



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 la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

Optimisation de production de protéase acide par

***l'Aspergillus niger* sur milieu solide**

Préparé par :

Le : 22 /09/2021

Chemmaa Lina Maria

Djaia Haifa Nesrine

Mazaache Hadjer

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Abdelaziz .W (M.C.B.-UFM Constantine).

Rapporteur : Mlle Maziani .M (M.C.B-UFM Constantine).

Examineurs : Mme Benkahoul .M (M.C.A- UFM Constantine).

***Année universitaire
2020- 2021***



Remerciements

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

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

Un très grand merci à notre encadreur Mme MEZIANI MERIEM pour sa gentillesse, ses précieux conseils, sa bienveillance et son soutien tout au long de la réalisation de notre mémoire.

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



Dédicace

Tout d'abord, nous remercions le DIEU, notre créateur de nos avoir donné les forces, la volonté et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

Je dédie ce travail

A mes très chers parents Salah et Malika, pour tous leur sacrifices,

Pour toute leur assistance et leur présence dans ma vie.

Que dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur, et longue vie et faire une sorte que jamais je ne vous déçoive.

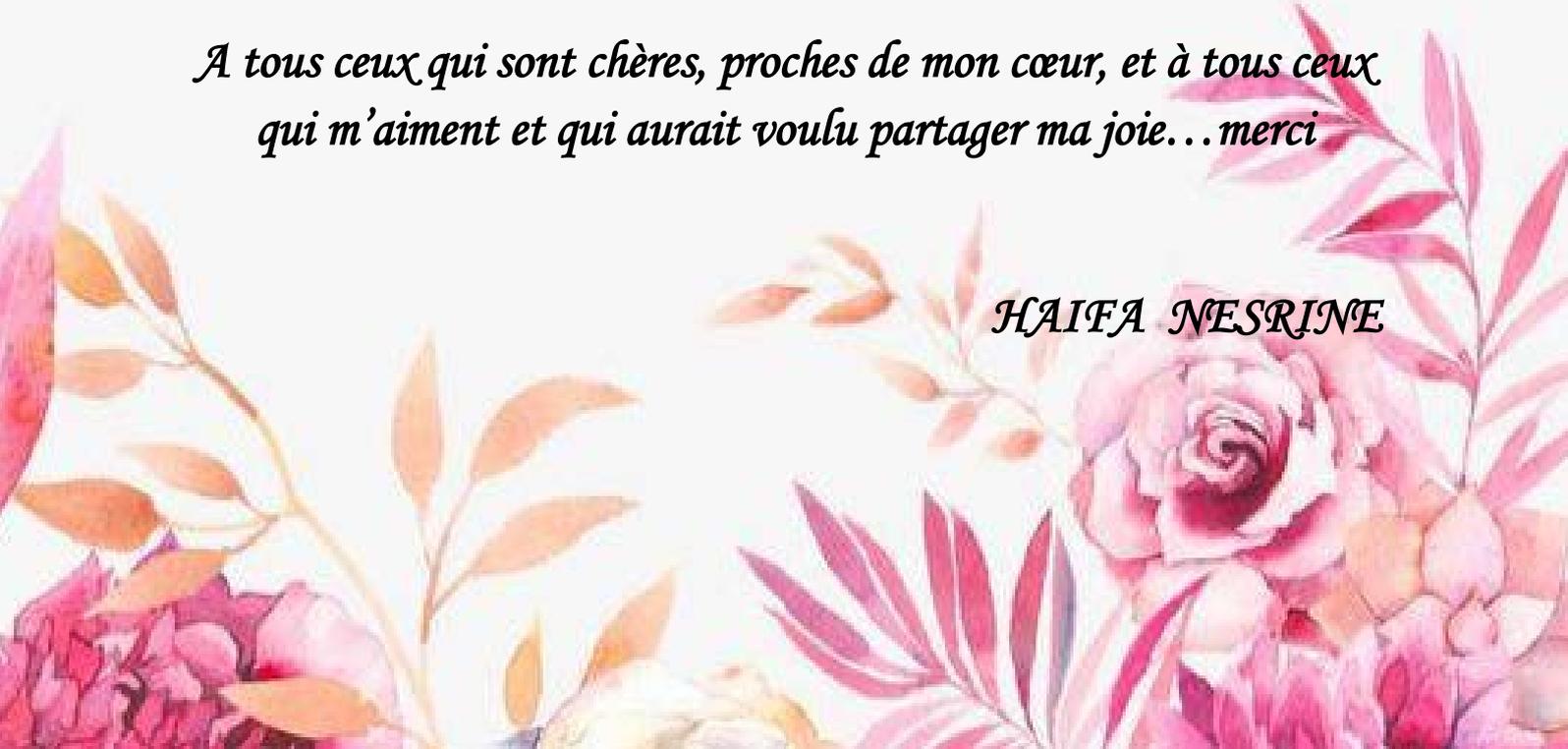
A ma chère tante GARMIYA

A ma belle sœur SALSABIL.

Sans oublier mon seul frère LAKHDARE.

A tous ceux qui sont chères, proches de mon cœur, et à tous ceux qui m'aiment et qui aurait voulu partager ma joie... merci

HAIFA NESRINE



Dédicaces

A ma très chère mère NORA

*Pour l'affection, la tendresse et l'amour dont elle m'a toujours entourée.
pour le sacrifice et le dévouement dont elle a toujours fait preuve.*

Pour l'encouragement sans limites.

*Aucun mot, aucune phrase ne peut exprimer mes sentiments profonds d'amour,
de respect et de reconnaissance envers ma très chère maman.*

Que ce modeste travail soit un début de mes récompenses envers toi.

*Puisse DIEUX, le tout puissant, te gardes, te couvrir de sa bonté et t'accordes
santé, longue vie et bonheur chère maman.*

A ma grand-mère chérie

*A celle qui illumine notre vie et la rend plus sereine et joyeuse, celle qui m'a
accompagné par ses prières et ses bénédictions.*

Puisse Allah te procurer bonheur, santé et longue vie.

A toute la famille BOURTAL

Mon oncle et mes tantes maternelles : Sali, Fayçal, Nadia et Wahida

Je vous remercie pour votre bienveillance et votre générosité.

*Je vous dédie ce modeste travail en témoignage de mon affection et ma
reconnaissance.*

A ma chère cousine CHIRAZ

*Je te remercie d'être toujours là à me soutenir, à veiller sur moi et à supporter mes
caprices. Que Dieux vous protège et vous accorde un brillant avenir avec une vie
pleine de joie, de bonheur et succès.*

Mes chères cousins et cousines Zizou, Iyed, Fadi, Habib, Sophie et Loulie

Qu'Allah vous garde et vous procure tout le bonheur que vous méritez.

A mes chères amies de l'enfance RAYEN et RANIA

Je dédie ce travail à mes amies qui me soutiennent de près et de loin.

Je vous remercie pour votre amour, votre bienveillance, et vos encouragements.

Je vous remercie d'être là pour le meilleur et pour le pire.

*Vous êtes pour moi une deuxième famille, et je m'estime bénie de vous avoir
connues.*

LINA MARIA



Dédicace

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

Je dédie ce travail

*À mes très chers parent's ma mère Aicha et mon père Lamri que
je chéris, et à qui le mérite revient pour tout l'amour et
l'aide qu'ils m'ont apporté.*

*À mes chers soeurs Dalal et Amira et mon cher frère Tedj eddine d'être
pour moi un exemple de courage et de générosité.*

À ma nièce de ma sœur Meriem.

À tous mes amis

À tous ceux que j'aime.



Hadjer

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre 01 : Les protéases	4
1. Généralité sur les enzymes.....	4
2. Définition de protéase	4
3. Origines des protéases.....	5
3.1. Protéases d'origine végétale.....	5
3.2. Protéases d'origines animales.....	6
3.3. Protéases d'origines microbiennes.....	6
4. Classification des protéases	7
4.1. Classification Selon le site d'action	7
4.1.1. Les exopeptidases.....	7
4.1.2. Les endopeptidase.....	8
4.2. Selon la localisation cellulaire.....	9
4.2.1. Les protéases intracellulaires	9
4.2.2. Les protéases extracellulaires	9
4.3. Selon leur pH optimal	10
4.4. Selon leur besoin en ATP.....	10
5. Mode d'action des protéases.....	10
6. Propriétés des protéases.....	11
7. Les applications industrielles des protéases	12
7.1. Industrie alimentaire.....	12
7.2. Utilisation médicale	13
7.3. Détergents.....	13
7.4. Autres applications.....	14
Chapitre 02 : <i>Aspergillus niger</i>	16
1. Généralités	16
2. Taxonomie.....	17
3. Morphologie.....	18

3.1. Morphologie macroscopique des colonies	18
3.2. Morphologie microscopique	19
4. Reproduction	20
5. Les enzymes produites par l' <i>Aspergillus niger</i>	20
6. Isolement d' <i>Aspergillus niger</i>	22
6.1. Substrats.....	22
6.2. Milieu.....	22
6.3. Culture.....	22
7. La Fermentation sur milieu solide	23
7.1. Définition.....	23
7.2. Avantages de la fermentation solide	24
7.3. Les inconvénients de la fermentation sur milieu solide.....	25
7.4. Substrats utilisés dans la fermentation sur milieu solide.....	25
7.5. Organismes utilisés dans la fermentation sur milieu solide.....	26
7.6. Applications de la fermentation à l'état solide.....	27
7.6.1. Application de la fermentation à l'état solide dans l'industrie alimentaire.....	27
7.6.2. Application de Fermentation à l'état solide en pharmacie et en chimie.....	27
7.6.3. Application de la fermentation à l'état solide en énergie et les domaines de la protection de l'environnement.....	28
1. Matériel	31
1.1 Matériel végétal	31
1.1.1 Le Son de blé	31
1.1.2 Matériel microbiologique.....	31
1.1.3. Milieux de culture utilisés	31
2. Préparation du matériel biologique:.....	31
2.1. Isolement	31
2.1.1. Prélèvement du sol.....	32
2.1.2. Préparation de la suspension du sol.....	32
2.1.3. Ensemencement des moisissures	32
2.1.4. Purification.....	33
2.1.5. Conservation des souches fongiques isolées	33
2.1.6. Identification.....	33
2.2. Méthodes de dosage.....	33
2.2.1. Mise en évidence de L'activité protéolytique	33
2.2.2. Mesure de l'activité protéolytique.....	34
2.2.3. Dosage des protéines.....	34

2.3. Méthode de fermentation.....	35
2.3.1. Milieu et conditions de culture	35
2.3.2. Préparation de l'inoculum :.....	35
2.4. Dénombrement des spores:.....	35
2.5. Conduit de fermentation :	36
2.6. Optimisation des paramètres de production de protéase acide par <i>Aspergillus niger</i> :	36
2.6.1. Choix du milieu minéral	36
2.6.2. PH initial du milieu minéral	36
2.6.3. Température d'incubation.....	36
2.6.4. Période d'incubation	36
2.6.5. Taux d'humidité du substrat.....	36
2.7. Extraction et purification de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> :	37
2.7.1. Extraction de la protéase d' <i>Aspergillus nige</i>	37
2.7.2. Purification de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i>	37
2.8. Etude de la stabilité de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i>	37
2.8.1. Stabilité thermique	37
2.8.2 Stabilité vis-à-vis du pH	37
Résultats et discussions	39
1. Optimisation des paramètres de production de protéase acide par <i>Aspergillus niger</i> :	40
1.1. Choix du milieu minéral	40
1.2. Influence du pH du milieu minéral	40
1.3. Effet de la température d'incubation.....	43
1.4. Effet du temps d'incubation	44
1.5. Taux d'humidité du substrat.....	46
2. Etude de la stabilité	47
2.1. Stabilité thermique	47
2.2. Stabilité vis-à-vis du pH	48
CONCLUSION.....	51
Références bibliographiques.....	53

Résumé

Les protéases, également appelées protéinases ou enzymes protéolytiques, appartiennent à un groupe d'hydrolases. Elles peuvent être appliquées dans de nombreux domaines industriels. Les protéases acides sont les plus connues produites par *Aspergillus niger*, l'espèce fongique la plus répandue en industrie capable de synthétiser une multitude de métabolites d'intérêt économique majeur. La fermentation en milieu solide (FMS) est la méthode la plus efficace pour la production de protéases.

Le but ultime de cette étude est d'optimiser la production des protéases par *Aspergillus niger* isolé selon le procédé de la fermentation solide à base des résidus agroalimentaire (son de blé) comme substrat solide, ceci est dans le but de diminuer le coût de production de ces enzymes. Aussi, ces substrats sont riches en nutriments, a été optimisée de façon à obtenir la meilleure activité protéolytique, Un essai de purification et une caractérisation biochimique de l'enzyme ont été également effectués.

Au vu des résultats des études précédentes, montrent que la meilleure production de cette enzyme (169.33 µg/h/ml) a été obtenue sur milieu à base de son de blé, humidifié à un taux de 39,21% par une solution minérale *Czapek-Dox* à pH 4 incubé à 30°C pendant 72 heures. Il présente une stabilité dans la gamme du pH 3,0-5,0 à 4°C pendant 24 heures dans le tampon citrate de sodium (0,1M) et une stabilité thermique jusqu'à 50°C pendant 1 heure.

Mots clés: *Aspergillus niger*, Isolement, Optimisation, fermentation sur milieu solide (FMS), Protéase acide, activité protéolytique

Abstract

Proteases, also called proteinases or proteolytic enzymes, belong to a group of hydrolases. They can be applied in many industrial fields. Acid proteases are the best known produced by *Aspergillus niger*, the most popular fungal species in industry capable of synthesizing a multitude of metabolites of major economic interest. Solid state fermentation (SSF) is the most efficient method for the production of proteases.

The ultimate goal of this study is to optimize the production of proteases by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation with agri-food residues (wheat bran) as a solid substrate, in order to decrease the production cost of these enzymes. Also, these substrates are rich in nutrients, was optimized in order to obtain the best proteolytic activity, a purification test and a biochemical characterization of the enzyme were also performed.

In view of the results of the previous studies, show that the best production of this enzyme (169.33 µg/h/ml) was obtained on wheat bran-based medium, moistened to a rate of 39.21% by a *Czapek-Dox* mineral solution at pH 4 incubated at 30°C for 72 hours. It exhibits stability in the pH 3.0-5.0 range at 4°C for 24 hours in sodium citrate buffer (0.1M) and thermal stability up to 50°C for 1 hour.

Key words: *Aspergillus niger*, Isolation, Optimization, solid-state fermentation (SSF), acid protease, proteolytic activity

ملخص

تنتمي البروتياز ، التي تسمى أيضاً بروتينات أو إنزيمات محللة للبروتين ، إلى مجموعة من الإنزيمات المائية. يمكن تطبيقها في العديد من المجالات الصناعية. البروتياز الحمضي هو أفضل الأنواع المعروفة التي تنتجه *Aspergillus niger* ، وهي الأنواع الفطرية الأكثر استجابة في الصناعة والقادرة على تخليق العديد من المستقلبات ذات الأهمية الاقتصادية الرئيسية ، يعتبر التخمير على الوسط الصلب أنجح طريقة لإنتاج البروتياز.

الهدف النهائي من هذه الدراسة هو تحسين إنتاج البروتياز بواسطة عزلات *Aspergillus niger* وفقاً لعملية التخمير الصلبة بناءً على مخلفات الأغذية الزراعية (نخالة القمح) كركيزة صلبة ، وذلك لتقليل تكلفة الإنتاج. الإنزيمات. أيضا ، هذه الركائز غنية بالعناصر الغذائية ، وقد تم تحسينها للحصول على أفضل نشاط تحلل للبروتين ، كما تم إجراء اختبار تنقية وتوصيف كيميائي حيوي للإنزيم.

في ضوء نتائج الدراسات السابقة، تبين أنه تم الحصول على أفضل إنتاج لهذا الإنزيم (169.33 ميكروغرام / ساعة / مل) على وسط يعتمد على نخالة القمح ، مبلل بمعدل 39.21٪ بمحلول المعدني *Czapek-Dox* عند الأس الهيدروجيني 4 حضنت عند 30 درجة مئوية لمدة 72 ساعة. يظهر الاستقرار في نطاق الأس الهيدروجيني 3.0-5.0 عند 4 درجات مئوية لمدة 24 ساعة في محلول سترات الصوديوم (0.1 متر) والاستقرار الحراري حتى 50 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus niger*، العزل والتحسين، الزراعة في الأوساط الصلبة ، حمض الأنزيم البروتيني، نشاط تحلل البروتين.

Liste des abréviations

μ: Micron

aw: Activity of water

AP: Activité Protéolytique

ATP: Adenosine très phosphate

BBC :Bleu Brillant de Coomassie

BSA: Bovin Serum Albumin

CYA: Czapek Yeast Extract Agar

HCl: Acide chlorhydrique

GRAS: Generally Regarded As Safe

FDA: Food and Drug Administration (USA)

k Da: Kilo Dalton

NaOH: Hydroxyde de sodiums

OTA: Ochratoxine A

p/v: poids/volume

PDA: Potato Dextrose Agar

pH: potentiel d'Hydrogène

°C : degré Celsius

SSF: Solid-State Fermentation

T°: Température

TCA: Acide trichloracétique

U:Unité enzymatique

I.U.B: International Union of Biochemistry Bergmeyer

h : heure.

IUBMB : Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire.

M2: Milieu aux extraits de malt et de levures.

M2S5: Milieu salé aux extraits de malt et de levures.

µm : Micromolarité

nm : nanomètre

Arg : Arginine

His: Histidine

Lys : Lysine

Trp: Tryptophan

Tyr: Tyrosine

Met: Méthionine.

Phe : Phenylalanine.

sp. : Espèce.

M-9: *Medium*

9 MCA: *Milk-Clotting Activity*

SA: sulfat d'amnium

SM : solution mènirale

CD: Czapek-Dox

rpm: rotation par minute

FML : Fermentation sur Milieu Liquide

FMS : Fermentation en Milieu Solide.

SDS · sodium dodecyl sulfate

AC : Activité Coagulante.

AP : Anneau de Protéolyse

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Spécificité du substrat de la protéase dans laquelle P1 à P3 représentent les chaînes latérales d'acides aminés du site de clivage de la liaison peptidique (ligne hachée) à l'extrémité N-terminale de la protéine ou du peptide.	05
02	Structure du domaine mature. Représentation structurale de la cystéine protéase avec le domaine mature (orange) montrant les résidus du site actif ; Cys, His, et Asn (bâton).	10
03	Applications des enzymes.	13
04	<i>Aspergillus niger</i> sur milieu M2(a) et <i>Aspergillus niger</i> sur milieu M2S5 (b).	19
05	Tête conidienne d' <i>A. niger</i> (x400) (a) et Conidiophore (x100) (b).	20
06	Dilution en série de l'échantillon dans une solution physiologique : agitation au vortex.	33
07	Influence de la composition des milieux salins sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> . (incubation à 30°C). (SA: sulfat d'amnium, SM: solution minérale, CD: Czapek-Dox.) .	41
08	Effet du pH initial du milieu minéral sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> (solution Czapek-Dox, 30°C).	42
09	Effet du pH sur l'activité de l'enzyme.	43
10	Effet du pH sur la production de protéase par <i>Aspergillus niger</i> .	43
11	L'effet de la température d'incubation sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> (solution Czapek-Dox, pH= 4) .	44
12	Influence de la température d'incubation sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> .	45
13	Influence du temps d'incubation sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> (solution Czapek-Dox, 30°C, pH4).	46
14	Influence du temps d'incubation sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> (solution Czapek-Dox, 30°C, pH4, TH=39,21%, 106 spores/ml) .	46
15	Effet du taux d'humidité initial sur la production de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> (solution Czapek-Dox, 30°C, pH4).	48
16	Effet de la température sur l'activité protéolytique de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> .	49
17	: L'influence du pH sur l'activité protéolytique de la protéase d' <i>Aspergillus niger</i> .	50

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	La position systématique d' <i>Aspergillus niger</i> est résumée comme suivant.	18
02	Production des enzymes par <i>Aspergillus niger</i> .	22
03	Principaux groupes de micro-organismes impliqués dans les processus de SSF.	27
04	Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide.	30
05	Les milieux de cultures utilisés pour l' <i>Aspergillus niger</i> .	32



Introduction

Introduction

Introduction

Les protéases, également appelées protéinases ou enzymes protéolytiques, appartiennent à un groupe d'hydrolases. Elles agissent comme catalyseur dans l'hydrolyse des protéines en polypeptides et oligopeptides en acides aminés [1,3]. Les protéases occupent une position centrale dans le commerce, représentant environ 60 % de l'ensemble du marché industriel des enzymes. Elles sont largement utilisées dans les industries des détergents, du cuir, de la pharmacie et de l'alimentation [2]. Les applications alimentaires des protéases incluent leur utilisation dans la fabrication du fromage, la clarification de la bière, la production d'hydrolysats de protéines, les industries pharmaceutiques et cosmétiques [3] En outre, l'utilisation des protéases dans les systèmes de traitement des eaux usées pour améliorer la déshydratation des boues [1].

