (Botton *et al.*, 1990).

3.6- Mise en évidence de l'activité protéolytique

Les souches protéolytiques sont sélectionnées sur milieu gélosé à base de lait (Annexe 1) par la méthode des disques. L'incubation a lieu à 30°C. À partir du deuxième jour, des mesures sur le diamètre de chaque colonie et sa zone d'hydrolyse sont effectuées. Celles-ci permettent de sélectionner les souches protéolytiques les plus performantes.

3.7- Identification de la souche sélectionnée

La souche protéolytique la plus performante est soumise à une identification macroscopique (caractères culturaux) et microscopique (caractères morphologiques), selon la méthode établie par Pitt et Hoecking, (2009).

3.7.1- Identification macroscopique

L'observation des moisissures est faite sur la face (types et aspects de colonies, formes et couleurs de spores) et sur le revers de la boîte (Botton *et al.*, 1990). L'examen à l'oeil nu permet la détermination des caractères suivants:

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

3.7.2- Identification microscopique

L'identification microscopique des moisissures repose sur plusieurs méthodes, les deux méthodes utilisées sont celles du scotch pour les cultures filamenteuses et poudreuses et la méthode de coloration par le lactophénole bleu de coton (Chabasse *et al.*, 2002).

- **Méthode de Scotch** : un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince, puis déposé sur une lame porte-objet (Chabasse *et al.*, 2002).
- **Coloration par le lactophénole bleu coton** : un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant, recouvert d'une lamelle couvre-objet servant à écraser la préparation (Chabasse *et al.*, 2002).

L'observation microscopique est effectuée au microscope optique aux différents grossissements (GX4, GX10, GX40), et par immersion à (GX100). Les caractéristiques prises en considération dans cette technique sont la nature du filament, la fructification, la morphologie des spores asexuées et la présence de structures particulières comme les sclérotés.

3.8- Méthode de fermentation et de production

3.8.1- Préparation du milieu de fermentation

Pour la fermentation, le milieu de culture choisi est un milieu solide à base de son de blé ; il est favorable à la production des protéases extracellulaires (Kumar *et al.*, 2005). Dans des Erlen-Meyers de 250 ml, on introduit 10g du son de blé supplémenté à 10ml du milieu minéral, ayant la composition suivante (g/l) : KNO₃ 2.0, MgSO₄.7H₂O 0.5, K₂HPO₄ 1.0, ZnSO₄ 7H₂O 0.437, FeSO₄7H₂O 1.116, MnSO₄7H₂O, dont le pH est égal à 6,5. La préparation est stérilisée par la suite à l'autoclave à 121°C pendant 15min.

3.8.2- Préparation de l'inoculum

L'inoculum correspond à la suspension sporale de la souche fongique sélectionnée. Cette dernière, est préparée par addition de 10 ml d'eau physiologique stérile aux souches cultivées pendant sept jours sur milieu PDA en boîte de Pétri. Les spores sont récupérées superficiellement en utilisant un râteau sous des conditions aseptiques. Ensuite, la détermination de la concentration de la suspension sporale est effectuée par dénombrement des spores sur cellule de THOMAS.

3.8.3- Ensemencement des milieux de fermentation

Après stérilisation, les Erlenmeyer ont été inoculés avec 1ml de la solution sporale préparée précédemment, (106 spores/ ml) et incubées à 30°C dans un bain Marie thermostaté. Des prélèvements du milieu de fermentation sont effectués chaque 24 h afin d'établir la cinétique de production de protéase de la souche sélectionnée.

3.9- Etude de l'activité protéolytique produite

3.9.1- Préparation des extraits enzymatiques

Après la fermentation, les cultures ont été extraites avec 100 ml d'eau distillée stérile en assurant une agitation, pendant 2 heures dans un incubateur agitateur, le mélange est alors filtré à travers une passoire pour éliminer les solides (Tunga *et al.*, 2003). Le filtrat est, lui-même, clarifié par une autre filtration sur papier filtre (Whatman n° 1) pour obtenir l'extrait enzymatique brut. Ce dernier, est conservé au congélateur pour le dosage de l'activité enzymatique

3.9.2- Méthode de dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par la protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés (Mathieu, 2005). Cette quantité de tyrosine libérée, peut être mesurée directement par la méthode colorimétrique, décrite par, Auberger *et al.* (1995) et Mechakra *et al.* (1999).

3.9.2.1- Principe

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et les polypeptides en libérant des acides aminés libres et des peptides simples, qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées

par le TCA. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines que l'on utilise comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéasique à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu. Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

3.9.2.2- Réaction enzymatique

L'activité protéolytique est déterminée par l'utilisation de la caséine comme substrat. Le mélange réactionnel est préparé comme suit : - 1 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage dilué au 1/10^{ème}. - 1,5 ml du tampon citrate - phosphate (0,1M / 0,2 M) à pH 6.8 - 2,5 ml de substrat (solution de caséine à 2.5% dans le citrate de sodium (0,02 M) à pH 7,0. Après agitation, (vortex VWR) et incubation pendant 1h au bain marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid à 4%. Le mélange est agité et laissé reposer pendant 30 min à 4°C (Beynon et Oliver, 2004; Wu *et al.*, 2006 ; Devi *et al.*, 2008) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (Sandhya *et al.*, 2005). Le produit obtenu est, ensuite, filtré sur papier Whatman N°01.

3.9.2.3- Protocole de dosage

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'Anson, (1938). - 0.5 ml du filtrat. - 2.5 ml de Na₂CO₃ à 2% dans le NaOH (0,1N). - 0.25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/4^{ème} Le mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 30min (Sumantha *et al.*, 2006 ; Paranthaman *et al.*, 2009). L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm (marque du spectro.JENWAY6315) ; l'activité est calculée par référence à une courbe étalon de la tyrosine comme standard. Une unité (UI) de protéase est l'équivalent de 1µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml de la solution d'enzyme. Le blanc est préparé de la même manière, sauf que le TCA est rajouté avant le substrat. Chaque dosage est effectué en trois répétitions.

