

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية والخلوية  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et  
Biologie Moléculaire et Cellulaire

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

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie.  
**Filière :** Sciences Biologiques.  
**Spécialité :** Biochimie.

N° d'ordre :  
N° de série :

Intitulé :

---

## **Production et caractérisation d'une protéase acide à partir d'*Aspergillus flavus***

---

Présenté par : BOUDRAA Hind  
LEDRAA Maroua

Le 28/06/2022

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** BELAHMADI M<sup>ed</sup> Seddik Oussama Maitre de recherche B- C.R.Bt

**Co- encadreur :** BENCHIHEUB Meriem

MCB -Université Frères Mentouri, Constantine1.

**Examineur 1 :** BENKAHOUL Malika

MCA -Université Frères Mentouri, Constantine1.

**Examineur 2 :** GUENDOUZE Assia

MCB -Université Frères Mentouri, Constantine1.

**Année universitaire  
2021 – 2022**



The greatest pleasure in life is doing what people say  
you cannot do.

-Walter Bagehot-

Notre plus grande faiblesse est d'abandonner. Le  
moyen le plus sûr de réussir est toujours d'essayer  
juste une fois de plus.

- Thomas Edison -



## *Remerciements*

*Le grand merci revient toujours à notre **Allah** qui nous a donné le courage, la santé, la force, la patience et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*Il nous est agréable d'exprimer nos remerciements les plus sincère à notre encadreur Mr **BELAHMADI Mohamed Seddik Oussama** -Maitre de recherche B- au Centre de Recherche en Biotechnologie « C.R.Bt » pour sa disponibilité, son savoir –faire, ses conseils, sa compétence, son soutien moral, et l'attention particulière avec lequel il a suivi et dirigé ce travail et a permis son aboutissement à temps.*

Nous tenons à remercier Mme **BENCHIHEUB Meriem** notre Co-encadreur pour son engagement à nos côtés, pour son enseignement et son soutien tout au long de ce mémoire. Merci à vous pour l'attention constante avec laquelle vous avez suivi la progression de notre travail.

Nos sincères remerciements vont à tous les professeurs, ingénieurs et personnels appartenant au Centre de Recherche en Biotechnologie « C.R.Bt » qui nous ont aidés dans la réalisation de ce travail.

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

Un Merci particulier à les examinateurs de ce mémoire ; Mme **GUENDOUZE Assia** et Mme **BENKAHOUL Malika**, pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

# HIND

À mon créateur **الله** le Tout Puissant

*Je m'incline devant votre grâce Seigneur car votre bénédiction  
M'a permis de mener à terme ce travail tous les jours de ma vie,  
Ta bonté et ta générosité me suivent partout.*

**Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect,  
la reconnaissance, c'est tout simplement que : Je dédie se modeste  
travail**

À Mon très cher Père **Taher** (رحمة الله)

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Pour tous les moments où tu n'as jamais épargné le moindre effort mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années. Ta bonté, ta tendresse, ton affection et grandeur d'âme. J'espère être la fille que tu as voulu que je sois. Papa ce travail je le porterai fièrement et je te le dédie tout particulièrement.*

**Puisse ALLAH le Tout Puissant t'accueillir en Son Vaste Paradis et t'accorder Sa Sainte Miséricorde inchaa Allah.**

À ma très chère mère **Zayneb**

*Ma source de force et d'inspiration et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucun dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. .*

*Je vous dédie ce travail qui est le fruit de tes longues années de patiences, d'efforts et de sacrifice en témoignage de mon profond amour.*

*Puisse Dieu le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.*

*À ma sœur et mes chers frères :*

**Kaouther, Lokman et Mohammed,** Vous êtes la joie de chaque jour, que DIEU protège notre union et exauce vos espoirs. Veuillez accepter cette dédicace comme l'expression de mon fort et inlassable attachement, que Dieu les préserve en bonne santé et leur accorde longue vie.