Les protéases peuvent être produites à partir de différentes sources, telles que les champignons, les plantes, les animaux et les microorganismes [4], Les protéases microbiennes sont plus attrayantes que d'autres sources en raison de sa simplicité des méthodes de production et la manipulation génétique, de sa vitesse de croissance rapide et de sa grande diversité biochimique [5].

Cependant les sources fongiques particulièrement les champignons filamenteux sont les plus exploités pour la production d'enzymes industrielles en raison de leur capacité à se développer sur un substrat solide et à produire une large gamme d'enzymes extracellulaires. Parmi les nombreux avantages offerts par la production d'enzymes par des champignons, citons le faible coût des matières premières associé à une productivité élevée, une production plus rapide et la facilité avec laquelle les enzymes peuvent être modifiées. De plus, les enzymes, étant normalement extracellulaires, sont facilement récupérables dans les milieux [6]. *Aspergillus niger* est un organisme de choix, en raison de son caractère omniprésent, une exigence nutritionnelle non fastidieuse, son adaptation aux cultures à base des substrats solides peu coûteux, facilitant ainsi l'extraction et la récupération des protéases extracellulaires à partir des milieux de fermentation avec des rendements rentables tout en réduisant les coûts d'exploitation [7].

Pour la production de protéases à partir d'*Aspergillus niger*, des techniques de fermentation à l'état solide et immergée sont utilisées [8]. Cependant, la fermentation à l'état solide est une méthode préférée pour la production de protéases acides par *Aspergillus niger*. La caractéristique essentielle de la fermentation sur substrat solide (SSF) est la croissance de micro-organismes sur un substrat majoritairement insoluble sans phase liquide libre. Les substrats utilisés dans (SSF) sont généralement des tourteaux dégraissés et d'autres sous-produits agricoles [9].

Les conditions environnementales et nutritionnelles exercent une influence considérable sur la croissance et la production des protéases. L'optimisation de ces paramètres du procédé pour la fermentation à l'état solide (SSF) est réalisée pour cibler cette protéase acide. Les paramètres les plus importantes sont les sources de carbone et d'azote, le temps d'incubation, la température et le pH [10]. L'utilisation de déchets comme substrat dans la production d'enzymes industrielles a rendu le processus de production économiquement réalisable [11].

Introduction

Le présent travail a porté sur l'optimisation des paramètres de production, la purification et la caractérisation des protéases produites par une souche fongique, *Aspergillus niger*. Ceci pourrait ouvrir la voie à une production à l'échelle industrielle de l'enzyme, afin de répondre aux besoins futurs.



Chapitre 01

Les protéases



Chapitre 01 : Les protéases

1. Généralité sur les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique. Les catalyseurs augmentent la vitesse d'une réaction lente ou imperceptible sans subir aucune transformation en ce qui concerne leurs structures initiales. Le développement récent du concept des catalyseurs au dix-neuvième centenaire a évolué pas à pas avec la découverte de puissants catalyseurs de source biologique. Ceux-ci ont été appelés ENZYMES et ensuite identifiés comme protéines [12].

Les enzymes sont des protéines fabriquées par l'organisme [13]. Elles sont constituées des milliers d'acides aminés liés en une chaîne linéaire. Ces acides aminés diffèrent dans leur nature chimique, sont liés entre eux par des liens covalents appelés liens peptidiques. L'enzyme permet l'activation ou l'accélération de réactions chimiques. Il en existerait environ 15.000 protéines chez l'homme [12].

Ces enzymes jouent un rôle dans toutes les fonctions, comme la digestion avec des enzymes intervenant dès le stade buccal comme les amylases [13].

2. Définition de protéase

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) sont des enzymes qui hydrolysent la liaison peptidique établie entre deux acides aminés d'une chaîne polypeptidique (peptides et protéines) [14].

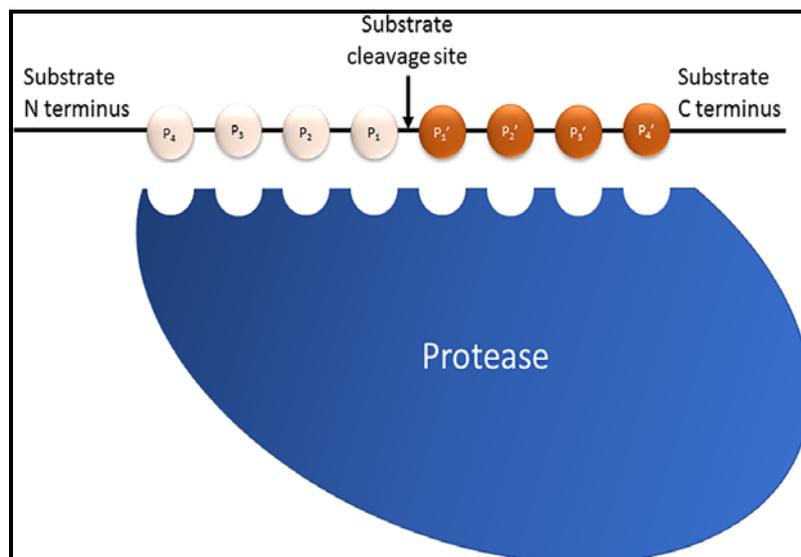


Figure 01: Spécificité du substrat de la protéase dans laquelle P1 à P3 représentent les chaînes latérales d'acides aminés du site de clivage de la liaison peptidique (ligne hachée) à l'extrémité N-terminale de la protéine ou du peptide [15].

Leurs synthèse s'effectue extracellulairement comme intracellulairement [16]. Elles sont normalement générées comme des zymogènes inactifs (pro-enzymes), ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux [17]. Et selon les exigences, ces enzymes seront converties en forme active par une protéolyse limitée [18, 19, 20,21]. Elles ont plusieurs fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulatrices plus spécifiques [22]. Les protéases représentent la seule classe des enzymes qui occupe une place importante dans les différentes applications industrielle, médical, biotechnologique, et dans les domaines de recherche [23 ,24]. Elles ont été utilisées pour la première fois dans l'industrie alimentaire comme des agents de coagulation pour la production de fromage [25]. Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la différenciation et dans la croissance cellulaire. 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 [26 ,24]:

- La susceptibilité à la manipulation génétique.
- La grande diversité biochimique des produits obtenus [27].

Les microorganismes élaborent une large gamme des protéases, qui peuvent être intra et/ou extracellulaires [26]:

- Les premières sont importantes dans les différents processus cellulaires et métaboliques, tel que la sporulation, la différenciation, la maturation des enzymes et la maintenance du réserve cellulaire en protéines.
- Tandis que les autres sont essentielles pour l'hydrolyse des sources nutritionnelles protéiques et pour inhiber la cellule d'absorber ou d'utiliser des produits hydrolytiques

3. Origines des protéases

Les enzymes protéolytiques sont produites dans tous les êtres vivant tels que les végétaux , les animaux et les microorganismes [16].

3.1. Protéases d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale ont été identifiées et étudiées à partir de plusieurs familles de plantes, telles que *les Asteraceae*, *les Caricaceae*, *les Moraceae*, *les Asclepiadaceae*, *les Apocynaceae* et *les Euphorbiaceae* [28].

Le groupe des protéases le plus connus se retrouve dans les fruits des broméliacées [29,30].

- La bromélaïne et de l'ananaïne est préparé à partir des tiges et du jus d'ananas (*Ananas comosus*) [31].
- La ficine issue de figuiers : *Ficus glabrata* [32,33].
- La papaine (active entre PH 5 et 9) est extraite du latex des fruits de la papaye carica (*Carica papaya*) [34].

Leurs productions à partir de sources végétales est un processus chronophage. D'autant plus que la concentration des protéases dans les tissus est généralement basse [14].

Les enzymes protéolytiques extraites des plantes peuvent être actives dans un large intervalle de température et du pH parce que sont très attractives [35]. Les protéases végétales sont impliquées dans de différents aspects de la physiologie et du développement des plantes [36].

L'utilisation de plantes comme une source de protéases est dépend de plusieurs facteurs tels que la disponibilité des terres pour la culture et l'adéquation des conditions climatiques pour la croissance. En outre, la production de protéases de plantes est un processus de longue haleine [37].

Les extraits de plantes ayant une activité protéolytique élevée servaient dans la médecine Traditionnelle depuis longtemps [38], de même que dans certains procédés industriels où certaines protéases végétales sont utilisées bien avant que soient connues leur nature et leurs propriétés. Certains de ces enzymes sont actuellement utilisés dans l'industrie alimentaire et le domaine de la brasserie et des boissons [39]. Des kératinases se sont substituées à des produits chimiques toxiques pour l'épilation et le confitage des peaux dans l'industrie du cuir [40]. Le rôle des activités pharmacologiques des protéases des plantes a également été souligné chez les mammifères dans la cicatrisation des plaies, l'immune modulation, les conditions digestives et des altérations néoplasiques [41].

3.2. Protéases d'origines animales

Les protéases les plus familières d'origine animale sont la chymotrypsine, la trypsine pancréatique, l'élastase, la pepsine, la rennine. Ceux-ci sont préparés sous forme pure en grande quantités [37].

- **La trypsine** est la principale enzyme digestive de l'intestin responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires.
- **La chymotrypsine** est préparée à partir d'extraits pancréatiques d'animaux : sa préparation à l'état pur est coûteuse et elle est utilisée principalement dans les applications de diagnostiques et d'analyses.
- **La pepsine** est une protéase acide que l'on trouve dans l'estomac de presque tous les vertébrés.
- **La présure** est une protéase similaire à la pepsine. Elle est biosynthétisée sous forme de précurseur inactif dans l'estomac de beaucoup de mammifères. Elle est convertie en rennine active par l'action de la pepsine. Elle est largement utilisée dans l'industrie laitière pour produire le caillé stable avec une bonne saveur.

Mais, la production des ces enzymes dépend de la disponibilité de bétail, qui est gouverné par la politique et les bris d'agriculture [37].

3.3. Protéases d'origines microbiennes

Les micro-organismes constituent une excellente source d'enzymes en raison de leur grande diversité biochimique et leur sensibilité à la manipulation génétique. Les protéases microbiennes représentent les 2/3 de la production commerciale de protéases. La communauté microbienne est privilégiée par rapport aux animaux et aux plantes pour la production de protéases à grande échelle car ils possèdent presque toutes les caractéristiques souhaitées pour leurs applications biotechnologiques : croissance rapide et la simplicité de leur cycle de vie pour la génération de nouvelles enzymes recombinantes avec des propriétés modifiées [37].

- **Les protéases alcalines:** sont le groupe majeur des protéases produites par les bactéries, les champignons, les levures et les actinomycètes [37].
- **Protéases fongiques:** on leur porte un intérêt croissant en raison de la forte diversité et spécificité de substrat et de leur stabilité dans des conditions extrêmes. Elles présentent l'avantage d'être purifiées du mycélium par simple filtration. Les protéases fongiques peuvent être produites par processus de fermentation à l'état solide. Les protéases fongiques sont également utilisées en permettant de modifier les protéines alimentaires [37].
- **Protéases alcalines bactériennes:** elles ont une grande importance commerciale dans les industries de blanchisserie, alimentaires, du cuir et de la soie en raison de leur forte production et de leur forte activité à pH alcalin (pH 8 à pH 12), avec une température optimale entre 50°C et 70°C. Ces propriétés expliquent leur utilisation dans l'industrie des détergents [37].

Les protéases d'origines microbiennes jouent un rôle très important dans l'industrie pharmaceutique, l'industrie agricole, les détergents et du cuir [14].

4. Classification des protéases

D'après le comité de nomenclature de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire ou (**IUBMB**), les protéases appartiennent dans le sous-groupe 4 du groupe 3 (hydrolases) qui constituent une grande famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans d'autres protéines [42].

Les protéases peuvent être classées selon plusieurs critères tels que la nature de résidu impliqué dans le site actif, la localisation cellulaire, le mode d'attaque de la chaîne, le pH d'activité et leur besoin en ATP [43].

4.1. Classification Selon le site d'action

Selon leur site d'action, les protéases peuvent être classées en deux catégories [44]:

- **Les endopeptidases** (qui clivent les régions internes des chaînes peptidiques)
- **Les exopeptidases** (qui agissent au niveau ou à proximité des extrémités peptidiques)

4.1.1. Les exopeptidases

Les exopeptidases (ou exoprotéases) sont des enzymes qui agissent uniquement au niveau de la liaison peptidique terminale (dernière) ou de l'avant-dernière d'un polypeptide ou d'une protéine, libérant un seul résidu d'acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide [45].

Les exopeptidases peuvent être classées en deux groupes en distinguant [44] :

- **Les amino-peptidases** clivant la liaison peptidique N-terminale
- **Les carboxypeptidase** clivant la liaison peptidique C-terminale

4.1.2. Les endopeptidase

Les endopeptidase sont des Enzyme qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques internes d'un polypeptide ou d'une protéine [45]. Et les principales enzymes dégradant les protéines extracellulaires [43], Ces enzymes sont également très chimio, régio et énantiosélectives. Elles sont actives dans des conditions de réaction douces (pH 6-8) et sont des biocatalyseurs facilement manipulables qui ne nécessitent pas la présence de cofacteurs [46].

Les endopeptidases sont classées en quatre sous-groupes en fonction de leur mécanisme de clivage hydrolytique et de leur site actif sont : thréonine endopeptidase, l'aspartate endopeptidase, la métalloprotéinase, la sérine peptidase et la cystéine endopeptidase [43,44]

1- Protéases à sérine

Les protéases à sérine sont caractérisées par la présence d'un groupe sérine dans leur site actif. Elles sont généralement actives à des pH neutres et alcalins, avec des optima à pH 7-11 et une faible masse moléculaire [43], cette enzyme joue un rôle majeur dans la protéolyse extracellulaire et dans l'homéostasie du système vasculaire, notamment dans la coagulation, la fibrinolyse et le remodelage tissulaire. Dans le sang, ces protéases à sérine circulent sous formes inactives appelées zymogènes, qui, une fois activées, sont rapidement et irréversiblement inhibées par des inhibiteurs circulants, appelés serpins [47].

2-Métalloprotéases

Les métalloprotéases ou Les métalloprotéinases sont les plus diversifiées des types catalytiques de protéases. Elles se caractérisent par la présence d'un ion métallique dans leur site active le plus souvent le Zn^{2+} (zinc) nécessaire à leur activité [43].

Ces enzymes appelées les protéases neutres, ayant un pH optimum se situant autour de 7,0. Certaines métallo-protéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10 [48].

3. Protéases cystéines

C'est enzymes protéolytique comme tous les enzymes hydrolysent la liaisons peptidique reliant deux acide aminée d'une protéine [49], le site actif de cette enzyme est formé de trois acide amine de type cystéine-histidine-Asparagine, en général les cystéines protéases ne sont actives unique en présence d'agents réducteurs tels que le HCN ou la cystéine. La papaïne est la protéase à cystéine la plus connue [43 ,49].

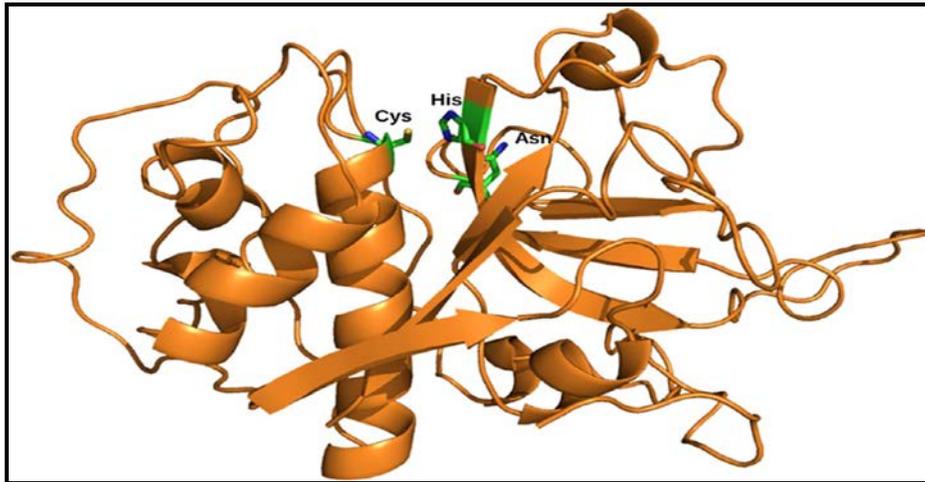


Figure02:Structure du domaine mature. Représentation structurelle de la cystéine protéase avec le domaine mature (orange) montrant les résidus du site actif ; Cys, His, et Asn (bâton) [49].

4. Protéases acides aspartiques

Les protéases aspartiques ou protéases acides, sont des enzymes protéolytiques caractérisées par la présence de deux acides aspartiques qui constituent la site actif de l'enzyme) [43], les groupes carboxylates de ces deux résidus d'acide aspartique participent aux transferts de protons d'une molécule d'eau qui agit comme nucléophile, pour attaquer la liaison peptidique du peptide ou de la protéine à cliver [43,65].

La majorité de ces enzymes ont à une activité maximale à des faibles pH (3 à 5) Elles ont été regroupées en trois familles, à savoir, la pepsine, retro-pepsine, et les enzymes de para-rétrovirus qui est déterminée par la et position l'orientation de tous les résidus à proximité du site actif [42].

4.2. Selon la localisation cellulaire

Selon leur localisation dans la cellule, les protéases sont divisées en deux groupes sont les protéases intracellulaires et extracellulaires [43] :

4.2.1. Les protéases intracellulaires

Ces protéases présentes chez les animaux, les plantes et les micro-organismes, et jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires physiologiques et pathologiques tels que le catabolisme des protéines, ce type de protéases est moins intéressant à l'utilisation industrielle car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction [43, 37].

4.2.2. Les protéases extracellulaires

Représentât la super famille complexe et hétérogène d'enzymes. Elles comprennent les métalloprotéinases, les protéases à sérine et les protéases à cystéine [44] .Ces enzyme catalysent l'hydrolyse des protéines en peptides et acides aminés plus petits pour une absorption ultérieure dans les cellules [43].

Elles sont plus intéressantes pour utilisation en industrie car ne nécessitent pas d'étapes de lyse cellulaire pour en faire l'extraction d'enzymes [37].

4.3. Selon leur pH optimal

En fonction de la gamme de pH dans laquelle elles ont une activité plus élevée on distingue : les protéases acides: pH optimal inférieur à, les protéases alcalines: pH optimal supérieur à 7.0 et les protéases neutres: pH optimal 7 [43,50].

Les protéases acides : sont les plus performantes et efficaces à un pH compris entre 2,0 et 5,0 et sont principalement produites par des champignons [43,50].

Les protéases neutres: sont principalement d'origine végétale avec une activité optimale à un pH compris entre 8 et au-dessus [43,50], jouent un rôle important dans l'industrie alimentaire car elles possèdent une fonction spécifique à hydrolyser des liaisons d'acides aminés hydrophobes réduisant ainsi l'amertume des hydrolysats de protéines alimentaires [51].

Les protéases alcalines: sont principalement produites à partir de les micro-organismes avec une activité optimale entre (pH 8,0 à 13,0), jouent un rôle important dans plusieurs industries, par exemple les détergents, le tannage, la photographie, etc. [50,43].

4.4. Selon leur besoin en ATP

Il existe d'autres protéases qui ne peuvent être classées Selon leur besoin ou non d'ATP pour fonctionner, ce groupe de protéases comprend celles composées de plusieurs sous-unités contenant des domaines d'ATP ase et des domaines protéolytiques [52,44].

5. Mode d'action des protéases

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 des étapes [17] :

1. 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) proton par un proton cédé d'un résidu enzymatique.
2. 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'H₂O)

6. Propriétés des protéases

Les protéases constituent un groupe très large et complexe d'enzymes qui diffèrent entre elles par leurs propriétés tels que : le profil de la stabilité, la spécificité du substrat, le site actif, le mécanisme catalytique, les optimum du pH et de température [53 ,54]

La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide Aminé et d'autres groupes fonctionnels (aliphatiques, aromatiques ou la présence de sulfure) autour de la liaison à hydrolyser [53 ,19].

Ces enzymes sont très importantes, elles contrôlent les réactions protéolytiques, et aussi régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tels que la décomposition glucides et des lipides [19].

Les protéases sont capables de modifier les propriétés biologiques des chaînes Polypeptidiques suite à la coupure des liaisons peptidiques (activation, inactivation ou une Protéolyse non spécifique durant la dégradation) [19].