3.10- Etude des propriétés de l'enzyme

3.10.1- Influence du pH

L'influence du pH sur l'activité enzymatique est estimée par l'addition (au mélange réactionnel) de tampons afin d'obtenir différentes valeurs de pH, c'est-à-dire des pH compris dans l'intervalle [4-9]. Pour cela, on ajoute les systèmes tampons suivants : - Pour l'intervalle [4 –5] : citrate de sodium (0,1 M) / phosphate monosodique (0,2 M) ; - Pour l'intervalle [5 –7] : phosphate monosodique (0,2 M) / phosphate disodique (0,2 M) ; - Pour l'intervalle [7 –9] : phosphate disodique (0,2M) /NaOH (1N).

3.10.2- Influence de la température

L'effet de la température d'incubation est déterminé par mesure de l'activité protéasique de l'extrait brut, incubé pendant 1 heure dans de différentes températures (30°C, 40°C, 50°C, 60°C et 70°C), à pH optimal.

4- Résultats

4.1- Isolement

L'isolement des souches microbiennes protéolytiques sur milieux PDA et YPGA a permis l'obtention de trente six moisissures et sept levures. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 6; ils font apparaître la répartition du nombre de colonies des champignons apparus dans chaque échantillon.

Tableau 6 isolement des champignons sur PDA et YPGA

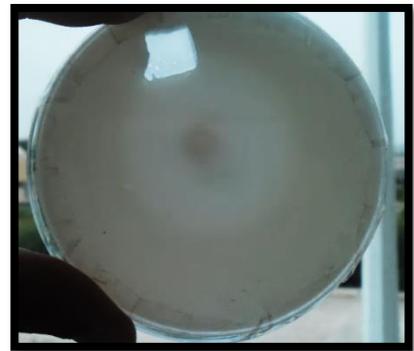
Wilaya	Région	Echantillon	Nombre de colonies des Champignon	
			Moisissure	Levure
Biskra	Droue	sol	6	2
		Plante	2	0
Ouargla	Dakar	Sol	4	2
	Bala	sol	3	2
		Plante (mlita)	4	0
		Datte	3	0
	Elhadab	sol	6	1
		Plante (Elaka)	8	0

4.2- Mise en évidence de l'activité protéolytique

Le choix des milieux de culture est déterminant pour l'isolement et le dénombrement des microorganismes, ainsi que dans la mise en évidence de l'activité enzymatique et surtout dans le choix de la substance protéique employée comme substrat pour la production des protéases (Clarke et Steel, 1966). Pour cela, on a utilisé le milieu au lait gélosé comme milieu sélectif. Les résultats obtenus après l'ensemencement des laits gélosés donnent des zones d'hydrolyses permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique chez six moisissures et trois levures sur l'ensemble des quarante trois souches différentes. Cinq souches sont caractérisées par des zones d'hydrolyse dont le diamètre est inférieur à 16mm, trois ont un diamètre variant de 19mm à 32 mm, et enfin, une souche à un diamètre supérieur à 70mm a été sélectionnée pour la production de protéase (tableau 7)



L₄



L₁



L₇



A₂₄ (la souche sectionnée)

Figure 7 : Résultat de la croissance de quelques souches protéolytique sur lait gélosé

Tableau 7 : Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieu lait gélosé.

	Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm)					
	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}	5 ^{ème}	6 ^{ème}	7 ^{ème}
A ₂₄	12	21	49	60	72	78
L ₁	7	14	18	21	29	32
L ₇	9	11	16	19	31	32
L ₄	/	4	8	10	15	19
A ₂₃	5	10	16	*	*	*
A ₁₆	/	3	9	*	*	*
A ₁₈	/	7	8	*	*	*
A ₁₃	/	7		*	*	*

* : envahissement du milieu

/ : absence de la zone d'hydrolyse.

4.3- Identification de la souche sélectionnée

4.3.1- Identification macroscopique

Les caractères macroscopiques de la moisissure isolée sont étudiés sur milieu PDA, l'un des milieux les plus fréquemment utilisés. Le tableau 8 résume l'aspect macroscopique des mycéliums, le diamètre de la colonie, la texture, la couleur du mycélium et la couleur du revers des boîtes.

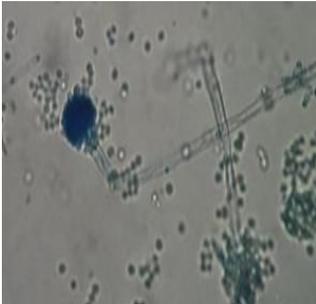
Tableau 8 : Caractères morphologiques de la souche fongique obtenu.

milieu	diamètre de colonie (mm)	Couleur du revers	Texture	Couleur de colonie	photo	
					Face	Revers
PDA	Envahit toute la boîte	incolore	Poudreuse	blanche au début et entièrement verte après la sporulation		

4.3.2- Identification microscopique

L'observation microscopique a permis l'identification présomptive du genre de la moisissure protéolytique isolée, en les comparants aux genres fongiques précédâmes décrits dans la littérature, comme mentionné dans le tableau 9. L'analyse des résultats obtenus nous a permis de constater que la moisissure isolée appartient au genre *Aspergillus*.

Tableau 9 : Caractères microscopiques de l'isolat sélectionné.

Aspect microscopique du genre	Genre	Aspect microscopique obtenus	
<ul style="list-style-type: none"> • Conidiophores lisses incolores. • Vésicule globuleuse. • Phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposés sur le pourtour de la vésicule. • Conidies de petite taille globuleuses. 	<i>Aspergillus sp</i>		
		GX40	GX100

4.7- Cinétique de production de la protéase

L'activité protéolytique testée dans le milieu de fermentation solide (son de blé) a montré que cette dernière a été détectée dans le filtrat de la culture dès le premier jour, durant cette période l'activité est très faible. La production maximale de l'enzyme est obtenue après quatre jours de fermentation (11130UI), au delà de 4 jours, la production montre un déclin du rendement en enzyme dans le milieu de culture (figure 8).