*À mes amis : **Asma, Salima, Hounaida***

*Je ne te remercierai jamais assez pour vous encouragement soutien et aide, Vraiment j'ai la chance d'avoir des super amies comme vous.*

*À mon binôme **Maroua LEDRAA***

*Pour sa entente et sa sympathie Je présente mes sincères gratitudees à toi ; je te souhaite plus de succès dans ta vie professionnelle plus tard.*

*À tous qui m'ont aidé à réaliser ce travail, et A tous ceux que j'aime et qui m'aiment.*

*Je vous aime tous...*

# Maroua

Je dédie ce travail aux personnes qui m'ont particulièrement soutenu.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes amis et collègues qui m'ont apporté leurs soutiens, merci notamment à **Zayneb**, et à mon binôme **Hind BOUDRAA** avec qui j'ai partagé tous les moments difficiles.

À toute ma famille pour leurs encouragements tout au long de mon parcours universitaire.

Je souhaite remercier chaleureusement mes parents, **Zahia** et **Hocine**, pour leurs soutiens infaillibles.

Je souhaite également remercier mon frère et ma sœur et ma belle-sœur **Mouad**, **Meriem** et **Chloé**, car ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé.

Que mes proches trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

À ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. À tous ceux que j'aime et qui me donne de la vivacité pour avancer.

# Table des matières

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

## LISTE D'ABREVIATION

INTRODUCTION .....	1
--------------------	---

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Partie 1 : ENZYMES PROTEOLYTIQUE .....</b>	<b>4</b>
1. Généralités .....	5
1.1 Classification.....	5
1.2 Origine .....	6
1.3 Marché .....	6
2. Définition des enzymes protéolytiques.....	7
3. Protéases.....	7
3.1 Définition.....	7
3.2 Caractères des protéases .....	7
3.3 Classification des protéases .....	8
3.3.1 Selon la longueur de la chaîne polypeptidique .....	8
3.3.2 Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	8
3.3.3 Selon le pH d'activité.....	8
3.3.4 Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif .....	9
3.4 Types de protéases microbiennes.....	9
3.5 Applications des protéases.....	9
3.5.1 Industrie alimentaire .....	10
3.5.2 Industrie pharmaceutique et médicale .....	10
3.5.3 Industrie des détergents .....	10
3.5.4 Autres applications.....	11
3.6 Sources des protéines .....	11

3.6.1	Protéases d'origine végétale .....	11
3.6.2	Protéases d'origine animale .....	11
3.6.3	Protéases d'origine microbienne .....	11
3.7	Méthode de production des protéases.....	12
3.7.1	Fermentation sur milieu liquide .....	13
3.7.2	Fermentation sur milieu solide .....	13
<b>Partie 2 : ASPERGILLUS.....</b>		<b>14</b>
1.	Généralités .....	15
2.	Définition du genre <i>Aspergillus</i> .....	15
3.	Cycle de vie.....	16
4.	Facteurs déterminant.....	17
4.1	Macroscopique .....	17
4.2	Microscopique.....	17
5.	Habitat .....	18
6.	Taxonomie.....	19
7.	Principales espèces d' <i>Aspergillus</i> .....	19
7.1	<i>Aspergillus flavus</i> .....	19
7.2	<i>Aspergillus fumigatus</i> .....	19
7.3	<i>Aspergillus niger</i> .....	20
8.	Importance du genre <i>Aspergillus</i> .....	20
8.1	Pouvoir pathogène .....	20
8.2	Potentiel toxinoène .....	20
9.	Applications technologiques d' <i>Aspergillus</i> .....	22
9.1	Production d'acide organique .....	22
9.2	Production d'enzyme.....	22
10.	Application d' <i>Aspergillus</i> dans l'environnement.....	22



## MATERIEL ET METHODES

1.	Représentation du laboratoire d'accueil.....	25
2.	Matériel biologique .....	26
2.1	Revivification de l' <i>Aspergillus</i> .....	26
2.2	Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	27
2.3	Préparation du milieu de culture .....	28
2.4	Fermentation.....	29
2.5	Extraction et purification de produit de fermentation .....	30
2.5.1	Préparation de l'extrait enzymatique .....	30
2.5.2	Etapas de purification de l'enzyme .....	31
2.5.2.1	Précipitation par le sulfate d'ammonium .....	31
2.5.2.2	Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100 .....	32
2.6	Méthodes de dosage .....	33
2.6.1	Détermination des protéines .....	33
2.6.2	Dosage de l'activité protéolytique .....	34
2.7	Etude des propriétés de l'enzyme.....	36
2.7.1	Effet du pH sur l'activité enzymatique .....	36
2.7.2	Effet de la température sur l'activité enzymatique .....	37
2.7.3	Calcul des paramètres cinétique .....	37