Les protéases peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé plusieurs mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique. Cette régulation peut être effectuée à n'importe qu'elle étape de l'expression des gènes (La transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnels, l'interaction avec les inhibiteurs et d'autres protéines)[19].

Les protéases se distinguent par certaines de leurs propriétés [14]:

- certaines peuvent être des complexes protéiques énormes à plusieurs domaines (exemples : la tripeptidyl peptidase I et le protéasome)
- à l'inverse, certaines protéases sont très peu spécifiques (exemples : le protéasome les cathepsines, la plupart des exopeptidases)
- la spécificité des protéases peut être hautement sélective (exemples : les protéases de la cascade de coagulation de sang qui activent la protéine qui suit dans la cascade ou les caspases et la granzyme B - hydrolyse après Asp.)
- certaines sont protéines petites de tailles (20 à 30 kDa) et composées essentiellement du domaine catalytique seul (exemple : les cathepsines à cystéine.

7. Les applications industrielles des protéases

La demande mondiale d'enzymes, pour une large variété d'applications, est importante. Les protéases ont des applications étendues dans l'alimentation, les détergents, le cuir et l'industrie pharmaceutique. En outre, elles interviennent également dans la gestion des déchets issus des activités domestiques et industrielles [55]

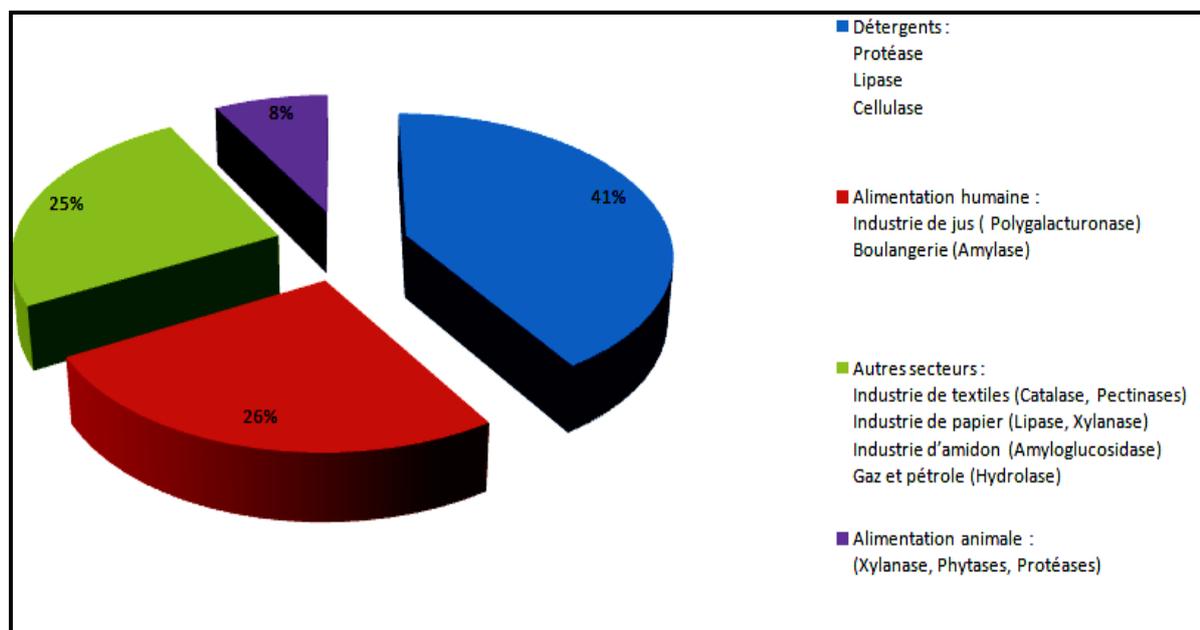


Figure 3: Applications des enzymes [55]

7.1. Industrie alimentaire

Les protéases sont parmi les trois plus grands groupes des enzymes industrielles (hydrolases), comptent pour environ 60-65% des ventes totales dans le monde entier des enzymes en raison de leur valeur commerciale et ont de multiples applications dans divers secteurs industriels [56].

Dans l'industrie alimentaire, les protéases sont efficacement impliquées dans la modification des propriétés des protéines alimentaires pour améliorer leur valeur nutritionnelle, leur solubilité, leur digestibilité, leur saveur, leur appétence et la minimisation des allergènes composés. De plus, leur base fonctionnelle, ils sont également utilisés pour modifier des propriétés fonctionnelles, telles que la coagulation, l'émulsification, le moussage, la force du gel, la liaison grasse, etc. de protéines alimentaires [57,58].

- **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 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 [42].

- **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 [42].

- **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, c'est la principale l'étape dans la production fromagère [59,53]. Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes tel que *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, et autres espèces du genre *Mucor* ont également été utilisées en industrie laitière [60].

7.2. Utilisation médicale

Divers processus métaboliques tels que la coagulation du sang, la fibrinolyse, l'activation du complément, la phagocytose et le contrôle de la pression sanguine sont régulés par les protéases pour développer des produits d'importance médicale[61] :

- La brinase, une protéase acide plasmine-like, hydrolyse la fibrine et le fibrinogène. Elle est appliquée sur des patients en hémodialyse chronique avec des canules artériocoagulés.
- Les protéases d'*Aspergillus* s'appliquent pour soulager les troubles digestives gastro-intestinaux tels que la dyspepsie
- La collagénase, qui hydrolyse le collagène natif, a été utilisée pour le débridement des ulcères cutanés et les brûlures, trouve également une application dans le traitement des cellules pathologiques des disques intervertébraux.
- La protéase alcaline de *Bacillus sp.* CK 11-4 a une activité fibrinolytique appliquée comme un agent thrombolytique.
- La protéase neutre "dispase" (amino-peptidase) est une enzyme produite par *Bacilles polymyxa*, exerce une activité protéolytique douce, ce qui la fait très utile pour l'isolement de cellules primaires et secondaires (sub-culture), car elle maintient l'intégrité des membranes cellulaires [26,53].

7.3. Détergents

Les divers produits de l'industrie des détergents contenant des protéases comme un composant ou ingrédient essentiel dans plusieurs produits tels que: les produits de nettoyage pour usage industriel, les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaire sont et dans les produits utilisés pour le nettoyage du linge domestique [42 ,62].

Une protéase détergente idéal doit avoir une large spécificité de substrat et l'activité et la stabilité à des pH et à des températures élevés et en présence des agents oxydants additionnés [42].

7.4. Autres applications

Depuis l'Antiquité, les protéases ont été incluses dans la préparation de sauces et d'autres produits à base de soja qui aident à la dégradation des grains à haute teneur en protéines. Protéolytique modification par des champignons alcalins et neutres protéases dans la transformation du soja améliorent leurs propriétés fonctionnelles [58].

Les hydrolysats de protéines sont utilisés dans la synthèse de nombreux produits alimentaires et de soins de santé et, le goût amer des hydrolysats de protéines, en raison de présence d'acides aminés hydrophobes et proline, constitue un obstacle majeur à leurs applications commerciales [58].

Les protéases peuvent servir en alimentation animale soit pour améliorer directement la digestibilité des aliments, soit pour favoriser les fermentations anaérobies qui contribuent à augmenter la valeur alimentaire des ensilages [63].

Utilisées dans la gestion des déchets industriels et ménagers. La protéase alcaline de *Bacillus subtilis* a été signalée pour le traitement des déchets de plumes provenant de l'abattoir de volailles. Une combinaison de protéases de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefacines* et *Streptomyces sp.* Avec du thioglycolate est utilisée pour nettoyer les tuyaux bouchés par des dépôts contenant des cheveux [58].

Utilisées également en tannerie pour le confitage des peaux. Cette opération consiste à hydrolyser spécifiquement l'élastine, fibre protéique présente dans le derme dont l'hydrolyse conduit à des peaux plus souples ayant du prêtant [64].



Chapitre 02

Aspergillus niger



Chapitre 02 : *Aspergillus niger*

1. Généralités

Le nom *Aspergillus* est donné à un genre de champignons microscopiques imparfaits (Deutéromycètes), décrit pour la première fois en 1729 par Michelle (mycologue florentin) et qui comprend environ 180 espèces officiellement reconnues réparties en 18 groupes (essentiellement définies d'après les caractères de l'appareil reproducteur) morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches [66].

Les espèces d'*Aspergillus* sont des champignons filamenteux, cosmopolite et omniprésent trouvé dans la nature. Ils sont omniprésents et peuvent être trouvés dans l'air, le sol, la végétation et les environnements intérieurs [67].

Certains membres sont capables de se développer dans des environnements extrêmes tels que les températures élevées/basses, les concentrations élevées de sel/sucre, les faibles acidités ou les faibles niveaux d'oxygène [68], et ont la capacité de se développer sur des milieux pauvres en eau. On les retrouve donc fréquemment comme contaminants de produits "secs"[69], tels que les grains et les produits dérivés (farines, aliments composés pour animaux, etc.) dans les champs ou pendant la conservation dans les silos ou greniers. Lorsque les conditions climatiques sont favorables [70].

Le genre *Aspergillus* comprend plusieurs espèces, certaines espèces peuvent être directement pathogènes. Été rapportées comme agents responsables d'infections opportunistes chez homme. Parmi ceux-ci, *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus couramment isolés, suivis par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*. Les groupes *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, et *Aspergillus versicolor* sont parmi les autres espèces moins souvent isolé sous forme d'agents pathogènes opportunistes [67].

Aspergillus niger est un champignon ascomycète filamenteux qui est omniprésent dans l'environnement et a été impliqué dans des infections opportunistes de l'homme [71]. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui Apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes, et il est considéré comme le microorganisme le plus polyvalent pour la production d'acides, de protéines et d'enzymes de valeur industrielle parmi les quelles: les cellulases, les pectinase, les xylanases, les amylases, les glucoamylases et les protéases, en plus d'une variété de composés d'intérêt pharmacologique[72,73].

2. Taxonomie

Les *Aspergillus noirs* font partie d'un groupe d'espèces appelé « section *Nigri* » et autrefois connu sous le nom de « *Aspergillus niger* groupe » : toutes les espèces de la section ont des têtes de conidies noires [74].

Les espèces du groupe *Aspergillus niger* sont des hyphomycètes anamorphes hyalins certaines ont des formes télémorphes comprises dans les genres *Eu penicillium*, *Talaromyces*, *Hamigera* et *Trichocoma*. L'*Aspergillus niger* n'a aucune forme télémorphe connue.

En raison de son importance économique, l'*Aspergillus* est l'un des genres les mieux décrits du point de vue taxonomique parmi les champignons filamenteux. La taxonomie du groupe *Aspergillus niger* basée essentiellement sur les caractéristiques morphologiques en compte [75].

Tableau 01: La position systématique d'*Aspergillus niger* est résumée comme suivant [76,77] :

Règne	Mycètes
Embranchement:	<i>Amastigomycota</i>
Sous-embranchement	<i>Deuteromycotina</i>
Classe	<i>Deutéromycètes</i>
Ordre	<i>Moniliales</i>
Famille	<i>Moniliaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus niger</i>

3. Morphologie

Les *Aspergillus* sont caractérisés par la présence de conidiophores dressés, terminés par une vésicule supportant, soit une seule rangée de phialides (structure unisériée), soit une rangée de phialides et une rangée de cellules sous-jacentes appelées métules (structure bisériée). L'ensemble stipe et vésicule constitue le conidiophore et l'ensemble vésicule, phialides et conidies forme la tête aspergillaire [79, 80].

Les phialides produisent des spores ou conidies qui caractérisent le mode de reproduction asexuée du champignon. Ces phialospores sont regroupées en panache, dont la couleur et la forme varient en fonction de l'espèce [79].

3.1. Morphologie macroscopique des colonies

Les colonies sont à croissance rapide sur tous les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais l'*Aspergillus niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*Aspergillus niger* sont granuleuses blanches au début, puis jaunâtres et à maturité elles deviennent noires (parfois bruns), à Revers généralement incolore ou jaune pâle montrant parfois des zones concentriques [81].

Sur milieu gélosé de Czapek-Dox à 25 °C, les colonies atteignent un diamètre de 4-5 cm en dedans de 7 jours et de 6-7 cm après 21 jours. Les colonies se composent d'un feutre blanc ou jaune compact avec une couche dense de conidiophores de bruns à noirs; le revers de la colonie est de crème à jaune. Sur gélose à l'extrait de malt, les colonies sont plus clairsemées, mais elles sont fortement sporulées. On observe une croissance pauvre sur le milieu gélosé à la créatinine, additionné de décolorant et de sucrose (CREAD). Les colonies sur gélose pomme de terre et dextrose (PDA) à 25 °C sont d'abord blanches, devenant rapidement noires au moment de la production de conidies. Le revers de la colonie est jaune pâle et se plisse de façon radiale au cours de la croissance [78].

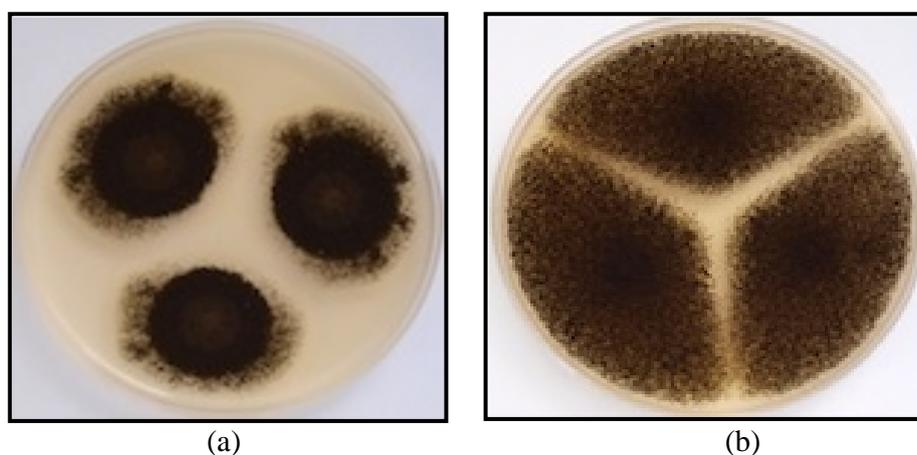


Figure 04: *Aspergillus niger* sur milieu M2(a) et *Aspergillus niger* sur milieu M2S5 (b) [78].

3.2. Morphologie microscopique

Les hyphes sont septés et hyalins, **les têtes conidiennes** brun foncé à noires, radiées à l'état jeune puis se séparant en colonnes plus ou moins bien définies à maturité, et pouvant atteindre un diamètre de 700 à 800 μm [78].

Les Conidiophore : lisse à stipes non cloisonnés, de 1,5 à 2 mm de long, hyalin ou brunâtre dans leur moitié supérieure. Formés d'une cellule courte appelée cellule podale (footcell) avec un hyphe fertile [81].

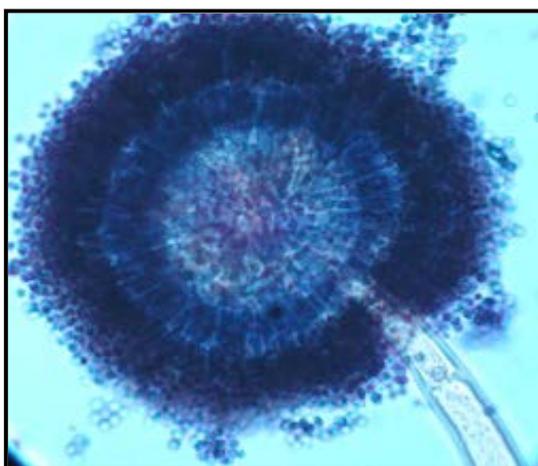
Les Vésicule : globuleuse de 25 à 75 μm , supportant deux séries de stérigmates sur toute sa surface [78].

les Phialides : (7-9,5 x 3-4 μm)formées sur des mutules généralement brunes (20-30 x 5-6 μm), fréquemment septes[82,83].

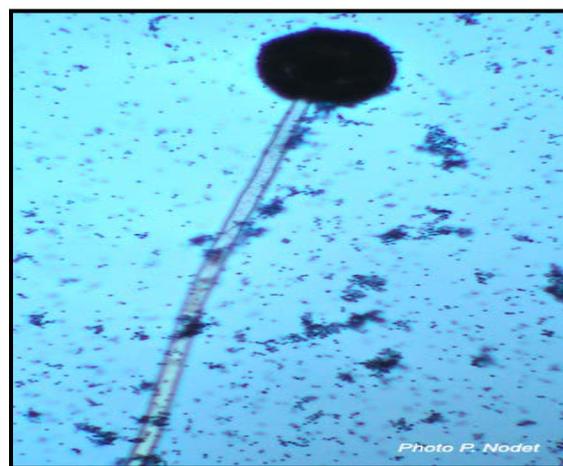
Les conidies : sont des spores asexuées, unicellulaires produites par les phialides, habituellement globuleuses parfois légèrement aplaties qui mesurent de 2à3 μm de diamètre; parfois jusqu'à 6 μm , de couleur noires ou brun foncé et ornementées d'épines et saillies (forme échinulée). Elles sont souvent disposées en chaîne et dispersées par le vent [82,83].

La germination d'une conidie se déroule en deux étapes [78] :

- La conidie commence par gonfler, pendant 3 à 4 heures à la température de 37 °C.
- la croissance se polarise ensuite d'un côté d'où émerge un tube germinatif. Celui-ci s'allonge progressivement et donne un filament.



(a)



(b)

Figure05:Tête conidienne d'*A. niger* (x400) (a) et Conidiophore (x100) (b) [78]

4. Reproduction

La majorité des *Aspergillus*, y compris *Aspergillus niger*, ne sont connus que pour se reproduire par des moyens asexués, en formant des conidiospores [84]. Il est en fait caractérisé par la production d'un grand nombre des spores en chaînes. La sporulation produit des conidies contenant des spores asexuées haploïdes, disséminées dans l'atmosphère après maturation. La croissance végétative est initiée par la germination des spores avec formation d'un hyphes tubulaire (extension strictement apicale) donnant naissance à un réseau mycélien par ramification, qui acquiert les éléments nutritifs de l'environnement [85,73].

5. Les enzymes produites par l'*Aspergillus niger*

Aspergillus niger est l'un des micro-organismes les plus importants utilisé en biotechnologie pour la production d'ingrédients alimentaires, de produits pharmaceutiques et d'enzymes industrielles. Les souches d'*Aspergillus niger* dans leur habitat naturel, sécrètent de grandes quantités d'une grande variété d'enzymes extracellulaires nécessaires pour libérer les nutriments des biopolymères. Cette capacité de sécrétion élevée est exploitée par l'industrie dans les fermentations à l'état solide et submergées. *Aspergillus niger* a une longue tradition d'utilisation sûre dans la production d'enzymes et d'acides organiques. Nombre de ces produits ont obtenu le statut GRAS (generally regarded as safe) [84,86].

Les enzymes d'*Aspergillus* sont utilisées dans le traitement de l'amidon, dans les industries de la boulangerie, de la brasserie et des boissons, dans l'alimentation animale et dans l'industrie du papier et de la pâte à papier [84].

Tableau 02 : Production des enzymes par *Aspergillus niger* [81].

Enzymes	Microorganisme	Substrat/ milieu
Protéases	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé
		Milieu défini
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 13496	Bouillon Batco YM
	<i>Aspergillus niger</i> 91	Grain de soja : son de riz (7:3 w/w)
	<i>Aspergillus niger</i> Z1	Milieu Czapek-Dox
	<i>Aspergillus niger</i> UO-1	Déchets de transformation de viande + déchets de brasserie + amidon
	<i>Aspergillus niger</i>	Confits, graines de coton en poudre
	<i>Aspergillus niger</i> AB100	Écaille de poissons
Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 13496	Bouillon Batco YM
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015	Maltose
		Manioc, maïs, son de blé
	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé+son de riz+cellulose
		Confits, graines de coton en poudre
		Les déchets alimentaires
α-amylase	<i>Aspergillus niger</i> UO-1	Déchets de transformation de viande + déchets de brasserie + amidon
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Déchets d'orange en poudre
Xylanase	<i>Aspergillus niger</i> LPB 326	Canne à sucre, tourteau de soja
	<i>Aspergillus niger</i> (mutant)	La paille de riz
	<i>Aspergillus niger</i> KK2	La paille de riz+son de blé
	<i>Aspergillus niger</i> XY-1	Son de blé
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé
	<i>Aspergillus niger</i> ATTC 6275	Moulin à l'huile de palme effluent/gâteau palme
	<i>Aspergillus niger</i> KK2	La paille de riz+son de blé
	<i>Aspergillus niger</i> NCIM 1207	La poudre du cellulose-123
	<i>Aspergillus niger</i>	Confits, graines de coton en poudre
Lipase	<i>Aspergillus niger</i>	L'huile d'olive + la gomme d'acacia (3%+1%)
		Son de blé + l'huile d'olive
Phytase	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé + farine de soja
	<i>Aspergillus niger</i>	Son de blé + la farine de soja
Polygalaturonase	<i>Aspergillus niger</i>	Pectine + la bagasse de la canne à sucre
		Son de blé
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i> DMF 27, DMF45	Tête de tournesol égrainée
α-galactosidase	<i>Aspergillus niger</i> MRSS 234	Son de
Uréase	<i>Aspergillus niger</i> PTCC 5011	Milieu défini
Hemicellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Confits, graines de coton en poudre

6. Isolement d'*Aspergillus niger*

6.1. Substrats

Aspergillus niger est une moisissure très commune, préférant habituellement les sols secs et chauds. Elle a été isolée dans des substrats très variés comme [85]:

- **Des substrats naturels** : sol, bois, cire, eau (douce, polluée, lits de rivière), légumes, fruits frais et secs, noix et noisettes, poussières atmosphériques
- **Des produits manufacturés** : émulsion de cosmétique, plastiques, photographie, cuir, caoutchouc, composants électroniques, métaux, papiers, peinture murale ou artistique, textiles (coton, jute, laine), *Aspergillus niger* est une espèce cosmopolite qui a été signalée dans le monde entier.