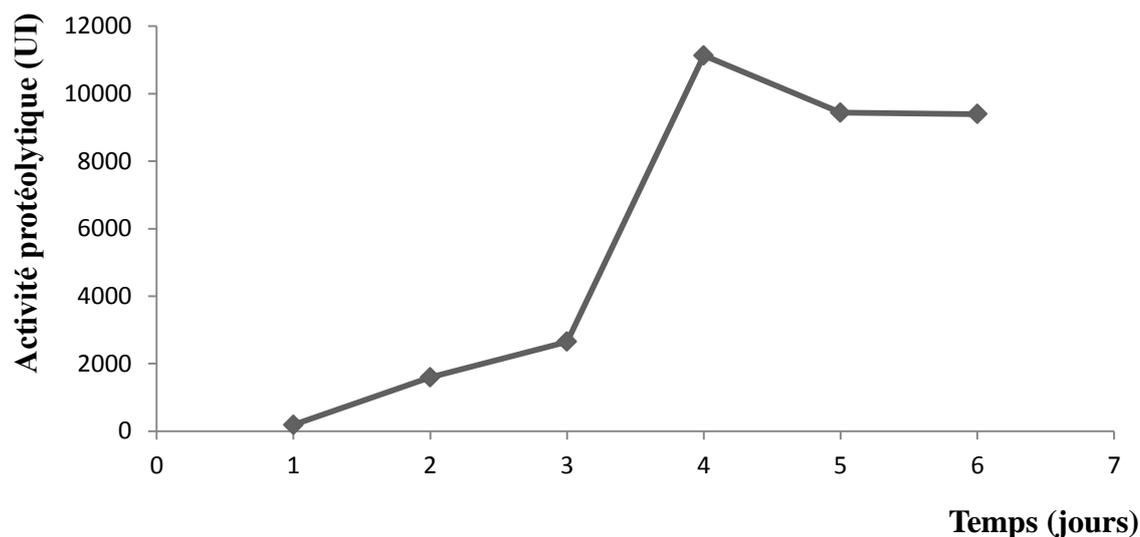


Figure 8: Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche *Aspergillus sp* dans le milieu de fermentation solide (son de blé).

4.5- Effet du pH sur l'activité de l'enzyme

La figure ci-dessous, montre l'effet du pH sur l'activité protéolytique ; cette étude est faite dans une gamme de pH de 4 à 9. D'après cette figure on remarque dans l'intervalle allant de 4 jusqu'à 6, une augmentation progressive de l'activité protéolytique avec l'augmentation du pH réactionnel ; une meilleure activité est observée à pH 7 désignant le pH optimal de la protéase étudiée, Au delà de ce pH, on observe une diminution graduelle de l'activité protéolytique.

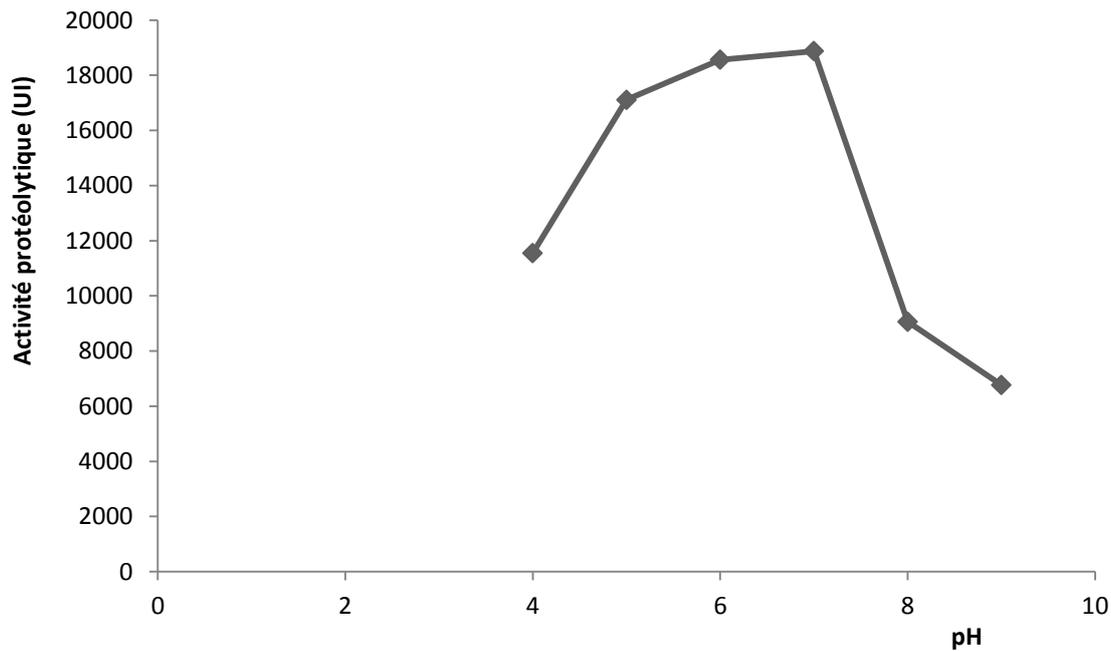


Figure 9 : Effet du pH sur l'activité protéolytique.

4.6- Effet de la température

La figure 10 représente l'effet de la température sur l'activité protéolytique ; elle montre une valeur constante de l'activité protéolytique dans une gamme de température allant de 30°C jusqu'à 40°C. Au delà de cette température, on observe une augmentation de l'activité protéolytique jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur maximale à 50°C. Après cette température, une diminution réactionnelle de l'activité protéolytique est observée, elle atteint une valeur presque nulle à 70°C.

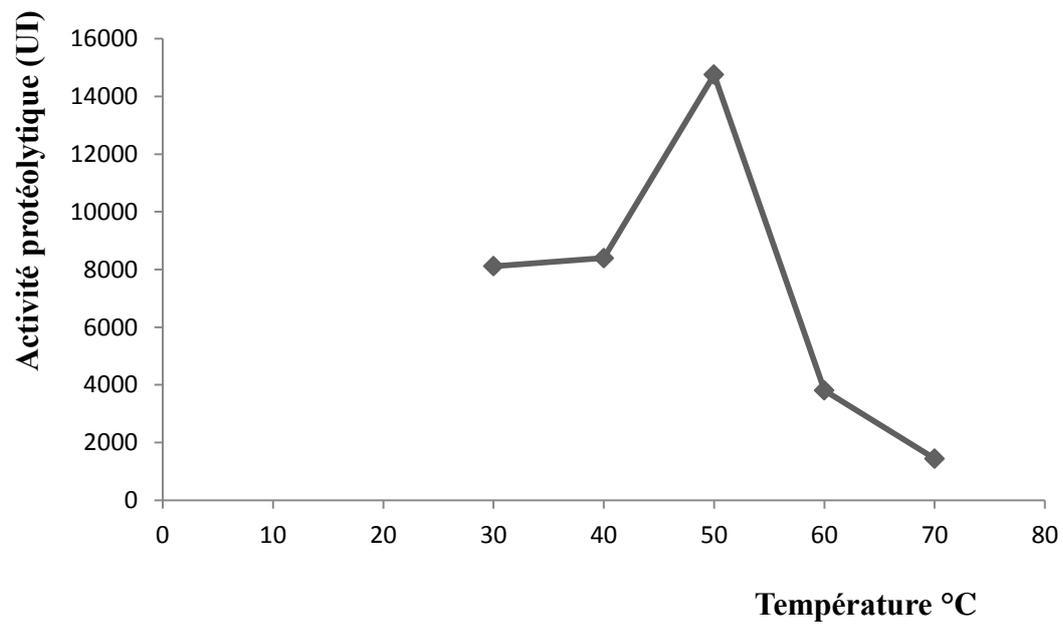


Figure 10 : Effet de la température sur l'activité protéolytique de la souche *Aspergillus sp.*