Cette moisissure se développe aussi bien en intérieur (où il est possible de la confondre avec *Stachybotrys* spp) que sous forte lumière, en extérieur. C'est une des espèces les plus communes du sol. Elle se développe sur la matière végétale en décomposition, comme les composts. Elle peut contaminer la viande et les œufs, ou les fruits séchés au soleil. Elle peut aussi endommager les cuirs en surface et en épaisseur [85].

6.2. Milieu

Aspergillus niger est un mycète mésophile, capable de se développer dans une large gamme de températures allant de 6 à 47°C avec une bonne croissance à 35-37°C. Il peut survivre à 60 °C. Assurent l'omniprésence de l'espèce, avec une fréquence plus élevée dans les pays chauds.

Aspergillus niger est une espèce xérophile, pouvant vivre dans un milieu assez pauvre en eau, la limite d'activité de l'eau pour la croissance est de 0,88, ce qui est relativement élevé par rapport aux autres espèces d'*Aspergillus*. Ceci explique pourquoi l'*Aspergillus niger* est l'une des espèces d'*Aspergillus* les plus communes responsables de la pourriture après la récolte des fruits frais. De plus, il est fréquemment isolé dans les noix et les produits séchés au soleil. Cette espèce peut cependant très bien se développer dans un environnement où l'humidité relative est de 90-100 %, *Aspergillus niger* est capable de se développer dans une gamme de pH extrêmement large : 1.4-9.8. Peut supporter des pH bas [86].

6.3. Culture

L'identification des *Aspergillus* se fait par une culture en boîte de Pétri, sur des milieux de culture classiques. Les *Aspergillus* peuvent être isolés à l'aide de clés utilisant la coloration de la colonie, la pigmentation et la forme de la tête *Aspergillaire* et l'aspect des spores.

Aspergillus niger forme des colonies atteignant 4 à 5 cm de diamètre en 7 jours sur milieu Czapek incubé à 25 °C, de couleur noire. La température optimale de croissance se situe entre 25 et 30 °C mais il peut croître jusqu'à la température de 47-48 °C. La colonie est d'abord blanche et translucide puis devient noire en sporulant [87].

7. La Fermentation sur milieu solide

7.1. Définition

La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. et en anglais : solide-state fermentation ou SSF) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs [88, 89,90].

D'un point de vue fondamental, la fermentation en milieu solide est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre et diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide. La principale différence entre ces procédés réside dans la variation des proportions (de l'équilibre) des phases solide, liquide et gazeuse [87, 88].

Dans le cas de la fermentation en milieu liquide, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci [90].

Le développement des champignons filamenteux en FMS 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 inter particulaires (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 [88, 89,90].

La fermentation en milieu solide est apparue comme une technologie potentielle pour la production de produits microbiens tels que les aliments pour animaux, les carburants, les denrées alimentaires, d'aliments protéiques, d'enzymes, d'hormones végétales, de bio pesticides les produits chimiques industriels et les produits pharmaceutiques [91].

7.2. Avantages de la fermentation solide

La production industrielle des enzymes et d'autres métabolites s'oriente de plus en plus vers la fermentation solide à partir des résidus agricoles ou agroalimentaires par rapport à la fermentation liquide grâce à ses avantages qui lui donne, Il est donc important de connaître les avantages [92] :

- Ceux-ci incluent la simplicité de cette technologie (applicable en milieu rural) et ne nécessitant pas d'équipement sophistiqué pour les contrôles permanents des paramètres environnementaux (facultatifs). Le coût des équipements et des opérations est donc faible [93].
- La fermentation sur substrat solide utilise des solides naturels simples comme milieu de culture [93].
- Etant donné que la plupart des procédés de fermentation solide mettent en œuvre des moisissures, ils ne nécessitent pas de stérilisation préalable du substrat. Ce qui réduit le coût énergétique nécessaire [93].
- un apport suffisant en oxygène. Il y a moins d'eaux usées organiques et un meilleur rendement produit plus élevé dans la fermentation à l'état solide. L'environnement solide est plus proche de l'habitat naturel l'habitat naturel des champignons filamenteux [94].
- Des produits à haute valeur ajoutée pourraient être fabriqués par la fermentation en milieu solide en utilisant des résidus industriels et agricoles à faible coût comme substrat. Par conséquent, la fermentation à l'état solide est la technologie la plus prometteuse. la plus prometteuse pour l'utilisation complète des ressources renouvelables [94].
- La conception du bioréacteur, le processus d'aération et le traitement des effluents sont assez simples [95].
- le peu d'eau disponible favorise la production de certains métabolites qui n'apparaissent pas ou peu en culture liquide [95].
- les opérations de mélange étant facilement modulables, il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides [95].
- La réduction des coûts et du temps consommé pendant l'extraction et la récupération du produit (moins de techniques à appliquer et volumes réduits en solvants d'extraction), ainsi que pour le traitement des effluents (en raison de la faible teneur en eau) [96,97].

7.3. Les inconvénients de la fermentation sur milieu solide

Cependant, cette renommée est largement surfaite, surtout lors du développement d'applications pilotes ou en vraie grandeur. Dans ces conditions et bien d'autres, la fermentation solide présente de nombreux inconvénients [93]:

- Le caractère solide et hétérogène des substrats utilisés complique l'observation directe des paramètres de fermentation [92].
- Il est pratiquement difficile d'assurer une répartition parfaitement homogène des additifs au substrat et donc au milieu de culture. Cela rend le contrôle en ligne des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et la concentration en nutriments quelque peu aléatoire [92].
- Les micro-organismes utilisés sont limités. En fait, seuls les micro-organismes qui se développent bien à faible humidité peuvent être utilisés [93].
- Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur les milieux solides sont faibles [93].
- Comme les micro-organismes ne se dissocient pas du substrat, l'estimation de la biomasse est difficile [93].

7.4. Substrats utilisés dans la fermentation sur milieu solide

Il existe de nombreux processus biotechnologiques qui impliquent la croissance d'organismes sur des substrats solides en l'absence ou la quasi-absence d'eau libre. Parmi les nombreux facteurs qui influencent la croissance et l'activité des microbes dans un substrat spécifique en cas de fermentation solide : granulométrie, taux d'humidité et activité aqueuse Et l'activité de l'eau est la plus importante [96,100].

Le choix du substrat dépend de plusieurs facteurs économiques (coût, disponibilité) et biologiques. Par conséquent, les résidus agro-alimentaires semblent être les plus intéressants, en raison de ses avantages potentiels notamment pour les champignons filamenteux capables de pénétrer dans leur structure rigide. D'autre part, Les bactéries et les levures se caractérisent par un développement superficiel [101,102].

La fermentation à l'état solide (SSF) traite des substrats qui sont solides et contenant de faibles niveaux d'humidité. Les substrats solides les plus couramment utilisés sont les céréales (riz, blé, orge et maïs), les graines de légumineuses, le son de blé, les matières lignocellulosiques telles que la paille, la sciure de bois, la sciure de bois et une grande variété de matières végétales et animales. Ces substrats solides sont de nature polymérique, insolubles ou peu solubles dans l'eau, et contiennent une source concentrée de nutriments pour la croissance des micro-organismes [27, 101,103].

7.5. Organismes utilisés dans la fermentation sur milieu solide

Les microorganismes utilisés dans le processus de SSF en raison de leurs propriétés physiologiques, enzymologiques et biochimiques [100].

Les bactéries, les levures et les champignons peuvent se développer sur des substrats solides, et trouvent une application dans les processus de SSF. Mais les champignons filamenteux sont le groupe le plus important de microorganismes utilisés dans le processus de SSF en raison de leur capacité à tolérer la faible activité d'eau, le mode de croissance apical des hyphes fongiques et les conditions de haute pression osmotique [100,101].

Cependant, les bactéries et les levures, qui nécessitent une teneur en humidité plus élevée pour une fermentation efficace, peuvent également être utilisées avec la SSF, mais avec des rendements inférieurs. Ces dernières sont appliquées principalement dans certains processus tels que le compostage (bactéries thermophiles), l'ensilage (lactobacilles) et dans la production alimentaire (levures) [100,104].

Tableau 03: Principaux groupes de micro-organismes impliqués dans les processus de SSF [100].

	Microflore	Processus SSF
Champignons	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Compostage. Gibbérellines</i>
	<i>Altemaria sp.</i>	<i>Compostage</i>
	<i>Aspergillus sp</i>	<i>Compostage, industriel, alimentaire</i>
	<i>Monilia sp.</i>	<i>Compostage</i>
	<i>Mucor sp.</i>	<i>Compostage, alimentation ; enzyme</i>
	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Compostage. Aliments, enzymes, acides organiques</i>
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Compostage, dégradation de la lignine</i>
	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Compostage Contrôle biologique, bioinsecticide</i>
	<i>Beauveria sp. Metharizium sp.</i>	<i>lutte biologique, bio insecticide</i>
	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Koji, aliments, acide citrique</i>
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	<i>Tempeh, soja, amylase, lipase</i>
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aliments pour animaux, protéines, amylase, acide chronique</i>
	<i>Penicillium notatum, roquefortii</i>	<i>Penicillin, fromage</i>

Bactéries	<i>Bacillus sp.</i>	Compostage, amylase
	<i>Pseudomonas sp.</i>	compostage
	<i>Serratia sp.</i>	compostage
	<i>Streptococcus sp.</i>	compostage
	<i>Lactobacillus sp.</i>	Ensilage, aliments
	<i>Clostridium sp.</i>	Ensilage, alimentation
levures	<i>Endomycopsis burtonii</i>	Ruban, manioc, riz
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aliments, éthanol
	<i>Schwanniomyces castelli</i>	Éthanol, Amylase

7.6. Applications de la fermentation à l'état solide

7.6.1. Application de la fermentation à l'état solide dans l'industrie alimentaire

La fermentation à l'état solide trouve son origine dans le domaine de la production alimentaire traditionnelle. Les produits de fermentation tels que le vin, la sauce et le vinaigre sont des nécessités quotidiennes pour les personnes. Par exemple: le pain est un produit fermenté avec de la levure. Le fromage Il résulte d'une fermentation mixte avec *Lactococcus lactis* et *Streptococcus*. Sauce soja et méso impliquant la culture d'*Aspergillus oryzae* sur soja et Farine de blé. Culture de bactéries lactiques qui transfèrent l'alcool à l'acide acétique crée du vinaigre. Fermentation traditionnelle du vinaigre et de l'acide acétique, les deux étapes utilisent la technologie de fermentation solide [94].

7.6.2. Application de Fermentation à l'état solide en pharmacie et en chimie

Avec l'innovation de la technologie de fermentation à l'état solide, les applications ont Développé et a montré de bonnes perspectives en pharmaceutique et chimique des champs. Récemment la technologie de fermentation solide a également Il a été appliqué à la production d'acide fumarique, d'acide citrique, d'acide oxalique et d'acide linoléique. Par exemple, La production d'acide lactique implique la culture de champignons filamenteux ou de bactéries à l'aide de Le manioc, la betterave à sucre, la bagasse et autres déchets agricoles [94].

Métabolites secondaires microbiens, tels que les acides aminés, les vitamines et autres substances biologiquement actives, toutes ont une bonne valeur pour le médical et l'industrie applications. Des études récentes ont montré que les gens ont utilisé avec succès technologie

de fermentation à l'état solide pour produire des métabolites secondaires tels qu'Antibiotiques, toxines bactériennes, auxine, médicaments immunitaires et alcaloïdes. La fermentation à l'état solide a également été appliquée dans une variété d'autres domaines, tels que ceux pour la production de bio surfactants, d'acide glutamique, d'amine, de pigments, de vitamines, caroténoïdes, gomme de xanthine, etc. [94].

7.6.3. Application de la fermentation à l'état solide en énergie et les domaines de la protection de l'environnement

La fermentation à l'état solide est importante pour résoudre la crise énergétique et environnementale Pollution [105].

Déchets agricoles souvent Riche en nutriments, offrant un habitat idéal pour la croissance microbienne. Afin que les gens Ils ont tendance à utiliser les résidus agricoles pour produire des produits de grande valeur. La fermentation à l'état solide a été appliquée avec succès aux biocarburants, aux biocides, à la biotransformation, à la détoxification biologique et à la bioremédiation [106].

Les méthodes de lutte contre les parasites utilisant la fermentation à l'état solide pour cultiver des champignons pathogènes et parasites des insectes suscitent un intérêt croissant les coûts de production pourraient être considérablement réduits et la virulence à l'égard des insectes nuisibles considérablement augmentée [94].

Une autre application importante de la fermentation à l'état solide dans la protection de l'environnement est la biotransformation des cultures et des déchets pour améliorer leur valeur nutritionnelle [94].

Certains résidus pourraient également être utilisés pour produire des substances à haute teneur en protéines ou des protéines unicellulaires ; ainsi, la fermentation à l'état solide pourrait augmenter la teneur en protéines des produits, ce qui est plus propice à la digestion animale. Plus propice à la digestion animale [106].

Tableau 04: Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide [100].

Domaine d'application	Produits	Microorganismes
Alimentaire	Champignons supérieurs	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Lentinus edodes</i> (Shiitaké) <i>Pleurotus ostreatus</i> (Pleurotes)
	Fromages à pâte persillée, fromages à croûte fleurie (camembert, brie,...)	<i>Penicillium roquefortii</i> <i>Penicillium camembertii</i> <i>Penicillium caseicolum</i>
	Pain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Acides organiques	Acide citrique Acide lactique	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i>
Divers	Bioconversion de substrats agricoles (compostage, ensilage)	
	Biostimulation des plantes (ectomycorhizes)	
	Bioremédiation des polluants organiques dans le sol	
	Délignification de la biomasse	
	Détoxification biologique de composés toxiques et dangereux	
Enzymes	Production d'inoculum fromager (conidies de <i>Penicillium</i>)	
	Amylases, glucoamylases Cellulases, xylanases Pectinases Protéases	<i>Aspergillus spp.</i> <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Rhizopus oligosporus</i>
Enrichissement nutritif (protéines) des aliments pour animaux	Canne à sucre, manioc, pulpe de betterave,...	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
Métabolites secondaires	Arômes	<i>Penicillium spp.</i> <i>Trichoderma spp.</i>
	Antibiotiques (pénicilline)	<i>Penicillium notatum</i>
	Hormones végétales (acide gibbérellique)	<i>Gibberella fujikuroi</i>
	Alcaloïdes (ergot)	<i>Claviceps purpurea</i>
Lutte biologique (biocontrôle/biopesticide)	Biofongicides, bioinsecticides...	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Trichoderma spp.</i> <i>Coniothyrium minitans</i>



*Matériels et
Méthodes*



Matériels et Méthodes

1. Matériel

1.1 Matériel végétal

1.1.1 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 amylicée). Il représente 10 à 17% du blé moulu [108].

La fermentation a été réalisée sur milieu solide à base de son de blé. Le son de blé a été utilisé comme substrat pour le criblage du champignon protéolytique le plus puissant par un dosage quantitatif dans SSF (Solid-State Fermentation) [109].

1.1.2 Matériel microbiologique

La souche fongique *Aspergillus niger* est utilisée pour la production des protéases, par fermentation en milieu solide. Cette moisissure a été isolée à partir de sols [110].

1.1.3. Milieux de culture utilisés

La production de protéase acide par l'espèce fongique *Aspergillus niger*, a besoin d'une source alternative de carbone et d'énergie dans le milieu de culture, nécessaire pour la croissance et pour la production d'enzymes [111].

Les milieux de cultures utilisés pour *l'Aspergillus niger* ont été mentionnés dans ce tableau [112] :

Tableau05 : Les milieux de cultures utilisés pour *l'Aspergillus niger* [112].

Milieux	Utilisations
Sabouraud	Isolement
Czapek yeast autolysate (CYA)	Identification
Potato Dextrose Agar (PDA)	Conservation

2. Préparation du matériel biologique:

2.1. Isolement

Aspergillus niger ont été isolés à partir de différents échantillons de sol par des séries de dilutions décimales. Chaque dilution correspond à un échantillon qui sera étalé à la surface des boîtes de Pétri individuelles contenant de milieu Sabouraud. Ont ensuite été incubées à 30°C pendant 4-6 jours pour isoler les colonies distinctives [113].

Chaque colonie a ensuite été réassurée sur le même milieu (Sabouraud) jusqu'à pureté puis identifiées morphologiquement et conservé à 4°C [114].

Matériels et Méthodes

2.1.1. Prélèvement du sol

Les échantillons de sol prélevés des différentes zones à l'aide d'une grande spatule stérile, après l'écartement de la couche superficielle du sol, puis déposés sur une feuille d'aluminium stérile. Les gros débris sont enlevés (plantes, racines, pierres) le reste du sol est récupéré et mis dans des flacons stériles. Ces derniers sont déposés dans une glacière et transportés rapidement au laboratoire [114,115].

2.1.2. Préparation de la suspension du sol

La suspension du sol a été préparée en mélangeant un gramme de sol dans 9 ml d'eau physiologique (Na Cl à 0.9%), puis agiter. Une série de dilutions décimales (10^{-1} jusqu'à 10^{-5}) ont été préparées à partir de solution mère dans des tubes de 9 ml de l'eau physiologique dans des conditions aseptiques, suivie d'une agitation pendant 10 minutes pour homogénéiser la suspension du sol [115].

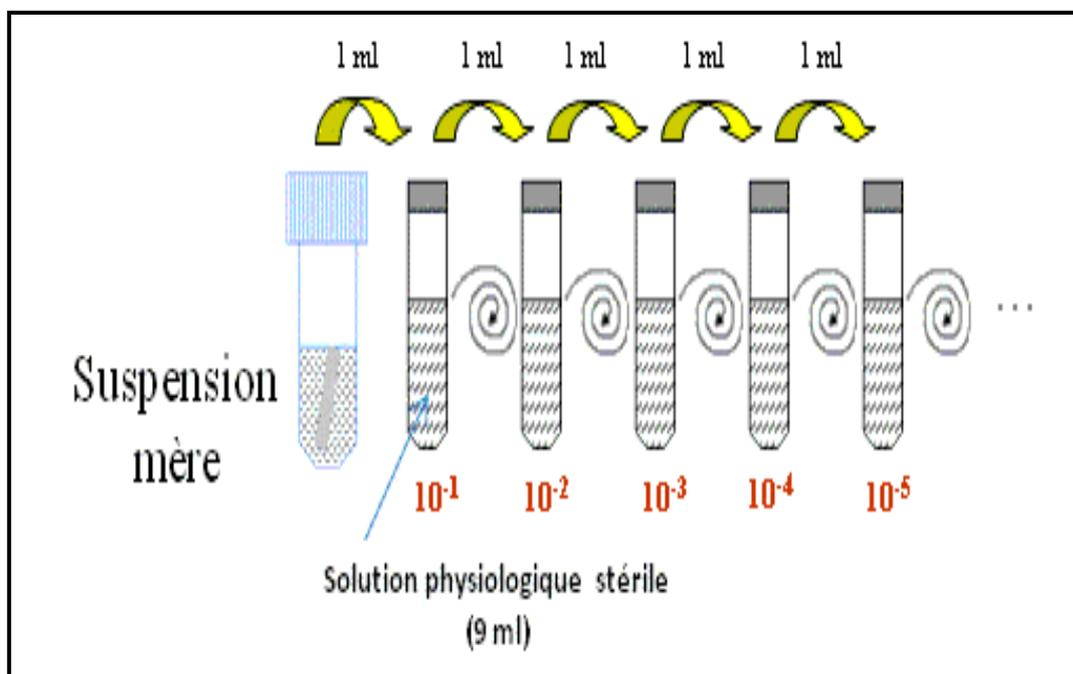


Figure 06: Dilution en série de l'échantillon dans une solution physiologique : agitation au vortex [116].

2.1.3. Ensemencement des moisissures

Les ensemencements à partir de différentes dilutions ont été réalisés sur des boîtes de Pétri individuelles contenant de milieu Sabouraud [114].

Déposer 0,1 ml de l'une des dilutions sur le milieu de culture puis étaler de façon uniforme à l'aide d'un étaleur stérile jusqu'à ce qu'il ne reste plus de liquide visible à la surface du milieu. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 30°C dans un incubateur pendant 4-6 jours pour une sporulation maximale et des colonies distinctives [113].

Matériels et Méthodes

2.1.4. Purification

Après incubation, les colonies précédemment isolées ont été repiquées successivement par touche sur le milieu PDA jusqu'à l'obtention de souches pures [114].

2.1.5. Conservation des souches fongiques isolées

Les souches fongiques isolées sont maintenues sur milieu PDA (incubation à 30°C jusqu'à une bonne sporulation). Les spores sont récupérées par adition de 10ml d'eau tween (0.1%). Ces suspensions de spores sont ensuite stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation [117].

2.1.6. Identification

L'identification des moisissures fait essentiellement appel au caractère culturaux (identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique) mais rarement à des propriétés biochimiques [117].

1. Identification macroscopique

Les caractères morphologiques et culturaux sont déterminés après ensemencement des souches pures sur milieux de cultures spécifiques différents. L'identification se fait à l'œil nu et elle se base essentiellement sur les caractères suivant [117]:

La vitesse de croissance (rapide, moyenne, lente)

- La texture des colonies.
- La couleur des colonies.
- La couleur du revers de la culture.
- Le mode de reproduction.

2. Identification microscopique

L'identification microscopique est réalisée par coloration au bleu de méthylène et une observation sous microscope optique à grossissement ($\times 10$, $\times 40$) ainsi qu'à l'immersion ($\times 100$). L'étude microscopique du mycélium est basée sur [117,118]:

- L'absence ou présence de cloisons.
- Couleur des filaments mycéliens.
- Mode de ramification des cloisons.
- Différenciation des thallospores.

2.2. Méthodes de dosage

2.2.1. Mise en évidence de L'activité protéolytique

L'activité protéolytique c'est la capacité de la souche fongique de croître sur milieu de culture à base de protéine comme la seule source d'azote et générer des zones de protéolyse claires [120].

L'activité protéolytique de la souche *d'Aspergillus niger* a été recherchée qualitativement sur milieu lait gélosé stérile à 30 % comme seule source d'azote. Et l'apparence des zones

Matériels et Méthodes

d'hydrolyses après l'ensemencement des quelques spores au centre de la boîte de Pétri avec une incubation à 30°C pendant 5 jours permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique de la souche isolée [120].

Au cinquième jour, on mesure le diamètre de colonie et diamètre de l'anneau de protéolyse (c'est une zone claire formée autour de la colonie fongique) [120].

2.2.2. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est le nombre d'unités d'activité protéolytique par µg de protéines; celles-ci sont dosées par la méthode spectrophotométrique [121]

L'activité protéolytique est déterminée à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine suivant la méthode d'**Ansons, (1938)** que se base sur l'estimation de la quantité des peptides simples et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine substrat sous l'action d'une protéase ou un mélange des protéases. La tyrosine est utilisée comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéolytique parce que c'est un acide aminé présent dans toutes les protéines [122].

La réaction enzymatique est stoppée par l'addition du TCA, qui fait précipiter les protéines non attaquées par la protéase, puis les éliminer par différents procédés (centrifugation, filtration). La mesure de l'absorbance des peptides et des acides aminés libres restants en solution après coloration au réactif de Folin-Ciocalteu (réaction avec la Tyr et Trp), permet de mesurer l'activité protéolytique par spectrophotométrie à 750nm [122].

2.2.3. Dosage des protéines

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines [123]. Le choix dépend des besoins et des caractéristiques recherchées: fiabilité, sensibilité, rapidité, taille des échantillons, possibilité de récupérer l'échantillon après dosage, présence de substances interférentes dans l'échantillon [119].

On cite les méthodes de dosage des protéines les plus utilisées [124] :

- **Absorption à 280 nm:** On mesure l'absorption à 280 pour faire un dosage quantitatif ou semi-quantitatif d'une solution protéique.
- **Méthode de biuret:** Cette méthode a été développée par **Gornall et al (1949)** qui ont appliqué la réaction du biuret pour obtenir une méthode quantitative de dosage des protéines.
- **Méthode de Lowry:** Cette méthode a été développée par **Lowry et al (1951)** qui ont combiné une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret.
- **Méthode de bleu de coomassie:** ont développé par **Bradford et al (1976)** une méthode basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu méthanolique

Matériels et Méthodes

acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. De nombreuses variantes ont été développées par la suite et on peut se procurer dans le commerce des trousse ("kits") de divers fabricant. Cette adsorption se fait principalement par des liens ioniques avec des acides aminés basiques (Arg., his, et lys) et des interactions hydrophobes (acides aminés hydrophobes).

- **Méthode de Kejdahl:** Cette méthode consiste à mesurer la quantité d'azote organique d'un échantillon. Il faut évidemment savoir, pour l'échantillon analysé, quelle est la relation entre la quantité d'azote et celle de protéines. Elle requiert un équipement coûteux et complexe. On ne l'applique qu'à des échantillons difficiles à homogénéiser. Comme du matériel végétal.
- **Méthode parAcide bicinchonique:** est un dosage colorimétrique des protéines, basé sur l'acide bicinchonique(BCA) qui réagit avec les complexes de Cu^{2+} et de protéines de façon très similaire à la réaction du biuret. En formant de tels complexes, il prend une couleur pourpre typique. C'est une méthode sensible et rapide qui résiste aux détergents comme le Triton ou le SDS. Elle est aussi souvent disponible en trousse faciles d'emploi.

2.3. Méthode de fermentation

2.3.1. Milieu et conditions de culture

L'activité protéolytique d'*Aspergillus niger* a été testée quantitativement, où le son de blé est utilisé comme substrat pour favoriser la production de protéases extracellulaires. Une masse de 5 g du substrat sec avec 4ml du milieu minéral a été introduite dans une Erlenmeyer de 250 ml est ensuite stérilisée par autoclavage pendant 20 min [125,126].

2.3.2. Préparation de l'inoculum :

L'inoculum correspond à la suspension sporulé de la souche d'*Aspergillus niger*. Cette dernière, est préparée par addition de 10 ml d'eau physiologique stérile aux souches cultivées pendant 5jours sur milieu PDA. Les spores sont récupérées superficiellement en utilisant un râteau sous des conditions aseptiques, Puis filtrés par papier filtre stérile [127,128].

2.4. Dénombrement des spores:

Le dénombrement des cellules viable est souvent nécessaire lors de manipulations de déterminer le nombre de cellules présentes dans une culture, tant sur milieu solide qu'en suspension dans un milieu liquide. Il peut s'agir de bactéries, de levures, de moisissures; d'algues unicellulaires [129].

L'estimation du nombre de spores de la suspension fongique est effectuée par un dénombrement des spores d'*Aspergillus niger* effectué sur cellule Malassez sous microscope photonique au grossissement (x10) puis (x40) [129].

2.5. Conduit de fermentation :

Les milieux stériles ont été additionnés de 4 ml de milieu minéral stérile, puis inoculés avec 1 ml de suspension des spores et incubés à 30°C pendant 72 h dans une étuve [109].

2.6. Optimisation des paramètres de production de protéase acide par *Aspergillus niger* :

L'effet des paramètres suivants sur la production de protéase par la souche *Aspergillus niger*. Chaque paramètre prouvé a été maintenu constant dans l'étude ultérieure du paramètre suivant :

2.6.1. Choix du milieu minéral

L'influence de la composition du milieu minéral sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* a été évaluée par l'utilisation de quatre milieux minéraux différents : solution du *Czapek-Dox*, solution M-9, solution du sulfate d'ammonium à 0,05% (SA) et une solution minérale (SM) [129].

Dans chaque Erlenmeyers de 250ml, 10g de son de blé caractérisé et 10ml du milieu minéral testé, dont le pH initial est ajusté à 4. Le mélange est ensuite stérilisé à 121°C pendant 15-20min. Après refroidissement, chaque milieu est inoculé par 1ml de la suspension fongique (2×10^6 spores/ml), puis incubé à 30°C pendant 3 jours [129].

2.6.2. PH initial du milieu minéral

Des valeurs de pH de 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 et 10,0 ont été utilisées pour estimer le pH optimal pour la production de protéase à partir d' *Aspergillus niger* en utilisant la méthode décrite par **Oyeleke et al** [130]. Le pH du milieu a été ajusté en utilisant soit 50 mm de K₂HPO₄, soit 50 mm de KH₂PO₄. Les autres conditions ont été maintenues constantes.

2.6.3. Température d'incubation

Selon la description d'**Oyele** [131], l'effet de températures sur la production de protéase d'*Aspergillus niger* a été déterminé en incubant les flacons de fermentation à 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C et 60 °C, 70°C et 80°C. Les autres conditions ont été gardées constantes.

2.6.4. Période d'incubation

L'effet de la période d'incubation sur la production de protéase a été défini en incubant pendant différentes heures de 24, 48, 72, 96, 120 et 144. L'activité protéolytique a été effectuée par la méthode d'**Ali et Vidhale** [132].

2.6.5. Taux d'humidité du substrat

La méthode décrite par **Ali et Vidhale** [132]. A été utilisée pour étudier l'effet de l'humidité du substrat sur la production de protéase.

Matériels et Méthodes

Le taux initial d'humidité du substrat a été optimisé par incubation de la souche d'*Aspergillus niger* à différents volumes de la solution saline, qui correspondent aux différents taux d'humidité : 39,21% ; 54,33% ; 62,5% ; 65,34% et 70,8[133]5%. La fermentation est conduite à la température optimale et au pH optimum pendant 3 jours [133].

2.7. Extraction et purification de la protéase d'*Aspergillus niger* :

2.7.1. Extraction de la protéase d'*Aspergillus nige*

À la fin de la fermentation, la protéase d'*Aspergillus niger* est extraite à l'eau distillée. Le son de blé fermenté est repris dans 50 ml d'eau distillée stérile. Après agitation à 160 rpm pendant 2 heures à 30°C, Les débris ont été séparés par filtration à travers un papier filtre Whatman No1, ou à l'aide d'un tissu en coton. Le filtrat a ensuite été centrifugé 5000 g pour 15 min à 4°C, dont le surnageant récupéré représente l'extrait enzymatique brut utilisé pour les études analytiques [134, 135].

2.7.2. Purification de la protéase d'*Aspergillus niger*

La purification partielle de l'enzyme passe par une précipitation fractionnée des protéines par sulfate d'ammonium ((NH₄)₂ SO₄) puis une dialyse à membrane semi-perméable [136].

La précipitation au sulfate d'ammonium de l'extrait enzymatique brut a été effectuée à 70% de saturation. Une quantité de 22,1g de sulfate d'ammonium (voir Annexe 3) est ajouté à 50 ml d'extrait brut sous agitation pour atteindre le 70% de saturation à 4°C. Elle est suivie par une centrifugation à (4000rpm, 30 min.), la présence de l'enzyme est recherchée dans le surnageant et le culot. Ce dernier est mis en suspension dans un volume réduit du tampon citrate de sodium (0,1M ; pH 5,2), pour être dialysé par la suite afin d'éliminer le sulfate d'ammonium résiduel. [137,138].

2.8. Etude de la stabilité de la protéase d'*Aspergillus niger*

L'étude de la stabilité de l'extrait enzymatique d'*Aspergillus niger* a été déterminée en fonction de la température et le pH, où l'activité protéolytique varie selon les conditions standards de la mesure [139].

2.8.1. Stabilité thermique

La stabilité thermique a été étudiée en incubant les extraits enzymatiques à des températures variant dans le tampon ex: citrate de sodium pendant une durée de temps [139].

2.8.2 Stabilité vis-à-vis du pH

La stabilité vis-à-vis du pH est déterminée par la mesure de l'activité protéolytique de l'extrait brut maintenu pendant à intervalle de temps de température dans le tampon citrate de sodium à des pH varient [139].



*Résultats et
discussions*



Résultat et discussion

Résultats et discussions

La production de protéase par *Aspergillus niger* sur milieu à base des résidus agro-industriels (son de blés) est abordée par plusieurs travaux, grâce à l'importance de cette enzyme et de ces applications dans le secteur biotechnologique. Actuellement, ces enzymes occupent une position de leader parmi les enzymes industrielles commerciales. Les protéases d'origine fongique représentent une source précieuse pour de multiples applications industrielles, car les champignons filamenteux constituent les moteurs de production des enzymes protéolytiques, particulièrement *Aspergillus niger*, qui est le plus commun en classe des champignons inoffensifs (**GRAS**) (Generally Regarded As Safe) ; de ce fait, les enzymes produites par ce champignon peuvent être utilisées en toute sécurité [140].

La présente étude vise l'utilisation des ressources renouvelables principalement les résidus agro-industriels. En effet, les déchets générés par ces industries constituent une matière organique riche en polysaccharides de la paroi végétale, à savoir la cellulose, l'amidon, la lignine et la pectine. Ces macromolécules ont une valeur nutritionnelle importante et nécessitent d'être valoriser en tant que matière première ou substrat pour faire cultiver des microorganismes, qui par conséquent, sont capables d'utiliser ces nutriments et de produire de nouvelles molécules à forte valeur ajoutée. Ce qui conduit en fin de parcours, à une dépollution naturelle de l'environnement d'un côté, et de l'autre côté, c'est économique par l'apparition d'une nouvelle gamme de produits biotechnologiques sur le marché. Par ailleurs, la production des enzymes d'origine microbienne est effectuée par des fermentations en milieux liquides ou sur substrats solides, représentés par des milieux naturels sous forme de résidus issus de ces industries, ce qui constitue une alternative de choix qui s'insère dans cette préoccupation où la production d'enzymes industrielles nécessite l'utilisation de milieux à moindre coût [140]. Ce qui est possible par l'utilisation des résidus agroindustriel disponibles et bon marché. Effectivement, dans notre étude on a opté sur l'utilisation le son de blés comme substrat naturel pour la croissance du champignon filamenteux *Aspergillus niger* et la production des protéases, selon le procédé de la fermentation sur milieu solide (FMS). Ce système solide est préconisé pour améliorer le niveau de production des enzymes en raison de plusieurs avantages par rapport à la fermentation liquide (FML).

Parmi les modes de fermentation utilisés pour la production des enzymes, la fermentation à l'état solide est généralement préférée parce qu'elle permet la production d'enzymes brutes hautement concentrées. Par conséquent, les coûts de l'extraction sont faibles et permettre ainsi, d'obtenir des enzymes purifiées. D'après les études sur la production des enzymes, on peut dire que la biosynthèse des enzymes d'origine microbienne dépend de certains facteurs, entre autres les composants du milieu, la température d'incubation, le pH initial du milieu, etc. L'étude de la composition chimique du substrat de fermentation s'impose aussi pour orienter une telle production. D'après (**MAES et al, 2001**) [141]. Le son de blé est composé d'environ de 22 à 25% de (glucurono) arabinoxylyanes, de 14 à 17% de protéines, de 7 à 11% de cellulose, de 3 à 10% de lignine, des β -glucanes à liaisons mixtes et de 11 à 30% d'amidon résiduel selon le mode de fractionnement. Au total, les polysaccharides hors amidon représentent environ 46% du son de blé industriel, dont près de 70% sont des (glucurono) arabinoxylyanes.

Les paramètres de processus pour la production de protéase par *Aspergillus niger* cultivé sur différents milieux solide et utilisé le son de blés comme substrats ont été effectués dans des conditions optimisées. Les résultats de sont présentés et discutés comme suit :

Résultat et discussion

1. Optimisation des paramètres de production de protéase acide par *Aspergillus niger* :

1.1. Choix du milieu minéral

Selon l'étude de **BENSMAIL (2012)** [142]. la production de protéase de la moisissure *Aspergillus niger* est effectuée par fermentation sur quatre milieux solides : milieu minéral différents avec son de blé, dont le pH initial et la température d'incubation des cultures est de l'ordre de 4 et 30°C , Les résultats obtenus révèlent que la solution du *Czapek-Dox* additionnée au son de blé assure une meilleure production de la protéase d' *Aspergillus niger* avec une activité coagulante de l'ordre de 112,67±4,95 US/ml et un AC/AP de 2,70. Par contre, la solution du sulfate d'ammonium à 0,05% donne la plus faible activité (32,736±0,816 US/ml). **Tunga et al., (1998)** [143]. Ont trouvé que la solution M-9 permet d'avoir le maximum d'activité protéolytique de la protéase alcaline produite par *Rhizopus oryzae* sur son de blé (**figure 07**).

Des résultats similaires ont été trouvés par **Attrassi et al (2005)** [144].
Donc Le milieu Czapek-Dox donne la meilleure production de la protéase.

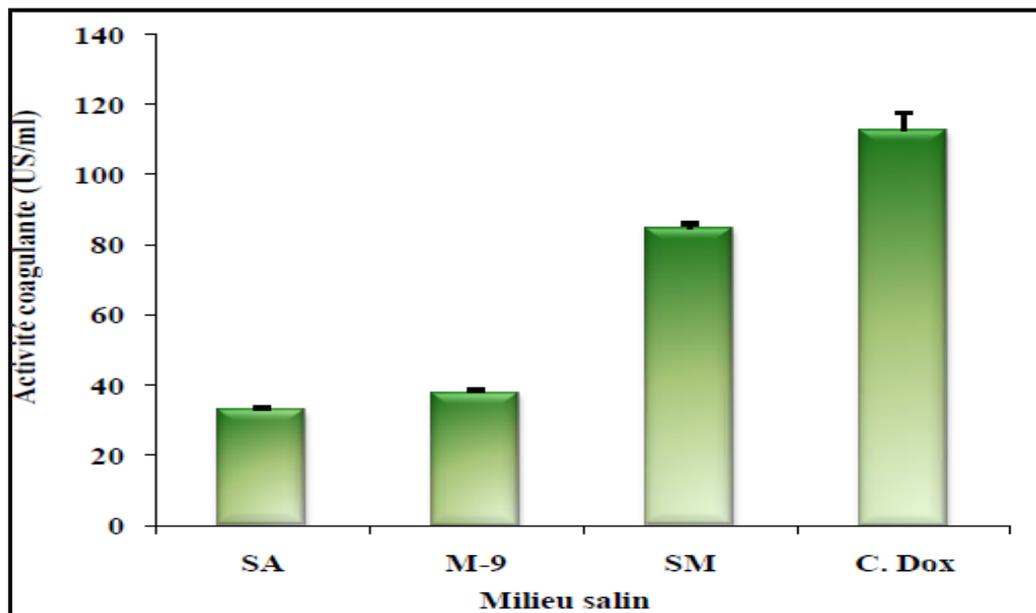


Figure07: Influence de la composition des milieux salins sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger*. (incubation à 30°C). (SA: sulfat d'amnium, SM: solution mènirale, CD: Czapek-Dox.) [142].

Selon la littérature, des concentrations faibles ou élevées, ainsi que la combinaison des sels ont des effets remarquables sur les activités métaboliques des microorganismes puisqu'ils augmentent les rendements de production des métabolites et favorisent la croissance microbienne [143].

1.2. Influence du pH du milieu minéral

Résultat et discussion

Afin d'étudier l'influence du pH initial de la solution saline du Czapek-Dox sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger*, Ont noté différents pH variant de 3 à 7 pendant 3 jours [145,146].

La **figure 08** indique que la production de la protéase d'*Aspergillus niger* est maximale à pH 4. La productivité en enzyme est diminuée si le niveau du pH est supérieur ou inférieur par rapport à cette valeur. On observe pareillement que la variation du pH du milieu minéral (intervalle du pH 5-7) ne provoque pas une grande différence dans les rendements de production, qui peut être exprimée par l'excellente capacité tampon du son de blé et par l'utilisation de petites quantités expérimentales [145,146].