5- Discussion

Les protéases sont des enzymes essentielles dans les différentes applications industrielles, biotechnologiques, médicales et dans les domaines de recherche (Coral *et al.*, 2003; Sandhya *et al.*, 2005). Elles sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vu leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (Gupta *et al.*, 2002; Sandhya *et al.*, 2005). Cependant, les protéases microbiennes sont plus intéressantes que celles provenant des sources végétales ou animales depuis qu'elles présentent les caractéristiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques.

Le présent travail porte sur la production de protéases par des souches fongiques et la caractérisation de l'enzyme qu'elles produisent.

L'échantillonnage est réalisé dans les milieux extrêmes en raison que les enzymes produites par les microorganismes de ces endroits possédant les caractéristiques désirées par l'industrie.

L'obtention de quarante-trois isolats montre la richesse de nos milieux extrêmes en champignons.

Le choix des milieux de culture est déterminant dans l'isolement et aussi dans la mise en évidence de l'activité enzymatique et surtout dans le choix de la substance protéique employée comme substrat pour la production des protéases (Clarke et Steel, 1966). Pour cela, on a utilisé le milieu gélosé à base de lait comme milieu sélectif.

Le maximum de la production d'enzyme a été observé après 96 heures de la fermentation. Le même temps est rapporté aussi bien pour la production de protéase par *Aspergillus oryzae* (Wang *et al.*, 2008 ; Murthy et Naidu, 2010). Par ailleurs, (Battaglino *et al.* 1991) indiquent un intervalle de temps de 72-96 heures nécessaire pour la production d'une activité maximale de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* cultivée sur le son de blé en *SSF*.

Durant les premières 24 h, l'activité est très faible, cela indique que les spores sont métaboliquement dormantes et que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination (Assamoi *et al.*, 2009).

Une diminution progressive de l'activité protéolytique a été signalée avec l'augmentation du temps d'incubation, suggérant clairement le rôle d'enzyme en tant qu'un métabolite primaire, produit pendant la phase logarithmique de la croissance du champignon afin d'utiliser les nutriments (protéines) présents dans le substrat solide. L'incubation au-delà de cette période

nutriments (protéines) présents dans le substrat solide. L'incubation au-delà de cette période optimale a montré un déclin rapide dans le rendement d'enzyme.

Cette diminution était probablement due à l'épuisement des éléments nutritifs, l'inactivation d'enzyme par d'autres métabolites toxiques libérés dans le milieu et les variations du pH de milieu (Sumantha *et al.*, 2006 ; Paranthman *et al.*, 2009).

La deuxième partie consistant à la détermination des conditions physicochimiques (pH et température) optimales de l'activité de l'enzyme produite par la souche *Aspergillus sp.*, a montré que le pH optimal se situe à pH 7, le même que celui rapporté par (Vishwanatha *et al.*, 2009). Ce résultat est très proche du pH optimal de la protéase neutre produite par plusieurs moisissures. En effet, les protéases neutres d'*Aspergillus oryzae* présentent des pH optimums de 7 (Sekine, 1972; Benkahoul, 2002; Sumantha *et al.*, 2005) ; entre 6,0 et 7,0 (Battaglino *et al.*, 1991) et de 7,2 (Boukhalifa, 2003).

Chaque enzyme possède un pH optimal auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale. Des légères variations du pH autour de cette valeur entraînent une diminution de l'activité enzymatique, en raison des modifications de l'ionisation des groupements compris dans le site actif de l'enzyme. Des déviations plus importantes du pH, conduisent à dénaturer l'enzyme en modifiant l'ionisation des acides aminés et en rompant les interactions non covalentes maintenant sa structure tridimensionnelle (Hames *et al.*, 2006).

Enfin, en ce qui concerne l'effet de température sur l'activité protéolytique, la température optimale est de 50°C, elle est similaire à celle obtenue par plusieurs chercheurs Singh *et al.* (1994) ; Moreira *et al.* (2001) ; Boukhalifa, (2003) ; Sumantha *et al.* (2005). Par ailleurs, quelques protéases fongiques présentent des optima de température de 60°C (Singh *et al.*, 1994; Chellappan *et al.*, 2006).

La souche *Aspergillus sp.* à montrer une activité protéolytique très importante qui atteint 11130UI au bout du 4ème jour.

L'activité enzymatique développée par *Aspergillus sp.* est bien classée en comparaison avec les autres travaux. En effet, elle est plus importante dans le cas d'*Aspergillus niger* (Dendouga, 2006) cultivé sur milieu liquide Czapek modifié (4667UI), *Aspergillus oryzae*.

NRRL 2220(4506 UI) cultivé sur milieu liquide à base de déchets de tomates (Belmesikh, 2011).

Donc on peut dire que le son de blé est un excellent substrat pour la production des protéases fongiques par fermentation solide.

6- Conclusion et perspectives

Le but de cette étude est de rechercher des champignons capables de produire des protéases ayant un intérêt industriel à moindre coût.

Pour cela, les échantillons du sol et des plantes ont été prélevés à partir des écosystèmes extrêmes (Ouargla et Biskra). Leur culture sur milieux PDA et YPGA a permis d'isoler 43 souches fongiques dont 9 souches (3 levures et 6 moisissures), ayant un pouvoir protéolytique sur le milieu gélosé à base de lait. Parmi ces dernières, une moisissure a été sélectionnée en raison de leur activité protéolytique importante.

Afin de mieux connaître la protéase produite, nous avons étudié ses propriétés ce qui permet de connaître les éventuelles applications. Cette étude a donné un pH optimum de 7 et une température optimale égale à 50°C. Tous ces résultats montrent la richesse de nos milieux extrêmes en champignons et les possibilités offertes pour la recherche de nouvelles espèces productrices d'enzymes ayant un intérêt industriel.