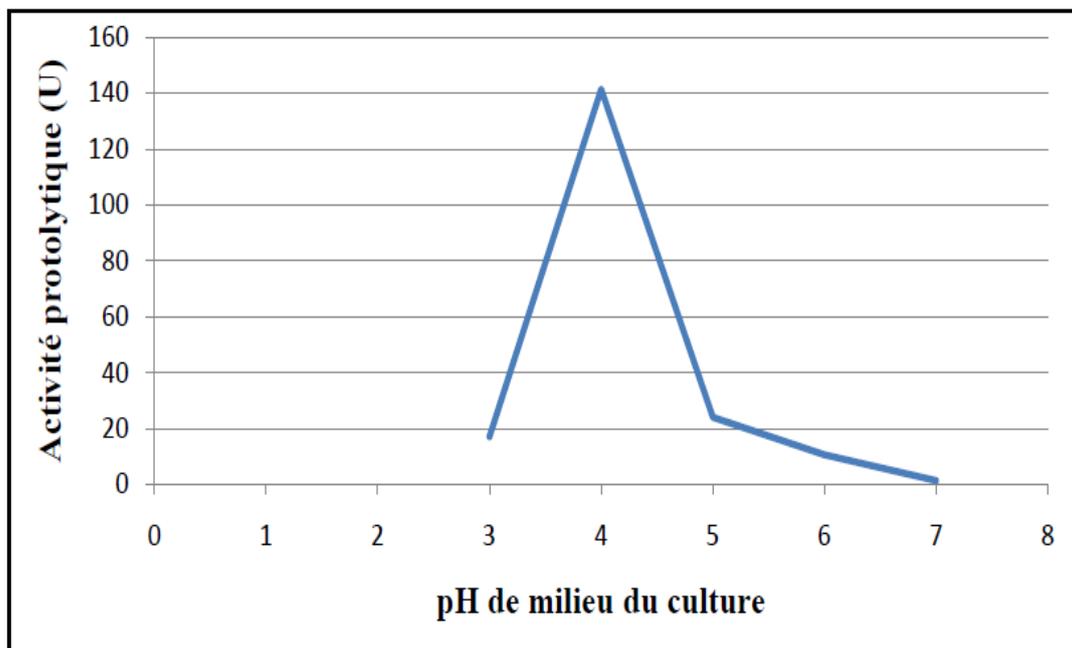


Figure 08: Effet du pH initial du milieu minéral sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* (solution Czapek-Dox, 30°C) [147].

Des résultats proches sont également trouvés pour une production de protéase maximale à pH 4 et 4,5 par **Bensmail et al. (2013)** [148] et **Mukhtar et UI-Haq (2009)** [149]. respectivement lors l'étude sur l '*A.niger* par contre une activité productrice maximale a été remarqué à pH neutre 7 (**Paranthaman et al., 2009**) [150]. et autre alcalin (**Chandrasekaran et al., 2015**) [151] pour la même espèce.

Des résultats similaires ont été trouvés par **Singh et al. (1994)** [152]. On note l'augmentation de l'activité protéolytique du pH 2,5 jusqu'à pH 4,0, où elle garde une activité indispensable jusqu'à pH 5,5. Au delà de cette valeur, l'activité diminue. L'enzyme est perdu environ 40% de son activité à pH 6,5.

La **figure09** indique que la souche sélectionnée présente également une activité protéasique à pH neutre, mais cette activité est moins importante que la première. Cette moisissure produit donc au moins deux protéases, l'une ayant un pH optimum de 4,0 et l'autre un pH optimum de 7,0. Les deux types de protéase se dénaturent aux pH alcalins. En effet, les activités

Résultat et discussion

métaboliques des microorganismes sont très sensibles à la variation de pH, car il influe fortement sur des nombreux processus enzymatiques ainsi que le transport de différents éléments nutritifs à travers la membrane cellulaire assurant la croissance et la production des métabolites [145] [150] [153]. Ces activités métaboliques conduisent inévitablement à un changement dans l'équilibre des ions hydrogène et donc du pH du milieu de culture [154].

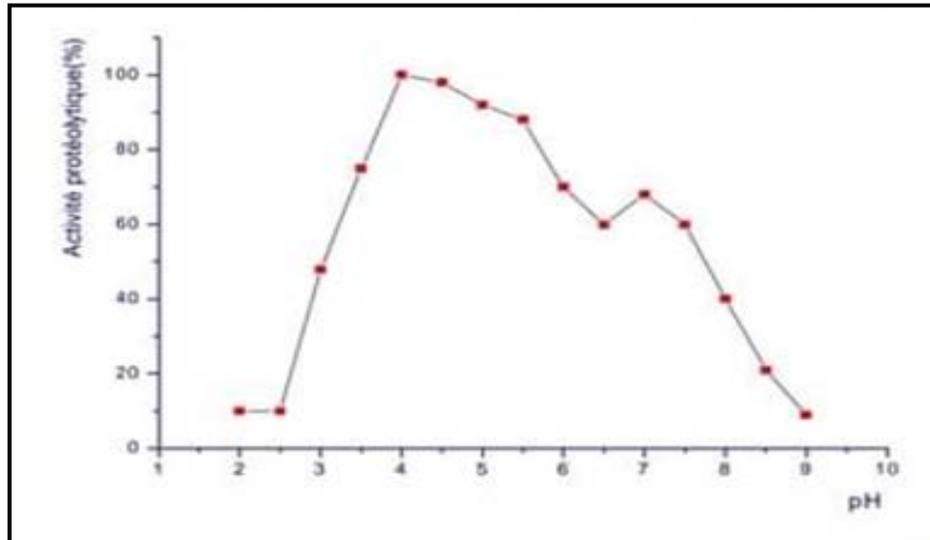


Figure 09: Effet du pH sur l'activité de l'enzyme [152].

Selon (Patil M et al 1981) [155] la production maximale de protéase a été trouvée à PH 7 (Figure 09). Ce résultat indique clairement que la moisissure est neutrophile. La production moyenne de protéase par *Aspergillus niger* a été observée dans l'intervalle PH 7-9. La production de protéines et la croissance en cas de PH 10 optimum, PH 7 a été rapportée pour la protéase naturelle d'*Aspergillus niger*.

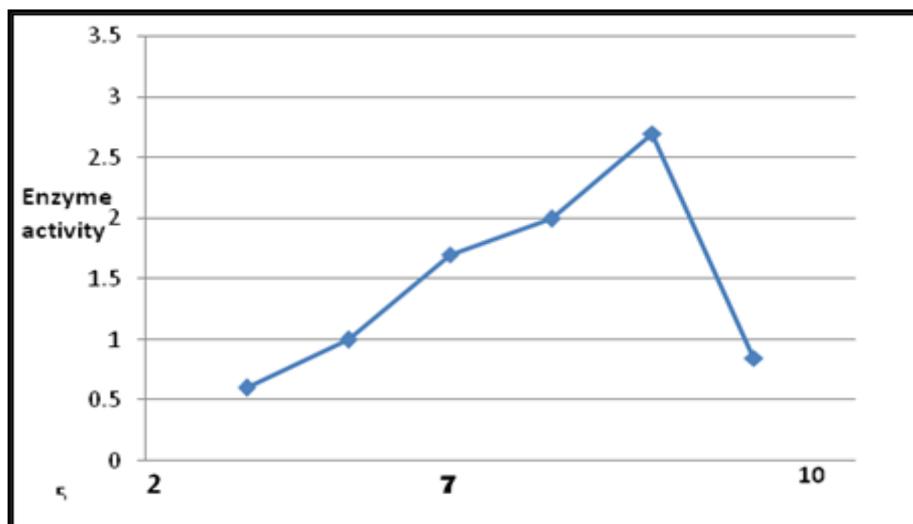


Figure10: Effet du pH sur la production de protéase par *Aspergillus niger* [147].

Résultat et discussion

1.3. Effet de la température d'incubation

Selon l'étude de **Bousmeil (2013)** [148], La plupart des résultats démontre que la température optimale pour la production d'enzymes s'est révélée être de 30°C, où la production maximale de protéase mesure 209.333 µg/h/ml qui s'accompagne avec une concentration des protéines de 5.038 µg/ml. Ce qui pose la nature mésophile de l'espèce utilisée. Une production plus faible a été observée à des températures plus basses et plus élevées, associée à une moindre production des protéines qui s'annule à 45°C (**figure 11**).

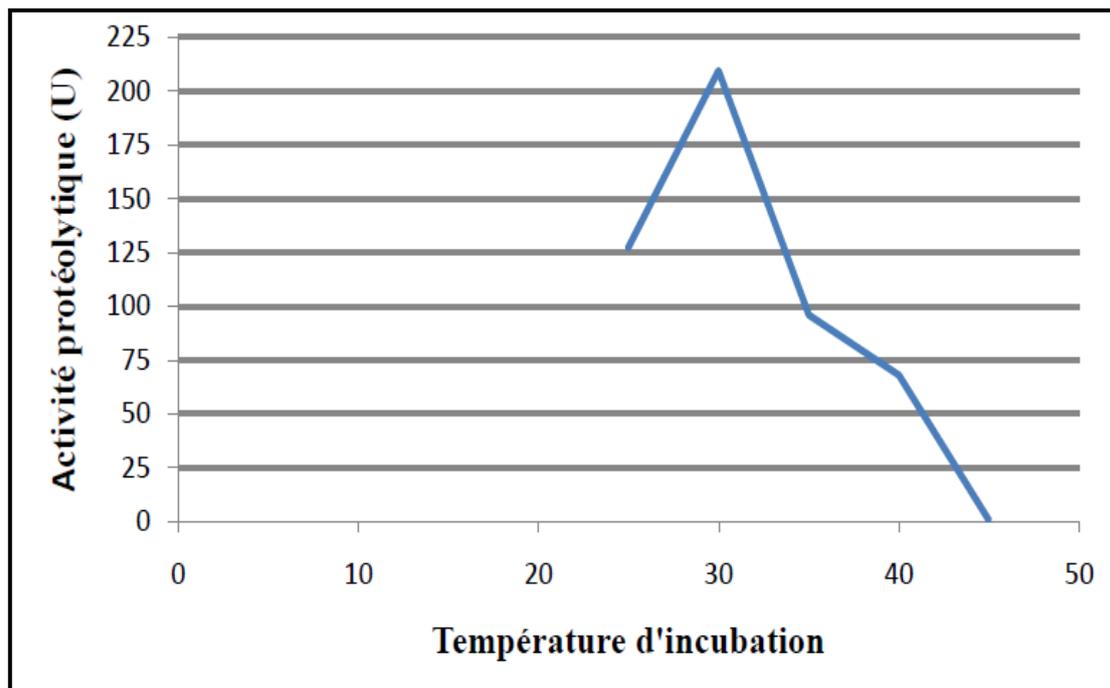


Figure 11: L'effet de la température d'incubation sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* (solution Czapek-Dox, pH= 4) [147].

Cette température optimale est similaire à celles décrites pour *Aspergillus niger* (**Mukhtar & Haq, 2009**) [149], *Penicillium griseoroseum* (**Haq et al., 2004**) [156], et *Aspergillus oryzae* (**Shata, 2005; Vishwanatha et al., 2010**) [157.158] produisant des protéases par fermentation sur milieu solide à base du son de blé. La température d'incubation affecte les performances de la fermentation sur milieu solide; en raison de son importance dans la croissance des microorganismes et la production des métabolites (accélère la vitesse de toutes les réactions enzymatique).

Par rapport à la majorité des études précédentes, des auteurs trouvent que l'activité de la production des protéases d'*Aspergillus niger* par la fermentation sur milieu solide est cessée totalement au delà de la température 40°C. Mais en cours de l'étude de **Berbas et al 2019** [159], elle a diminué sans interruption même avec des températures élevées (50 et 55°C) car la souche d'*Aspergillus niger* a été extraite à partir d'une source chaude (**figure 12**).

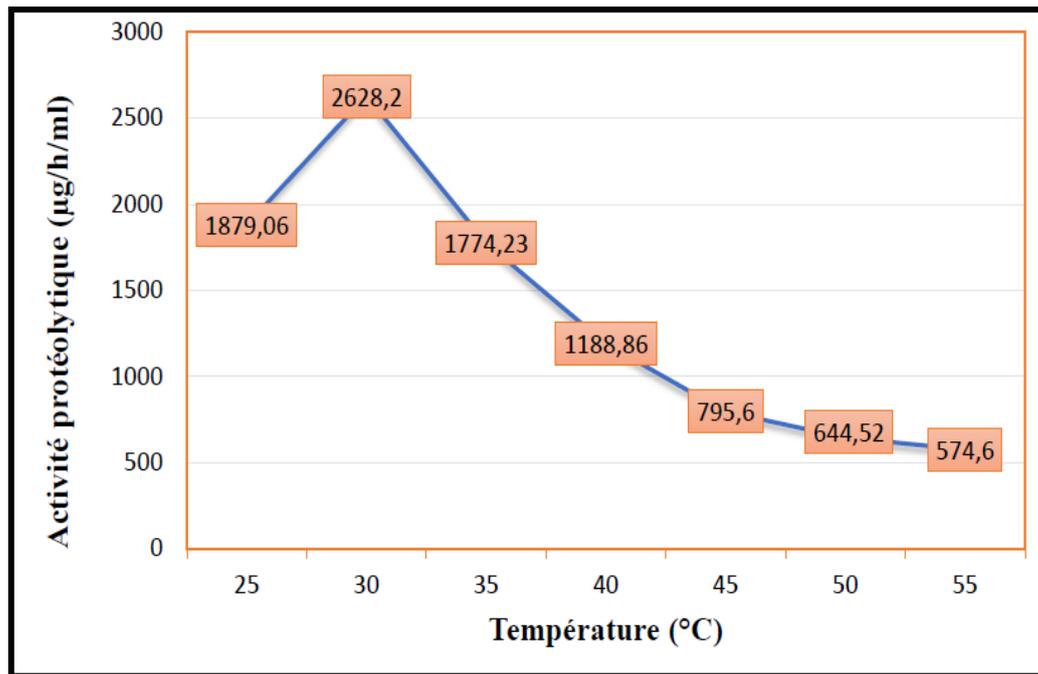


Figure 12 : Influence de la température d'incubation sur la production de la protéase *d'Aspergillus niger* [159].

La production de la protéase *d'Aspergillus niger* à plus basse température est plus avantageuse, car elle entraîne une baisse des taux d'évaporation ce qui évite l'augmentation de la température de fermentation pendant la période d'incubation. Mais, des phénomènes inverses se produisent à des températures élevées: l'élévation de la température dans la masse fermentable due à un dégagement de la chaleur métabolique, provoque un assèchement de la culture, une baisse de l'activité de l'eau (a_w) et de la disponibilité des éléments nutritifs ce qui limite l'aération et induit une croissance limitée voir impossible [148].

1.4. Effet du temps d'incubation

Selon (Rauf1 et al., 2010) [160] les résultats indiquent que la production enzymatique était maximale après 3 jours (169.33 µg/h/ml) avec une concentration protéique de (3.7911 µg/ml). Une diminution progressive des unités enzymatiques a été remarquée avec une augmentation de la période d'incubation suggérant clairement que le rôle de l'enzyme comme métabolite primaire est produit dans la phase de retard de la croissance du champignon pour l'utilisation des nutriments présents dans le substrat solide. La diminution subséquente des unités enzymatiques pourrait probablement être due à l'inactivation de l'enzyme. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Samantha (2005) [161] qui a déclaré une activité enzymatique maximale après 3 jours avec la fermentation à l'état solide (figure 13).

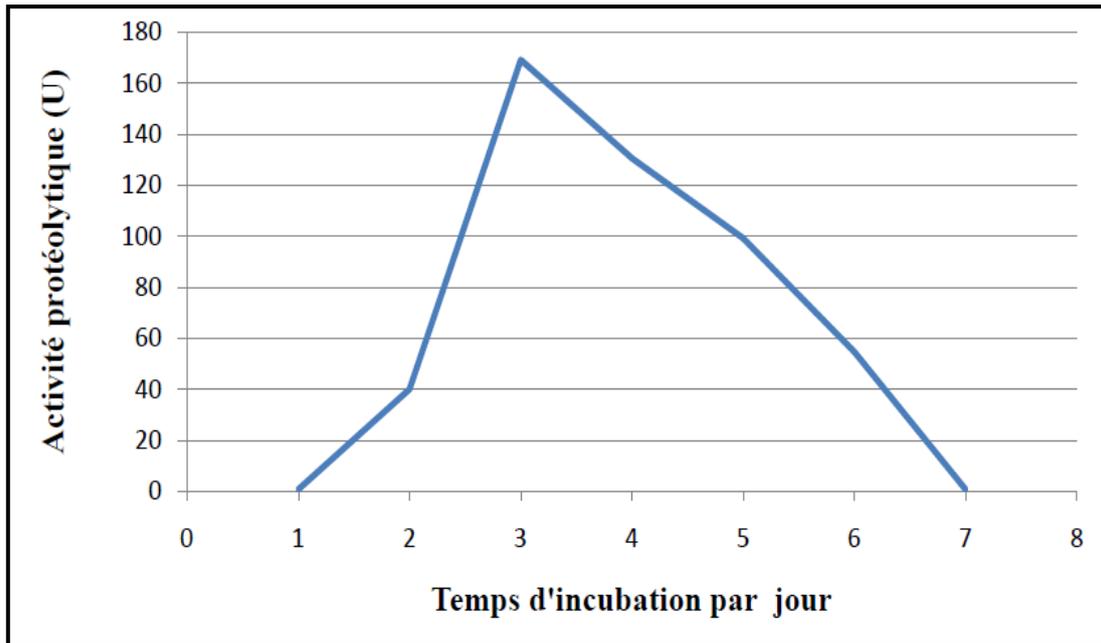


Figure 13: Influence du temps d'incubation sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* (solution Czapek-Dox, 30°C, pH4) [147].

Dans une autre étude on a trouvé que le profil de la production de la protéase d'*Aspergillus niger* et la détermination du temps d'incubation optimum ont été déterminés par incubation des cultures fongiques dans les conditions optimales préalablement établies à différents temps allant de 1 à 7 jours. Le maximum de la production d'enzyme a été observé et remarqué après 72h de la fermentation (**figure 14**).

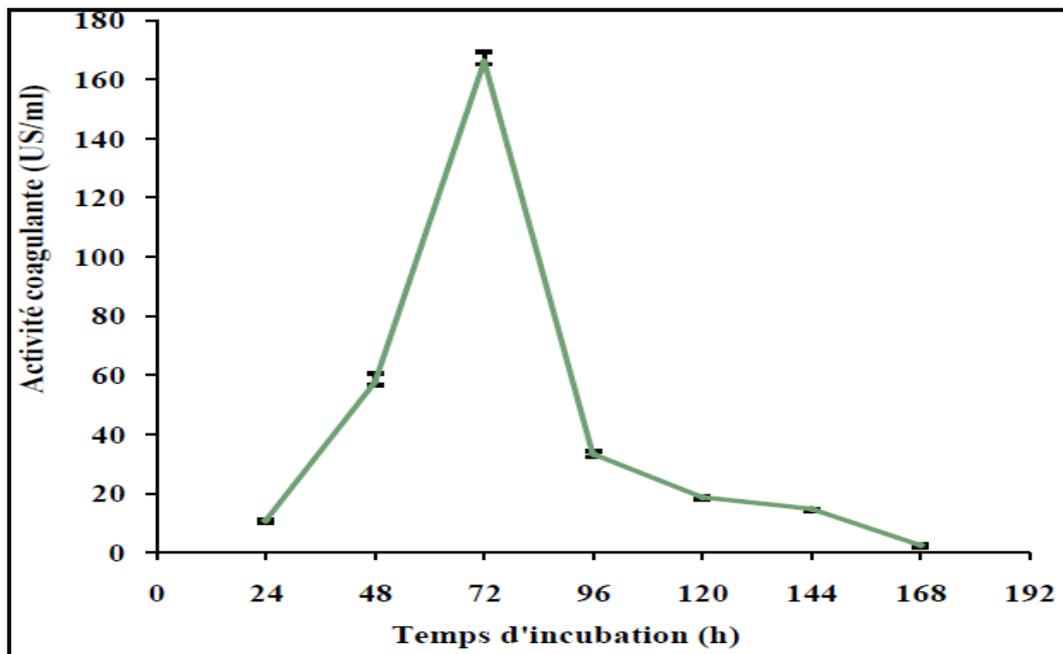


Figure 14 : Influence du temps d'incubation sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* (solution Czapek-Dox, 30°C, pH4, TH=39,21%, 106 spores/ml) [142].

Résultat et discussion

Le même résultat a été obtenu avec *Aspergillus niger* (Moosavi-Nasab *et al.*, 2010) [162] et *Aspergillus oryzae* (Shata, 2005) [157] sur son de blé, *Rhizopus microsporus* sur son de riz (Sumantha *et al.*, 2006) [163] et avec *Aspergillus clavatus* sur milieu liquide (Tremacoldi *et al.*, 2004) [164]. Une diminution progressive de l'activité coagulante 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 optimale a montré un déclin rapide dans le rendement d'enzyme [150 ; 153 ; 163] :

- Cette diminution était probablement impayée à l'épuisement des éléments nutritifs à la disposition des microorganismes;
- L'inactivation d'enzyme par d'autres métabolites toxiques libérés dans le milieu;
- La croissance active du mycélium, étroitement liée à la période d'incubation et des conditions de culture, est importante pour la production des enzymes extracellulaires

1.5. Taux d'humidité du substrat

Un niveau d'humidité de 39,21% a été trouvé optimal pour la production de l'enzyme d'*Aspergillus niger* sur son de blé ($160 \pm 3,512$ US/ml). La figure 15 exprime qu'à des quantités en eau supérieures à l'optimum souhaité, l'activité d'enzyme est validée de manière significative. La teneur initiale d'humidité en *SSF* est un facteur fondamental qui affichée affecte à la fois la croissance microbienne et les rendements en produits. Elle se diffère pendant la fermentation suite à l'évaporation causée par la chaleur métabolique, à l'hydrolyse du substrat et à la production d'eau métabolique [163,165].