A travers nos résultats, nous avons démontré les possibilités d'obtention de protéase avec de bonnes activités à partir du son de blé par *Aspergillus sp.* Mais nos travaux ouvrent aussi la voie à de nouvelles perspectives :

- L'identification moléculaire complète de la moisissure *Aspergillus sp.*
- L'étude approfondie de l'enzyme et son mécanisme d'action.
- Etude de la thermostabilité de l'enzyme.
- Pour une exploitation industrielle, il est nécessaire de réaliser des cinétiques en « Scall Up » (en fermenteur de 20 L, en fermenteur de 50 L et en fermenteur de 100 L), pour s'assurer de la stabilité de l'enzyme en conditions industrielles.

7- Abstract

This work articulates around the production of a fungal protease, which is an enzyme of industrial interest, namely: human and animal food, pharmaceutical and medical industry, and especially in the cleaners industry.

For this, plants and soil samples were collected (taken) from several sites distributed between the regions of Ouargla and Biskra, situated in the southeast of Algeria.

The first part of this study consists in purifying the fungal strains having proteolytic activity by a screening. After the isolation and the purification of these strains on the media PDA and YPGA, 43 strains were isolated, 9 strains have a protease activity were obtained. Among these last strains, the only one was selected for the fermentation according to the diameter of the colony and the zone of lyse measured on agar milk medium. Presumptive identification based on the macroscopic and microscopic study showed that this isolate belongs to the genus *Aspergillus*. This strain is grown in solid medium or a low-cost agri-alimentary residue, the wheat bran is used as a substrate. The production of the enzyme is estimated by a dosage of proteolytic activity. The results obtained revealed that the strain *Aspergillus sp*, gave an excellent activity reaching 11130U at the end of the fourth day of fermentation. The study of pH and temperature optima of incubation showed that the protease produced by *Aspergillus sp* has an optimum pH of 7 and an optimum temperature which is 50 ° C.

Keywords: protease, *Aspergillus sp.*, fermentation, bran of wheat, extreme environments, proteolytic activity.

8-ملخص

إن هذا العمل يدور حول إنتاج إنزيم البروتياز الفطري، و الذي يعتبر إنزيم ذو أهمية صناعية سواء في تغذية الإنسان و الحيوان، أو في الصناعة الصيدلانية و الطبية و خاصة صناعة المنظفات. و لهذا تم أخذ و جمع عينات من النباتات و التربة من مواقع مختلفة متواجدة في ورقلة و بسكرة، الواقعتين جنوب شرق الجزائر.

الجزء الأول من هذه الدراسة ارتكز على تنقية السلالات الفطرية ذات النشاط الإنزيمي "بروتيو ليتيك" بواسطة الفحص. بعد عزل و تنقية هذه السلالات على الأوساط البيئية PDA و YPGA، تم الحصول على 41 سلالة، 9 منها فقط ذات نشاط إنزيمي "بروتياز". و من بين هذه الأخيرة، سلالة فطرية واحدة اختيرت للتخمير حسب قطر المستعمرة و مجال التحلل المقاسة على وسط أجار يحتوي على الحليب.

التعرف الأولي على هذه السلالة و الذي استند على الدراسة العينية و المجهرية بين أن هذه العزلة تنتمي إلى جنس *Aspergillus*. و قد تم زرع هذه السلالة في وسط صلب أي في وسط به بقايا لأغذية زراعية منخفضة التكلفة، و المتمثلة في نخالة القمح التي استخدمت كمادة. و يقدر إنتاج الإنزيم بواسطة معايرة النشاط الإنزيمي "بروتيو ليتيك". و كشفت النتائج التي تم الحصول عليها أن سلالة *Aspergillus sp* أعطت نشاطا ممتازا وصل إلى 11130 وحدة في نهاية اليوم الرابع للتخمير. كما أن دراسة درجة الحموضة و درجة الحرارة المناسبين للحضن أظهرت أن إنزيم البروتياز ينتج من طرف *Aspergillus sp* في درجة حموضة مثلى تساوي 7 و درجة حرارة 50 درجة مئوية.

الكلمات المفتاحية: بروتياز، *Aspergillus sp*، نشاط إنزيمي "protéolytique"، تخمر، نخالة القمح.

9- Référence bibliographique

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. *Proc. Biochem.* 40: 1131–1136.

Aguilar C. N., Gerardo G. S., PLilia A., Raul R. H., José M. H. and Juan C. E. (2008). Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*.4 (4): 354-366.

Antoine C., Lullien Pellerin V., Abecassis J. & Rouau X. (2002). Nutritional interest of the wheat seed aleurone layer. *Sciences des Aliments*. 22. pp. 10.

Antranikian G., Vorgias C., Bertoldo C. (2005). Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 96, 219-62.

Assamoi A. A., Destain J., Thonart P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(2) : 281–294.

Auberger B., Mechakra A., Remeuf F. et Lenoir J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*. 19 : 633-675.

Battaglino R. A., Huergo M., Pilosof A. M. R., Bartholomai G.B. (1991). Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35 : 292–296.

Belitz H. D., Grosch W. and Schieberle P. (2009). Food chemistry. 4ème Ed Springer Verlag Berlin. P.1070.

Belmesikh. A. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. mémoire de Magister. Faculté des sciences. Université *Mentouri Constantine*.

Benamrouche S., Cronier D., Debeire P., & Chabbert B. (2002). A chemical and histological study on the effect of beta-endo-xylanase treatment on wheat bran. *Cereal Science*.36 (2). pp. 7.

Benkahoul M. (2002). Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur déchets d'oranges. Optimisation du milieu de cultures, purification partielle et étude des propriétés physico-chimiques de l'enzyme. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université *Mentouri Constantine*.

- Beynon R. J. et Oliver S. (2004).** Avoidence of proteolysis in extracts. *Mthods mol. Boil.* 596. 81-93.
- Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J. P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J. P., Reymond P., Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2éme édition. Masson. Paris. pp. 16-41. 110-364.
- Bouanane-Darenfed A., Fardeau M. L., Gregoire P., Joseph M., Kebbouche-Gana S., Benayad T., Hacene H., Cayol J. L., Ollivier B. (2011) .** *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. a new thermophilic anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from an Algerian hot spring. *Curr. Microbiol.* 62:826-832.
- Boukhalfa H. (2003).** Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* cultivée sur milieu à base de déchets de tomates. Optimisation de milieu de culture et étude des caractéristiques de l'extrait enzymatique. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université *Mentouri Constantine*.
- Calk P., Takaç S., Calk G. & Ozdamar T. H. (2000).** Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus lichniformis*. *Enz. Microbiol. Technol.* 26(1). 45-60.
- Channe P. S. and Shewale J. G. (1998).** Influence of culture condition on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 14. 11-15.
- Chellappan S., Jasmin C., SoorejBasheer M., Elyas K. K., SaritaBhat G. and Chandrnasekaran M. (2006).** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontiu malbum* BTMFS10 under solid state fermentation. *ProcessBiochemistry.* 41.956-961.
- Chi Z., Ma C., Wang P., Li H. F. (2007).** Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresour. Technol.* 98. 534–538.
- Chutmanop. J. S., Chuichulcherm Y., Chisti et P. Srinophakun. (2008).** Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. Chem Technol. Biotechnol.* 83: 1012–1018.
- Clarke P. H. et Steel K. J. (1966).** Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London. P.111.
- Colwell R. R. et Grigorova. R. (1989).** Methods in microbiology. (Ed) St E dimundsburt press limited. Great Britain. P: 133-138.

Référence bibliographique

- Coral G., Arikan B., Ünalı M.N. et Güvenmez H. (2003).** Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*, 53 (4): 491-498.
- Cousin D., Matagne A., Laemmlı U. K. & Stewart D. J. (1982).** The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34. 1157-1166.
- Couto S. R. and Sanromán Á. M. (2006).** Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of food Engineering*. 76. 291-302.
- Dahot M. O. (1987).** Studies on proteolytic enzyme. Part I. Characteristics of protease synthesis by *Penicillium expansum*. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 30(3). 194-196.
- Delgado-Jarana J., Rincon A. M. et Benitez T. (2002).** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. Cloning and characterization. *Microbiology*. 148: 1305-1315.
- Dendouga. W.** Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite., Université Mentouri Constantine. mémoire de Magister .2006.
- Desmazeaud M. et Hermier J. (1978).** Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 8(4). 565-577.
- Devi M. K., Banu A. R., Gnanaprabhal G. R., Pradeep B. V. et Planiswamy M. (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.* 1(7). 1-6.
- Durand G. et Monson P. (1982).** Les enzymes. Production et utilisations industrielles. Bordas. Paris. P. 36-153.
- Fernandez-Lahore H. M., Fraile E. R. et Cascone O. (1998).** Acid protease recovery from a solid fermentation system. *J. Biotechnol.* 62: 83-93.
- Feuillet P. (2000).** Le grain de blé : composition et utilisation. 1st ed. Paris: INRA.
- Frazier W. C. (1967).** Food microbiology. Academic presse. London. P: 3-429.
- García-Gómez M. J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L. A. (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.* 112. 604-608.
- Germano S., Pandey A., Osaku C. A., Rocha S. N., Soccol C. R. (2003).** Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 32. 246-251.
- Granner D. K., Murray R. K., Rodwell V. W. (2008).** Biochimie de HARPER. 3e édition. De Boeck. Bruxelles. 49-51, 483.

Référence bibliographique

- Guo J. P. and Ma Y. (2008).** High level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 58. 301-308.
- Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. (2002).** Bacterial alkaline proteases. molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59. 15-32.
- Hajji M., Rebai A., Gharsallah N., Nasri M. (2008).** Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79. 915–923.
- Hames B. D., Hooper N. M et Houghton J. D. (2006).** L'essentiel en biochimie. Ed BERTI Editions, paris. p. 413.
- Hassan A. S. Okuofu C. A. & Balogun J. K. (2008).** The use of biological index of pollution (bip) in assessing quality of rural water sources in zaria. *SCIENCE WORLD JOURNAL*. 3. 105.
- Hassan E. G., Awadalkarim M. A. ET Mustafa A. M. (2012).** Effect of fermentation and particle size of wheat bran on the antinutritional factors and bread quality. *Pakistan Journal of Nutrition*. 7. pp. 5.
- Hernández M. S., Marilú R., Nelson P. G. et Renato P. R. (2006).** Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*. 73. 93-100.
- Hölker U. et Jürgen L. (2005).** Solid-state fermentation, are there any biotechnological advantages *Current Opinion in Microbiology*. 8. 301-306.
- Hölker U., Höfer M. and Lenz J. (2004).** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 64. 175-186.
- Javed M., Zahoor S., Shafaat S., Mehmooda I., Gul A., Rasheed H., Bukhari S. A. I., Aftab M.N et Ul-Haq. I. (2012).** Wheat bran as a brown gold. Nutritious value and its biotechnological applications. *African Journal of Microbiology Research*. 6. pp. 9.
- Jernejc K. et Cimerman A. (2001).** Morphological characteristics. extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus* species. *Food Technol. Biotechnol.* 39(4). 333-340.
- Kecha M., Benallaoua S., Touzel J. P., Bonaly B., Duchiron F. (2007).** Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archaeon pertaining to the genus *Pyrococcus* from an Algerian hydrothermal hot spring. *Extremophiles*. (11): 65–73.
- Kortt A. A., Burns J. E. Vaughan J.A. et Stewart D. J. (1994).** Purification of the extracellular acidic proteases of *Dichelobacter nodosus*. *Biochem. Mol. Biology Int.* 34(6). 1157-1166.
- Kresze G. B. (1991).** Proteases during purification. *Bioprocess-technol.* 12. 85-120.