L'eau est impliquée dans la croissance cellulaire, les réactions métaboliques, les activités enzymatiques pour le transport des éléments nutritifs, des métabolites extracellulaires et des gaz au cours de la fermentation solide (milieu de diffusion) et entre également dans la constitution du matériel biologique [166]. La faible teneur en eau des cultures solides provoque la diminution de la solubilité du substrat et son degré de gonflement, ce qui réduit son accessibilité au champignon, mais qui évite en même temps les contaminations bactériennes exigeant des taux d'humidité plus importants.

D'autre part, (Sandhya *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2008; Chutmanop *et al.*, 2008; Mahanta *et al.*, 2008; Lazim *et al.*, 2009) [145, 146,153,167,168]. ont été signalés à des teneurs plus élevées, plusieurs phénomènes: la perte de la structure des particules, la diminution de la porosité du substrat, le développement de la rigidité ce qui provoque la diminution des échanges gazeux (transfert d'O₂ et de CO₂) et l'augmentation de développement du mycélium aérien.

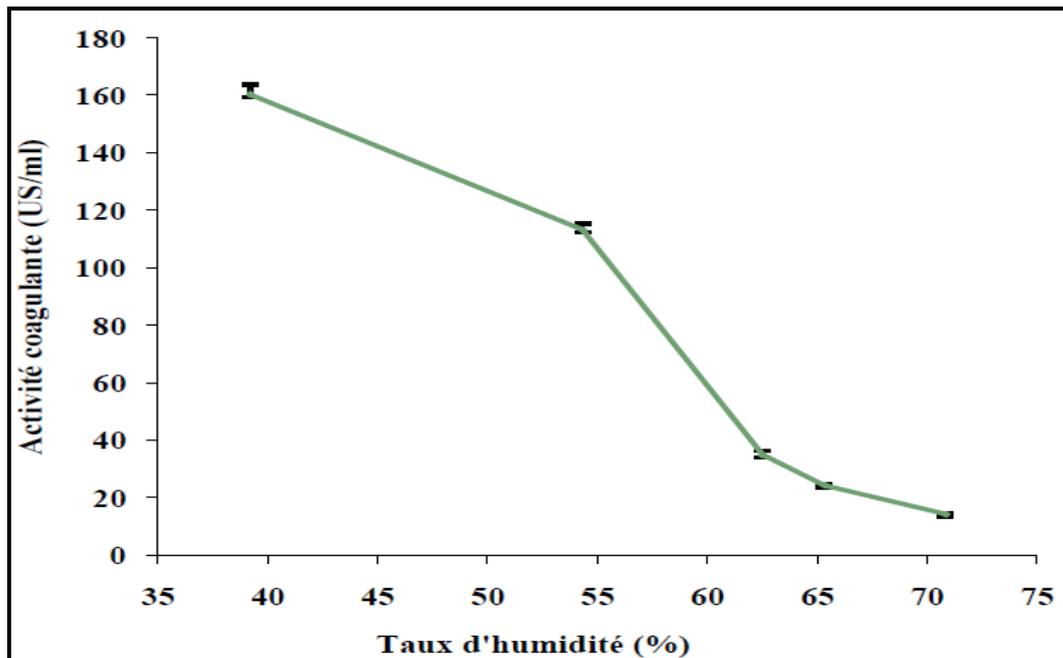


Figure 15 : Effet du taux d'humidité initial sur la production de la protéase d'*Aspergillus niger* (solution Czapek-Dox, 30°C, pH4) [166].

2. Etude de la stabilité

2.1. Stabilité thermique

Les résultats illustrés dans **la figure 16**; montrent que la protéase extraite à partir d'*Aspergillus niger* est thermiquement stable jusqu'à une température de 50°C. Par la suite, une diminution de l'activité a été notée jusqu'à proche l'inhibition totale à 60°C, qui s'explique par la dénaturation de la structure moléculaire de l'enzyme. Le taux de tous les processus physiologiques est augmenté en augmentant la température, mais au-delà de certaines limites, il commence à diminuer car les enzymes sont sensibles à la température. Une enzyme perd ses propriétés catalytiques à haute température en raison de l'étirement et de la rupture finale des liaisons hydrogénées faibles présentes dans la structure enzymatique; Cela entraîne le changement complet de la nature de l'enzyme et les rend inactifs [168].

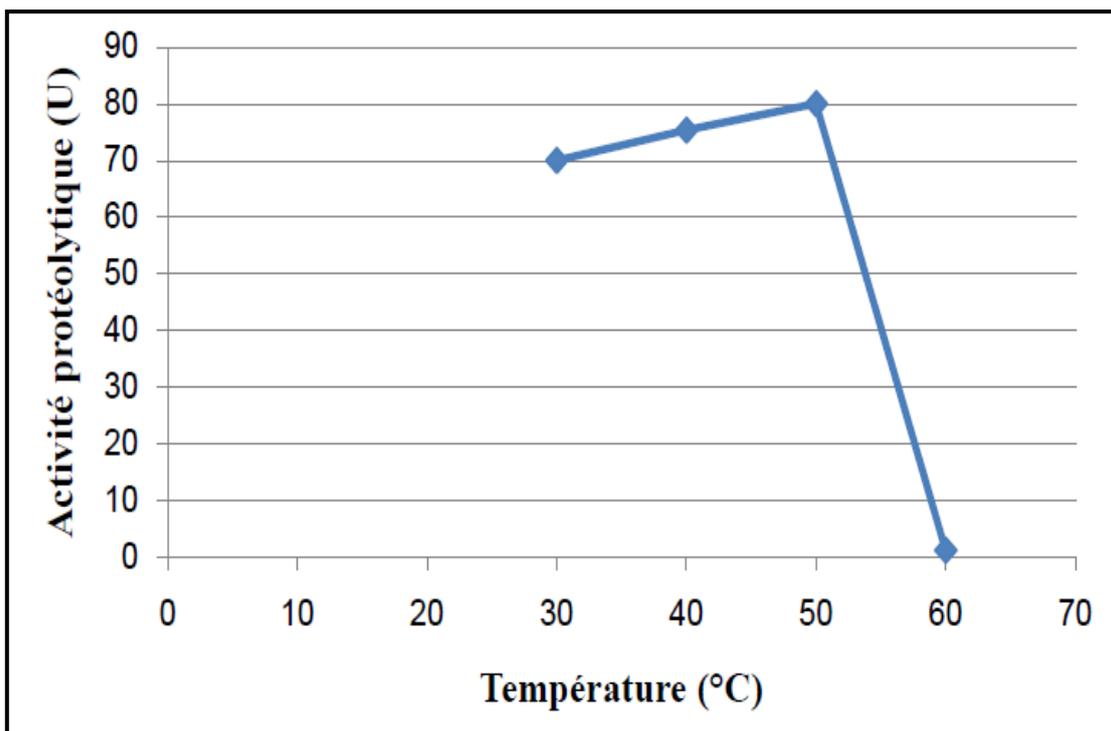


Figure 16: Effet de la température sur l'activité protéolytique de la protéase d'*Aspergillus niger*[147].

La même gamme de la stabilité est indiquée par **Kumar *et al.* (2005)** et **Merheb-Dini *et al.*(2010)** [170 ;171] concernant les enzymes protéolytiques d'*Aspergillus. oryzae* et de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. La protéase d'*Aspergillus niger* F2078 et celle du *Thermoascus auranticus* présentent une stabilité thermique dans l'intervalle compris entre 30 et 60°C [152 ; 171]

2.2. Stabilité vis-à-vis du pH

D'après l'étude de **BENSMAIL (2012)** [142], la protéase acide d'*Aspergillus niger* garde son activité maximale dans l'intervalle du pH compris entre 3 et 5, après incubation des extraits enzymatiques pendant 24h à 4°C dans du tampon citrate de sodium (0,1M). L'augmentation du pH provoque la diminution de l'activité qui disparaît à pH 8.

La même réponse vis-à-vis la variation du pH, est obtenue par **Singh *et al.*, (1994); Fernandez-Lahore *et al.*,(1999) ; Abdellaoui, (2007)** et par **Merheb-Dini *et al.*,(2010)** [152;171 ;172 ;173] .lors d'étude des enzymes coagulantes élaborées par *Aspergillus niger* F2078, *Mucor sp.*, *Aspergillus niger* et *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 respectivement, présentant une bonne stabilité dans l'intervalle du pH 3-6.

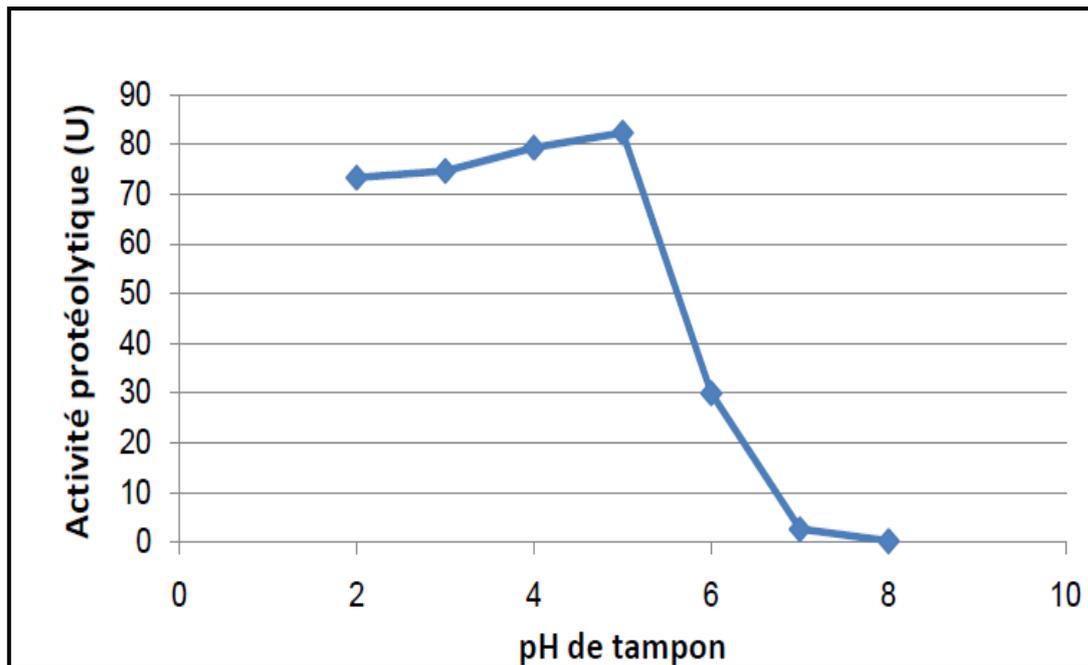


Figure 17: L'influence du pH sur l'activité protéolytique de la protéase d'*Aspergillus niger* [147].

L'enzyme était active de pH 3 jusqu'à 5 comme le montre **la figure 17**. Cela suggère que l'enzyme est active à un pH acide et convient à l'industrie alimentaire et à l'industrie des boissons. L'industrie alimentaire et l'industrie des boissons [174]. Chaque enzyme possède un pH optimal qui donne leur maximum d'activité enzymatique, des changements de ce pH peuvent provoquer une dénaturation de l'enzyme entraînant à la perte d'activité catalytique, et peut aussi causer des changements dans l'état ionique du substrat pouvant entraîner la formation de particules chargées qui ne peuvent pas correspondantes aux sites actifs de l'enzyme, donc le complexe substrat-enzyme ne peut pas former [149].



CONCLUSION

Conclusion

CONCLUSION

Les présentes études ont permis de conclure qu'*Aspergillus niger* était un bon producteur de protéases acides en utilisant des déchets agroalimentaire (son de blé) comme substrat. Une proportion importante en protéines trouve dans le son de blé assure la croissance microbienne et la production des métabolites. La protéase acide produite par *Aspergillus niger* possède les caractéristiques d'une enzyme intéressante à des applications industrielles (pH optimal acide, thermostable).

De l'ensemble des résultats obtenus, on ne déduit que l'activité protéolytique maximale de l'ordre de 169.33 $\mu\text{g/h/ml}$ de l'extrait enzymatique brut produit par *Aspergillus niger* ont a été obtenu en *SSF* à base du son de blé sous les conditions optimales suivantes:

- ✓ Solution minérale du *Czapek-Dox* à pH 4 ;
- ✓ Taux d'humidité 39,21% ;
- ✓ Température de la fermentation 30°C ;
- ✓ Temps d'incubation 72 heures.

On peut dire que nos résultats sont encourageants et qui requièrent plus de travail, mais qui ouvrent également le chemin pour tester la capacité de cette enzyme dans le monde industriel.

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

- ✓ Purifier l'enzyme et étudier sa structure.
- ✓ Tester l'activité de la protéase avec d'autres substrats pour évaluer son éventuel intérêt et applications.



*Références
bibliographiques*



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Anbu P., Annadurai G., Lee J., Hur B. (2008) .*Optimization of alkaline protease production from Shewanella oneidensis MR-1 by response surface methodology. J Chem Tech Biotechnol.* **84**:54-62.
- [2] Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande .V. (1998). *Molecular and biotechnology aspects of microbial proteases.Microbiol Mol Biol Rev.* **3**:597-635.
- [3] Chandel A.K., Rudravaram. R., Rao L.V., Ravindra .P., Narasu M.L. (2007). Industrial enzymes in bioindustrial sector development,An Indian perspective. *J Commer Biotechnol .* **4**:283-291.
- [4] Homaei A., Lavajoo F., Sariri R. (2016). Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *Int. J. Biol. Macromol.* **88**:542-52.
- [5] Singh R ., Kumar M., Mital A., Mehta P.K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century 3 *Biotech .***2**:174.
- [6] Ikasari L., Mitchell D.A. (1996) .Leaching and characterization of Rhizopus oligosporus acid protease from solid-state fermentation.*Enzyme Microb Technol.* **19**:171-175.
- [7] Castro. R.J.S., Ohara A., Nishide T.G., Bagagli M.P.,Gonçalves Dias F.F., Sat H.H. (2015).A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* **04**: 678-684.
- [8] Benazir J. F., Suganthi R., Anjana H., Ramesh K. V., Aswathi M.P.,Niraimathi G., Mala M.K., Sukanya S., Santhi R. (2011). Bio utilization of agroindustrial waste in solid state fermentation by *Aspergillus niger* for the production of protease. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources .***04**: 422-435.
- [9] Castro.R.J.S., Nishide T.G., Sato H.H. (2014). Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.***04** :236-245.
- [10] Al-Shehri M.A. (2004). Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Tihamet Aseer.*Pakistan J. Biol. Sci.* **07**: 1631-1635.
- [11] Singh R., Suprabha G.N., Shashidhar S. (2009). Optimization of process parameters for the production of a- amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation, *Afr . J.Microbiol. Res.* **3**:498–503 .
- [12] Mamo G., Gessesse A. (1999). High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. *Enzyme and microbial technology.***25** :68-72.

Références bibliographiques

- [13] Arikan B., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gülnaz O. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry* **38** : 1397-1403.
- [14] Jaspard E., Lei W., Franpois A-G. (1993). Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *Journal of Biological Chemistry*. **13**: 9496-9503.
- [15] Schechter. I., Berger. A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. **27**: 157-162
- [16] Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas MC., McCarthy I., Del Rio LA. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**:521-30.
- [17] Pelmont. J. (1995). Enzymes: catalyseurs du monde vivant. *Presse Universitaire de Grenoble*. **621** : 652-654.
- [18] Mukherjee A. K., Adhikari .H., Rai S. K. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*. **39**: 353-361.
- [19] Benedykt W., Katarzyana P. (2008). Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & Molecular Biology Letters*. **13**: 212-229.
- [20] Reddy L. V., Wee Y.J., Yun J. S ., Ryu H. W. (2008). Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Placket Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*. **99**: 2242-2249.
- [21] Wilkesman J., Kurz L. (2009). Protease Analysis by Zymography: A review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology*. **03**: 175-184.
- [22] Kumar G. A., Nagesh N., Prabhakar T. G., Sekaran G. (2008). Purification of extracellular acid protease, an analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresource Technology*. **99**: 2364-2372.
- [23] Coral G., Arikan B., Ünaldi M. N., Güvenmez H. (2003). Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*. **4**: 491-498.
- [24] Sumantha A., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C. R., Pandey A. (2005). Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology*. **4**: 313-319.
- [25] Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G ., Pandey A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. **40**: 2689-2694.

Références bibliographiques

- [26] Gupta R., Beg Q. K., Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **59**: 15-32.
- [27] Aguilar C. N., Gerardo G. S., Plilia A., Raul R. H., José M. H., Juan C. E. (2008). Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. **4** : 354-366.
- [28] Domsalla A, Melzig M.F. (2008). Occurrence and properties of proteases in plant lattices. *Planta Med*. **74**:699-711.
- [29] Pardo M.F., Lopez M.I., Canals F., Zviles F.X., Natalucci C.L., Caffini N.O. (2000). Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**:3795-800.
- [30] Ros-Moreno R. M., Vázquez-López C., Giménez-Pardo C., Armas-Serra C. D., Rodríguez-Caabeiro F. (2000). A study of proteases throughout the life cycle of *Trichinella spiralis*. *Folia Parasitologica*. **01** : 49-54.
- [31] Lee K. L., Albee K. L., Bernasconi R. J., Edmunds T. (1997). Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. *The Biochemical Journal*. **01**: 199-202.
- [32] Alais C. (1975). Sciences du lait. Principes et techniques laitières. *Masson*. Paris. P. 108-645.
- [33] Scriban. R. (1993). Biotechnologie. 4ème édition. Techniques et Documentation. Paris. 133p.
- [34] Mitchel R. E J., Chaiken I. M., Smith E. (1970). The complete amino acid sequence of papain. Additions and corrections. *The Journal of Biological Chemistry*, **14**: 3485-3492.
- [35] Uhlig H. (1998). Industrial enzymes and their applications. New York: Willey & Sons. 472 p.
- [36] Van der Hoorn RAL. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. **59**:191–223.
- [37] Monteiro P. (2015). Biotechnology perspective of fungal proteases. *Microbiologie*. **02** : 337-346.
- [38] Otsuki N., Dang N.H., Kumagai E., Kondo A., Iwata S. and Morimoto C. (2010). Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacol*. **127**:760–7.
- [39] González-Rábade N., Badillo-Corona J.A., Aranda-Varradas J.S., Oliver-Salvador M.C. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro a review. *Biotechnology Advances* **6**: 983-996.

Références bibliographiques

- [40] Foroughi F., Keshavarz T. and Evans CS. 2006. Specificities of proteases for use in leather manufacture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* , **81**: 257-61.
- [41] Salas CE, Gomes MTR, Hernandez M, Lopes MTP. 2008. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*. **12**:2263-9 .
- [42] Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biology Rev.* **3**:597-635.
- [43] Mala. B. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol and Molecular Biology Reviews.* **3**:597-635.
- [44] Timothy D. H., Giuseppe S., Luigi G. S., Alessandro M., Cheryl C., Robert S. S. (2005). *Extracellular Proteases in Atherosclerosis and Restenosis.* **06**: 1119-27.
- [45] Stöppler M.C. (2021). DEFINITION OF ENDOPEPTIDASE. [Enligne]. <https://www.rxlist.com/endopeptidase/definition.htm> (Consulté le : 12/06/2021).
- [46] Hoyos M P., Hernáiz A J., Alcántara R. (2017). *Industrial Biotechnology and Commodity Products.* **3**:334-373.
- [47] Boulaftali Y. (2012). La protéase nexine-1 : une serpine clé dans l'hémostase et la biologie vasculaire. *Hématologie* . **6** :318-324.
- [48] Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (2009). Food chemistry. 4ème édition Springer Verlag Berlin P.1070p.
- [49] Rajnikant D., Kailash C. P. (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. **07**:107.
- [50] Alnahdi S. (2012). Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated Bacillus sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* **9** :71-74.
- [51] Ishtiaq A. (2011). Characterization and detergent compatibility of purified protease produced from *Aspergillus niger* by utilizing agro wastes. *Bio Resources.* **4**:4505- 4522.
- [52] Kumar C.G., Takagi H. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bio industrial view point. *Biotechnology Advances.* **17**: 561-594.
- [53] Sumantha A., Larroche C., Pandey A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food- grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology.* **2**: 211-220.
- [54] Vishwanatha K. S., Rao A. G., Singh S. A. (2009). Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry.* **114**: 402-407.
- [55] Jisha V.N., et al. (2013). Versatility of microbial proteases. *J Adv Enzyme* . **3**: 39-51.