Référence bibliographique

- Kudrya. V. A. Simonnenko. I. A. (1994).** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbial biotechnol.* 41. 505-509.
- Kumar S., Sharma N.S., Saharan M. R. and Singh R. (2005).** Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*. purification and characterization. *Process Biochemistry.* 40. 1701-1705.
- Larpent J.P. (1997).** Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire. Edition Lavoisier. ISBN : 2-7430-01550.
- Laxman R. S., Sonawane A. P., More S. V., Rao B. S., Rele M. V., Jogdand V. V., Deshpande V. V., Rao M. B. (2005).** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Proc. Biochem.* 40. 3152–3158.
- Manpreet S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S. and Banerjee U. C. (2005).** Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology.* 1 (2). 1-9.
- Marlett, J. A., McBurney M. I., et Slavin J. L. (2002).** Position of the American Dietetic Association: Health implications of dietary fiber. *J. Am. Diet. Assoc.*, 102:993–1000.
- McKevith B. (2004).** Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin.* 29. pp. 31.
- Merheb Carolina W., Cabral H., Gomes E. and Da-Silva R. (2007).** Partial characterization of protease from a thermophilic fungus. *Thermoascus aurantiacus*. and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry.* 104. 127-131.
- Miller J. D. (2002).** Enzymic hydrolysis of protein by various enzyme preparations. *J. Ferment. Technol.* 54. 872-884.
- Moodie P. (2001).** Traditional baking enzymes- proteases. *Enzyme Development Corporation.* 212. 736-1580.
- Moreira K. A., Cavalcanti M. T., Simoes Duarte H. Tambourgi E. B., Magalhaes E.H., Silva V. L., Figueiredo-Porto A.L. et Lima-Filho J. L. (2001).** Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. *Braz. J. Microbiol.* 32 (3): 1834-1841.
- Murthy P. S., Naidu M. M. (2010).** Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl. Sci. J.*, 8(2): 199-205.
- Neelakantan S., Nohanty A. K. and Kaushik J. K. (1999).** Production and use of microbial enzymes for dairy processing. *Current Sciences.* 77. 143-148.

Référence bibliographique

- Pandey A., Soccol C. R. and Mitchell D. (2000).** New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 35. 1153-1169.
- Paranthman R., Alagusundaram k. et Indhumathi J. (2009).** Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*. 5(3). 308-312.
- Pelmont J. (1995).** Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. P. 619-655.
- Pitt J. I. Hocking A. D. (2009).** Fungi and food spoilage. Springer. New York.
- Pomeranz Y. (1988).** Chemical composition of kernel structures. In: Wheat: chemistry and technology. 1st ed. pp. 97-158.
- Pylar E. J. (1988).** Baking Science and Technology. Chicago. IL: Siebel Publishing Company.
- Raimbault M. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. 1(3). 174-188.
- Ralet M. C., Thibault J. F., Della Valle G. (1990).** Influence of extrusion-cooking on the physic-chemical properties of wheat bran. *Journal of Cereal Science*. 11. 249-259.
- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. & Deshpande V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biology Rev.* 62(3). 597-635.
- Rashbehari T., Binita S. and Rintu B. (2003).** Purification and characterization of a protease from solid-state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*. 38. 1553-1558.
- Reginald T., Monod M. A., Faith Y. K. et Jatou-Ogay R. (1975).** The secreted protease of *Aspergillus* and their possible role in virulence. *Can. J. botany*. 73 (1). 1081-1086.
- Rhodes. D. I., Stone. B. A. (2002).** Proteins in walls of wheat aleurone cells. *Journal of Cereal Science*. 36. pp 18.
- Rouau X., Sadoudi A., Barron C., Abécassis J., Chaurand M., Lullien-Pellerin V., Mabilie F., Samson M. F. (2010).** Accès à des molécules d'intérêt par fractionnement par voie sèche. *Innovations Agronomiques* 19. 51-62.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. and Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 40. 2689-2694.

Référence bibliographique

- Sandro G. Ashok P., Clarice A. O., Saul N. R. and Carlos R. S. (2003).** Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 32. 246-251.
- 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. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 14. 765-794.
- Scriban. R. 1999.** Biotechnologie. 5eme édition technique et documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.
- Sekine H. (1972).** Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*. Some enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.*, 36 :207-216.
- Selvendran R. R., Ring S. G., O'Neill M. A., Dupont M .S. (1980).** Composition of cell wall material from wheat bran used in clinical feeding material. *Chemistry and Industry*. 22. 885-888.
- Singh A., Ghosh V. K., Ghosh P. (1994).** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters Appl. Microbiol.*, 18 : 177-180.
- Singh P. nee'Nigam et Pandey A. (2009).** Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. DOI 10.1007/978-1-4020-9942-7-10.
- Singhania R. R., Patel A. K., Soccol C. R. et Pandey A. (2009).** Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 44. 13-18.
- Singhania R. R., Patel A. K., Soccol C. R. et Pandey A. (2009).** Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 44. 13-18.
- Sumantha A., Larroche C., Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, 244 : 211–220.
- Sumantha A., Deepa1 P., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C. R. et Pandey A. (2006).** Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49(5). 843-851.
- Sumantha A., Larroche C. and Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases. A perspective. *Food Technology and Biotechnology*. 44(2). 211-220.
- Sumantha A., Sandhya C., Szakacs G. and Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 40. 2689-2694.

Référence bibliographique

- Tobe S., Takami T., Ikeda S., Horikoshi K. (1976).** Production of some enzymatic properties of alkaline protease of *Candida lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.* 40. 1087–1092.
- Trap C. Boreau P. (2000).** Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res.* 31. 461-471.
- Tunga R., Shrivastava B., Banerjee R. (2003).** Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Proc. Biochem.* 38. 1553-1558.
- Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H. & Kaneda M. (2001).** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.* 382. 1509-1513.
- Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A. & Quadeer M. A. (2003).** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology.* 2(1). 30-36.
- Urbanek H., Yirdaw G. (1984).** Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* 33(2). 131.
- Vishwanatha K. S., Rao A. G. A., Singh S. A. (2010)** Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC5341: optimization of process parameters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:129–138.
- Vishwanatha K. S., Appu Rao A. G. et Singh S. A. (2009).** Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114: 402-407.
- Wang L. et Yang S. T. (2007).** Solid-state fermentation and its applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. P. 465- 489.
- Wang Q., Wang X., Wang X., Ma H. (2008).** Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 43: 280-286.
- Wilkesman J. et Kurz L. (2009).** Protease Analysis by Zymography. A review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology.* 3. 175-184.
- Wu T. Y., Mohammad A. W., Jahim J. Md., Anuar N. (2006).** Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 1223–1229.
- Holker U., Lenz J. (2005).** Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages *Current Opinion in Microbiology* [en ligne]. Vol. 8.n°3. p. 301-306.
- Rahardjo Y. S. P., Tramper J., Rinzema A. (2006).** Modeling and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances* [en ligne]. Vol. 24. n°2. p. 161-179.

Annexe**Annexe n° 1 :*****Milieu de culture*****Gélose PDA**

Laver et couper en petits cubes 200g de pommes de terre non pelées, les mettre dans un litre d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant une heure. Ecraser, filtrer et compléter un litre.

Composition du milieu finale :

Extrait de pomme de terre	1000ml.
Glucose.....	20g.
Agar.....	20g.

Stériliser 30 minutes à 110°C (Larpen, 1997).

Gélose YPGA

La gélose YPGA est un milieu recommandé pour la culture des levures.

La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est

Extrait de levure	5g.
Peptone	10g.
Glucose.....	20g.
Agar	20g.

Stériliser 30 minutes à 110°C.

Lait gélosé

Le lait gélosé est un milieu utilisé pour la mise en évidence de l'activité protéolytique.

La composition chimique de ce milieu en g/L d'eau distillé est

Lait.....	10,5g
Agar.....	13,5g

Stériliser 30 minutes à 110°C.

Annexe n°2 :***Préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine***

La gamme-étalon est à partir d'une solution mère de tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100 µg/ml, comme l'indique le tableau suivant :

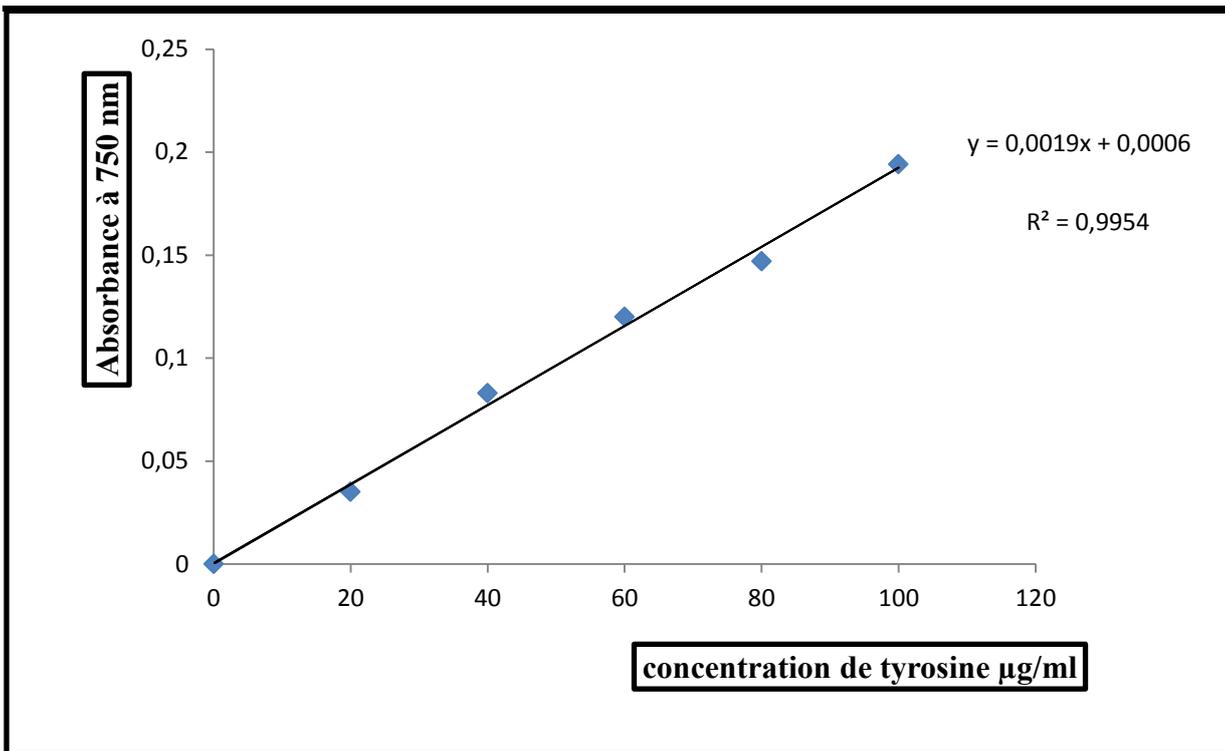
Tableau 10 : préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine .

Concentration en tyrosine (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de tyrosine (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
TCA (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Agitation et incubation pendant 10 min à température ambiante.

Folin-Ciocalteu dilué à 1/4 ^{ème} (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
---	------	------	------	------	------	------

Après une agitation au VORTEX, laisser reposer 30 min à température ambiante. L'absorbance lue à 750 nm permet de tracer le courbe étalon.



Lakba Hadjer
Soucha Hayet

Date de soutenance : 25 juin 2015

Thème : Production de protéases par des mycètes isolés de milieux sahariens.

Résumé

Ce travail s'articule autour de la production d'une protéase fongique, une enzyme d'intérêt industriel, à savoir : alimentation humaine et animale, industrie pharmaceutique et médicale et sur tout l'industrie des détergents.

Pour cela des échantillons des plantes et du sol ont été prélevés au niveau de plusieurs sites répartis entre les régions d'Ouargla et Biskra situés au Sud-Est de l'Algérie.

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 et YPGA, on a obtenu 43 souches dont 9 possèdent une activité protéasique (3 levures et 6 moisissures). Parmi ces dernières, une seule moisissure a été sélectionnée pour la fermentation selon le diamètre de la colonie et la zone de lyse mesurée sur milieu gélosé à base de lait.

L'identification présomptive basée sur l'étude macroscopique et microscopique a montré que cet isolat appartient au genre *Aspergillus*. Cette souche est cultivée en milieu solide ou un résidu agroalimentaire peu coûteux, le son de blé est utilisé comme substrat. La production de l'enzyme est estimée par le dosage de l'activité protéolytique. Les résultats obtenus ont révélé que la souche *Aspergillus sp*, a donné une excellente activité atteignant 11130 UI au bout du quatrième jour de fermentation. L'étude des optima du pH et de température d'incubation a montré que la protéase produite par *Aspergillus sp* a un pH optimum égal à 7 et une température optimale de 50°C.

Mots clés : *Aspergillus sp*, protéase, milieux extrêmes, fermentation, son de blé.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie, et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des frères Mentouri de Constantine.

Jury de soutenance :

Présidente du jury : Mme. MIHOUBI I.	(MC.UFM.Constantine).
Encadreur : Mr. KACEM CHAOUCHE N.	(Prof. UFM.Constantine).
Examinatrice : Mme. Youcef Ali M.	(Doc. UFM.Constantine).
Tutrice : Mlle TALHI I.	(Doc. UFM.Constantine).