Références bibliographiques

- [56] Kumar D., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C. (2008). Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.* **12**: 661–672.
- [57] James Q., Del R. (2013). Application of Protease Technology in Dermatology. **6** : 14-22.
- [58] Rajendra S., Anshumali M., Manoj K., Praveen K M.(2016). Microbial Proteases in Commercial Applications. *J Pharm Chem Biol Sci.* **3**:365-374.
- [59] Neelakantan S., Nohanty A. K., Kaushik J. K. (1999). Production and use of microbial Enzymes for dairy processing. *Current Sciences.* **77**:143-148.
- [60] Merheb C. W., Cabral H., Gomes E., 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.
- [61] Kim J., Alizadeh P., Harding T., Hefner-Gravink A., Klionsky DJ. (1996) Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. *Appl Environ Microbiol.* **05**:1563-9.
- [62] Abdul R., Sadia S., Arfan A., Qurban A., Muhammad S., Arif M., Muhammad A. (2019). Microbial Proteases Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **07**:110.
- [63] Durand G., Monson P. (1982). *Les enzymes: production et utilisations industrielles.* Bordas. Paris. **52**: 36-153.
- [64] Ducroo P. (1983). Industrial use of enzymes. *Microbial enzymes, industrial applications, world market.* **06**: 401- 416.
- [65] Dunn B.M. (2013). Encyclopedia of Biological Chemistry. *Second Edition.* 137-140 p.
- [66] Gams W., Christensen M., Onions A. H., Pitt J. I., Samson R. A. (1986). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics.* 55-62p.
- [67] Rahul.P., Jha S. N. (2014). Basics of the genus *Aspergillus*. *International Journal of Research in Botany.* **2**:26-30.
- [68] Chi-Ching.T., James Y.M.T., Susanna K.P.L., Patrick C.Y.W. (2018). Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. **16**:197-210.
- [69] Halewyn M-A., Chevalier P. (2021). *Aspergillus niger*. [En ligne]. <https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/aspergillus-niger> . (Consulté le : 26/06/2021).
- [70] Pane.B., Sourabie. O., Philippe.A., Nikiem. A., Alfred. S., Traor.E. (2011). Caractérisation de souches d'*Aspergillus sp* isolées des grains d'arachides cultivées au Burkina Faso, Afrique de l'Ouest. *International Journal of Biological and Chemical Science.* **3**: 1232-1249.

Références bibliographiques

- [71] Perfect J. R., Cox G. M., Lee J. Y., Kauffman C. A., Chapman S. W., Morrison V.A.(2001). The Impact of Culture Isolation of *Aspergillus* Species: A Hospital-Based Survey of Aspergillosis. 33: 1824–1833.
- [72] Mary A. S., Lima M Conceição F. de OliveiraAntônia T. Á. PimentaPaula K. S. Uchôa.(2019). *Aspergillus niger*: A Hundred Years of Contribution to the Natural Products Chemistry. **10**: 2029-2059
- [73]Ward O. P., Qin W. M., Dhanjoon J., Ye J., Sing A. 2006. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology* .**58**: 1-75.
- [74] Halewyn M-A.,Chevalier P.(2021). *Aspergillus niger*. [En ligne]. <https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/aspergillus-niger> . (Consulté le : 29/06/2021).
- [75]Al-Mussalam A. (1980).Revision of the black *Aspergillus* species. PhDThesis. Rijks universiteit. Utrecht
- [76]Koji. Y., Wang.L., Makoto. M., Kazuko. N.(2001).Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology Letters* . 200:241-246.
- [77]Chabasse D., Guiguen C.,Contet-Audonneau. N. (1999). Mycologie médicale. Ed MASSON, Paris, 324p.
- [78] Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. (2004). Introduction to food- and airborne fungi Septième édition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 389 p.
- [79]Leyral G., Vierling E.(2007). Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4^{ème} édition. 290 p.
- [80]Masayuki M., Katsuya G. (2010). *Aspergillus*: molecular biology and genomics. Edition Caister Academic Press, Norfolk (England).
- [81]Bensmail S.(2012). Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Thèse de magistère.Université M'hamed Bougara de Boumerdès.41-46 p.
- [82]Abarca L. M., Francesc A., José C.,Cabañes J. F. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilla. *Antonie van Leeuwenhoek Kluwer, Academic Publisher*.**86**: 33-49.
- [83]Pasqualotto A. C. (2010). Aspergillosis: from diagnosis to prevention. Edition Springer Science & Business Media, New York . 1027p.
- [84]Herman J. P., Johannes H .W., Hein .S .(2007).Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. 25:221-231.

Références bibliographiques

- [85] Meyer A., Deiana J., Bernard A. (2004). Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. 2ème Ed Doin. 430 p.
- [86] Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C., Van Dijk P.W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 426-435.
- [87] Ayesha K., Ikram U.H., Waseem A.B., Sikander A. (2003). Isolation and screening of *Aspergillus niger* isolates for xylanase biosynthesis. *Biotechnology*. **02**: 185-190.
- [88] Durand A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* .**13**: 113-125.
- [89] Gervais P., Molin P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* **13**: 85–101.
- [90] Rahardjo Y.S.P., Tramper J., Rinzema A. (2006). Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.* **02**: 161-179.
- [91] Ashok P. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. **13**: 81-84.
- [92] Bellon-Maurel V., Orliac O., Christen P. (2003). Sensors and measurements in solid-state fermentation: a review. *Process Biochem.* **38**: 881-896.
- [93] 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.* **02**: 281-294.
- [94] Hongzhang, Chen. (2013). Modern Solid State Fermentation. Beijing, China, People's Republic . 332p.
- [95] Durand A. (1998). La fermentation en milieu solide. *Biofutur*. **1998** : 41-43.
- [96] Couto S. R., Sanromán Á. M. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of food Engineering*. **68**: 291-302.
- [97] Wang .L., Yang S.-T., (2007). Solid-state fermentation and its applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. **04**: 465- 489.
- [98] 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.* **02**: 281-294.
- [99] Sagar A. (2021). Microbe Notes. [En ligne]. <https://microbenotes.com/solid-state-fermentation-ssf/> (Consulté le 07 Juin 2021).
- [100] Raimbault . M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. **03**: 174-188.

Références bibliographiques

- [101]Manpreet.S., Sawraj. S., Sachin. D., Pankaj .S.,Banerjee U. C. (2005). Influence of Process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*.**02**: 1-9.
- [102]Nee N., Poonam S., Ashok P. (2009).Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*. Springer, Dordrecht. 197-22.
- [103]Graminha E. B., Gonçalves A. Z., Pirotta R. D., Balsalobe M. A., Da Silva R. Gomes E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition.*Animal Feed Science and Technology*. **144**: 1-22.
- [104] Doelle H.W., Mitchell D.A. Rolz C.E.(1992). Solid Substrate Cultivation. Elsevier Sci. Publ. ltd;London & New York; 466 p.
- [105]Chen HZ., He Q., Liu LY. (2011).Cellulase production from the corn stover fraction based on the organ and tissue. *Biotechnol Bioprocess Eng*.**16**:867–74
- [106]Chen HZ, He Q. (2012).Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. *J ChemTechnol Biotechnol*.12:1619–25.
- [107] DURAND A. (1998). La fermentation en milieu solide. *Biofutur* . **1998** : 41-43.
- [108]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*.03: 105
- [109]Sumantha. A., Sandhya. C., Szakacs.G., Soccol C. R., Pandey. A. (2005). Production and partial purification of a neutral metallo-protease by fungal mixed Substrate Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*.**04**: 313–319.
- [110] Abdellaoui R. (2007). Obtention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait d'*Aspergillus niger* isolé du sol de la région de Boumerdès. Mémoire de magister, UMBB, P.75.
- [111] Tien M., Kirk T. K. (1988). Lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium. *Methods in enzymology*.**161**:238-249.
- [112]BOUTERA Z .,SADDALAHE S. M. (2017). Optimisation de production de protéase acide par l'*Aspergillus niger* sur milieu solide .Thèse de Master. *Université Echahid Hamma Lakhdar El OUED*. 26 p.
- [113]Iqbal J., Haq I., Javed M.M., Hameed U., KhanA.M., Parveen N. Khan T. S. (2015). Isolation of *Aspergillus niger* Strains from Soil and their Screening and Optimization for Enhanced Citric Acid Production Using Cane Molasses as Carbon Source, *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. **04**: 128-137.
- [114] Oyeleke S.B., Egwim E.C., Auta S.H. (2010).Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *J Microbiol*

Références bibliographiques

*Antimicrob.***02**: 83–87.

[115]TOUATI R. (2016). Isolement et Identification des Moisissures d'une Zone Aride. Thèse de Master.Université des Frères Mentouri Constantine. 12-14 p.

[116] Haichour N. (2020). Techniques de Contrôle Microbiologique. [En ligne]. <http://cte.univ-setif.dz/moodle/mod/folder/view.php?id=19860>. (Consulté le 05Juin 2021).

[117]Boutton B., Breton A., Fevre, M., Gauthier S., Reymend P., Sanglier J.,Vayssier Y., Veau P.(1990). Moisissure utiles et nuisibles Importance industrielle. 2ème *Ed Masson* Paris Millan Barcelone Mexico.93p.

[118] Aissi M., Bouchara J. P., Tronchin G., Larcher G., Vigny J., Chabasse D. (2002). Etude in vitro d'une expoprotéase d'*aspergillus fumigatus* dégradant les protéines constitutives de membranes basales. *Sciences & Technologie*. **18** :85-90.

[119] Perrin J-F.(2013). TP Dosages Protéines totales d'un échantillon. [En ligne]. <https://fr.scribd.com/document/400972611/Tp-Dosages-Proteines-Abs> .(Consulté le 29 Juin 2021).

[120] Nygren C. M., Edqvist J., Elfstrand M., Heller G. and Taylor A. F.(2007). Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* .**17**:241-248.

[121]Desmazeaud M.,Hermier J. (1968). Isolment, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *micrococcus caseolyticus*. *ann. biol. anim. bioch. Biophys.***04** : 565-577.

[122]Belmessikh A.(2011). 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. Thèse de magistère, Université Mentouri Constantine, 129p.

[123] Belmessikh A. (2011). 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. Thèse de magistère, Université Mentouri Constantine, 129p.

[124] Kurien B.T. (2009). [Protein blotting and detection: methods and protocols](#). New York: Humana Press. 588 p.

[125] Ellaiyah P., Srinivasulu B., Adinarayana K.C. (2002) .A review on microbial alkaline proteases, *J. Sci. Ind. Res.* **61**: 690–704 .

[126] Fern´andez-Lahore H. M., Fraile E. R., Cascone O. (1998). Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. *Journal of Biotechnology*. **62** :83- 93.

[127] Bouhadi N., Nouani A., Benmalek N., Benchabane A. (2016). Valorisation des sous-produits d'agrumes : production d'enzymes pectinolytiques par bioconversion. *Algerian journal of environmental science and technology*. **01**:148-154.

Références bibliographiques

- [128] Bouharoune K. (2016). Contribution à la production d'enzymes pectinolytiques par fermentation sur deux milieux solides. Thèse de Master Université M'Hamed Bougara Boumerdes. 79 p.
- [129] Guezlane N., Kahlouche B., Athmani R (2016). Microbiologie (travaux personnel 2eme année TCB et LMD). *Edition Office des Publications Universitaires*. 94p.
- [130] Oyeleke S.B., Egwim E.C., Auta S.H. (2010) Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *J. Microbiol. Antimicrob.* **2** :83-87 .
- [131] Oyeleke S.B., Erena N.B., Manga S.B., Sule S.M. (2014). Isolation and characterization of extracellular protease producing fungi from tannery effluent. *Rep. Opin.* **6**: 34-38.
- [132] Ali S.S., Vadhale N.N. (2013) .Protease production by *Fusarium oxysporum* in solid state fermentation using rice bran, *Am. J. Microbiol. Res.* **1**: 45-47 .
- [133] Sharma K.M., Kumar R., Vat S., Gupta A. (2014) . Production, purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus aryabhatai* k3. *J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* **3** :290-298.
- [134] Mohammed R., Taher M.T., Adel E., Usama M.A. (2015) Optimization partial purification and characterization of Halo-thermophilic alkaline protease from moderately halophilic bacterium AH10 isolated from Alexandria (Egypt). *J. Curr. Microbiol.* **4**:304-317.
- [135] Lakshmi N., Rajani P. (2012) .Production of protease from sesame oil cake by *Penicillium chrysogenum* under solid state fermentation, *Int. J. Chem. Environ. Pharm. Res.* **03**:137-141.
- [136] Abirami V., Meenakshmi S.A., Kanthymathy K., Bharathidasan R., Mahalingam R., Panneerselvam A. (2011). Partial purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium janthinellum* and *Neurospora crassa* . *J. Exp. Biol.* **1**: 114-123
- [137] Ammar M. S., El-Safey E. M. (2004). PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF α -AMYLASE ISOLATED FROM *ASPERGILLUS FALVUS* VAR. *COLUMNARIS*. **07**:93-100.
- [138] Chimbekujwo K.I., Ja'afaru M.I., Adeyemo O.M. (2020) .Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. **08**:1-8.
- [139] Lakba H., Soucha H. (2015). *Production des protéases par les mycètes isolés de milieux sahariens*. Thèse de master . *Université des frères Mentouri Constantine*. 69p.
- [140] Srinubabu G., Lokeswari N., Jayaraju K. (2007). Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *E-journal of chemistry*. **02**:208-215.

Références bibliographiques

- [141] MAES C., DELCOUR J.A. (2001). Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction of Wheat Bran Non-starch Polysaccharides. *Journal of Cereal Science*. **34** : 29-35.
- [142] Bensmail S.(2012). Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation, Thèse de magistère. Université M'hamed Bougara de Boumerdès. 141 p.
- [143] Tunga R., Banerjee R., Bhattacharya B. C. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid-state fermentation. *Bioprocess Engineering*.**19**: 187-190.
- [144] Attrassi K., Selmaoui K., Ouazzani A., Badoc A., Douira A. (2005). Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. *Bull Soc Pharm Bordeaux*. **83**: 47-62.
- [145] Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A.(2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*.**40**: 2689-2694.
- [146] Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y., Srinophakun P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agro-industrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **83**:1012–1018.
- [147] BOUTERA Z., SADDALAHE S. M.(2017). Optimisation de production de protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide. Thèse de Master. Université Echahid Hamma Lakhdar-El OUED. 39-41p.
- [148] Bensmail S., Nouar H.K., Bouchenak K., Fazouane -Naimi F.(2013). Etude de l'aptitude fromagere d'un extait enzymatique coagulant produit par *Aspergillus niger* FFB1. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn* **7** : 98-119.
- [149] Mukhtar H., Ikram U H. (2009). Production of Acid Protease by *Aspergillus niger* Using Solid State Fermentation. *Pakistan J. Zool*. **4**:253-260.
- [150] Paranthaman R., Alagusundaram K., Indhumathi J.(2009).Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences***5** .**03**: 308-312.
- [151] Chandrasekaran S., Kumaresan S.S.P., Manavalan M.(2015).Production and Optimization of Protease by Filamentous Fungus Isolated from Paddy Soil in Thiruvavur District Tamilnadu. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* **06**: 066-069.
- [152] Singh A., Ghosh V. K and Ghosh P. (1994). Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters in Applied Microbiolog*. **18**: 177-180.
- [153] Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., and Limam F. (2009). Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces sp.* CN902. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **36**: 531-537.

Références bibliographiques

- [154] Elibol M. and Moreira A. R. (2005). Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. **40**: 1951-1956.
- [155] PATIL, M., & Shastri, N. V. (1981). Extracellular Production of Proteases by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. *Journal of fermentation technology*.**05**:403-406.
- [156] Haq I. H., Mukhtar Z. A., Riaz N. (2004). Protease biosynthesis by mutant strain of *Penicillium griseoroseum* and cheese formation. *Pakistan J. Biol. Sci.* **07**: 1473–6.
- [157] Shata Hoda M. A. (2005). Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae*. *Polish Journal of Microbiology*.**03**: 241-247.
- [158] Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G., Singh S.A. (2010). Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J Ind Microbiol Biotechnol*. **37**:129–138.
- [159] BERBAS.A., MEGHAZI N.H. (2019). Optimisation de la production de protéases par *Aspergillus niger* sur milieu solide : caractérisation et application. . Thèse de Master. Université Mohamed Khider de Biskra.26-33.
- [160] Rauf A., Irfan M., Nadeem M., Ahmed I., Iqbal H. M. N. (2010). Optimization of growth conditions for acidic protease production from *Rhizopus oligosporus* through solid state fermentation of sunflower meal. *International Journal of Agricultural and Biological Sciences*.**01**:506-509.
- [161] Sumantha A., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C. R., Pandey A. (2005). Production and partial purification of a Neutral metallo-protease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology*.**04**: 313-319.
- [162] Moosavi-Nasab M., Radi M., Jouybari A. (2010). Investigation of enzyme modified cheese production by two species of *Aspergillus*. *African Journal of Biotechnology*.**04**: 508-511.
- [163] Sumantha A., Deepal P., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C. R. and Pandey A. (2006). Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **05**: 843-851.
- [164] Tremacoldi C. R., Watanabe N. K., Carmona E. C. (2004). Production of extracellular acid proteases by *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.**20**: 639-642.
- [165] Mukherjee A. K., Adhikari H., Rai S. K. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal* .**39**: 353-361.

Références bibliographiques

- [166] 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.***02**: 281-294.
- [167] Sharma A., Vivekanand V. and Singh Rajesh P. (2008). Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. *Bioresource Technology*. **99**: 3444-3450.
- [168] Mahanta N., Gupta A., Khare S. K. (2008). Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresource Technology*. **99**: 1729-1735.
- [169] Conn E.E., Stumpf P.K. (1972). *Outlines of Biochemistry*. 5^{ème} édition. Biochemical education. 544p.
- [170] Kumar A., Sharma J., Mohanty K. A., Grover S., Batish V. K. (2006). Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*.145: 108-113.
- [171] Merheb-Dini C., Gomes E., Boscolo M., da Silva R. (2010). Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). *Food Chemistry*. 120: 87-93.
- [172] Fernandez-Lahore H. M., Auday R. M., Fraile E. R., Biscoglio de Jimenez M., Bonino L., Pirpignani., Machalinski C., Cascone O. (1999). Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor sp.* solid-state cultures. *Journal of Peptides Research*.53: 599-605
- [173] Abdellaoui R. (2007). Obtention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait d'*Aspergillus niger* isolé du sol de la région de Boumerdès. Thèse de de magister. UMBB. 75
- [174] Mamo J., Assefa F. (2018). The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. *Journal of Food Quality*.**2018**.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Titre

Optimisation de production de protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide

Résumé

Les protéases, également appelées protéinases ou enzymes protéolytiques, appartiennent à un groupe d'hydrolases. Elles peuvent être appliquées dans de nombreux domaines industriels. Les protéases acides sont les plus connues produites par *Aspergillus niger*, l'espèce fongique la plus répandue en industrie capable de synthétiser une multitude de métabolites d'intérêt économique majeur. La fermentation en milieu solide (FMS) est la méthode la plus efficace pour la production de protéases.

Le but ultime de cette étude est d'optimiser la production des protéases par *Aspergillus niger* isolé selon le procédé de la fermentation solide à base des résidus agroalimentaire (son de blé) comme substrat solide, ceci est dans le but de diminuer le coût de production de ces enzymes. Aussi, ces substrats sont riches en nutriments, a été optimisée de façon à obtenir la meilleure activité protéolytique, Un essai de purification et une caractérisation biochimique de l'enzyme ont été également effectués.

Au vu des résultats des études précédentes, montrent que la meilleure production de cette enzyme (169.33 µg/h/ml) a été obtenue sur milieu à base de son de blé, humidifié à un taux de 39,21% par une solution minérale *Czapek-Dox* à pH 4 incubé à 30°C pendant 72 heures. Il présente une stabilité dans la gamme du pH 3,0-5,0 à 4°C pendant 24 heures dans le tampon citrate de sodium (0,1M) et une stabilité thermique jusqu'à 50°C pendant 1 heure.

Mot clés : *Aspergillus niger*, Isolement, Optimisation, fermentation sur milieu solide (FMS), Protéase acide, activité protéolytique.

Membre du jury :

Président du jury : Mme Abdelaziz .W (M.C.B-UFM Constantine).

Rapporteur : Mlle Maziani .M (M.C.B - UFM Constantine).

Examineurs : Mme Benkahoul .M (M.C.A- UFM Constantine).

Présentée par :

Chemmaa Lina Maria

Djaia Haifa Nesrine

Mazaache Hadjer

Année universitaire : 2020-2021