## RESULTATS ET DISCUSSION

1.	Identification morphologique des souches .....	39
2.	Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	42
3.	Revivification de la souche <i>A.flavus</i> en milieu PDA.....	43
4.	Dosage de l'activité enzymatique et du taux de protéines.....	44
	CONCLUSION .....	47

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## ANNEXES

## RESUMES

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Distribution des ventes des enzymes.....	06
<b>Figure 2.</b> Schéma d'une tête Aspergillaire.....	15
<b>Figure 3.</b> <i>Aspergillus flavus</i> .....	15
<b>Figure 4.</b> <i>Aspergillus terreus</i> .....	15
<b>Figure 5.</b> <i>Aspergillus niger</i> .....	16
<b>Figure 6.</b> Cycle de croissance des champignons du genre <i>Aspergillus</i> .....	16
<b>Figure 7.</b> Structure d'Hyphe.....	17
<b>Figure 8.</b> Structure de mycélium.....	17
<b>Figure 9.</b> Morphologie des têtes Aspergillaires unisériées et bisériées.....	18
<b>Figure 10.</b> Centre de recherche en biotechnologie.....	25
<b>Figure 11.</b> Laboratoire d'analyse environnementale.....	25
<b>Figure 12.</b> Protocole de la revivification de l' <i>Aspergillus</i> .....	26
<b>Figure 13.</b> Protocole pour la mise en évidence de l'activité protéolytique.....	27
<b>Figure 14.</b> pH mètre.....	28
<b>Figure 15.</b> Protocole de l'enrichissement du milieu de fermentation.....	29
<b>Figure 16.</b> Protocole de la fermentation.....	30
<b>Figure 17.</b> Etapes de la préparation de l'extrait enzymatique.....	31
<b>Figure 18.</b> Etapes de la précipitation par le sulfate d'ammonium.....	32
<b>Figure 19.</b> Etapes expérimentales de dosage de l'activité enzymatique.....	36
<b>Figure 20.</b> Gamme de filtrats pour faire le dosage à différentes pH.....	37
<b>Figure 21.</b> Revivification de la souche <i>Aspergillus flavus</i> .....	44

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Six classes d'enzymes.....	05
<b>Tableau 2.</b> <i>Aspergillus</i> producteurs de mycotoxines .....	20
<b>Tableau 3.</b> Caractères morphologiques de la souche fongique.....	40
<b>Tableau 4.</b> Mise en évidence l'activité protéolytique dans un milieu lait gélosé.....	42
<b>Tableau 5.</b> Dosage la teneur en protéines et l'activité protéolytique.....	44

# Liste d'abréviation

<b>IUB:</b>	International Union of Biochemistry.
<b>ATP :</b>	Acide adénosine-triphosphorique.
<b>Asp :</b>	<i>Aspergillus</i> .
<b>SIDA :</b>	Syndrome immunodéficientaire acquis.
<b>GRAS:</b>	Generally Regarded As Safe.
<b>PDA :</b>	Gélose dextrose à la pomme de terre (Potato dextrose agar).
<b>Rpm :</b>	Rotation par minute.
<b>SDS-PAGE :</b>	Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
<b>BSA :</b>	Bovin Sérum Albumine.
<b>TCA :</b>	Tri-Chloro-acetic-acide.
<b>AFBI :</b>	Aflatoxines B1.
<b>AFB2:</b>	Aflatoxines B2.
<b>AFGI:</b>	Aflatoxines G1.
<b>AFG2 :</b>	Aflatoxines G2.

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Les protéases représentent l'un des trois plus grands groupes d'enzymes industrielles et représentent environ 60% du total des ventes mondiales d'enzymes. Les enzymes protéolytiques catalysent le clivage des liaisons peptidiques des protéines, elles peuvent être classées en protéase acide, neutre et alcaline en ce qui concerne leur plage de fonctionnement de pH. (**Razzaq *et al.*, 2019**).

Elles ont une large gamme d'utilisation et peuvent rentrer dans la composition de plusieurs produits à usage quotidien comme les détergents, les produits alimentaires et pharmaceutiques.

Les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les microorganismes que chez les animaux et les plantes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, 40% des enzymes sont produites par les microorganismes parmi lesquels, des souches fongiques (**Botton *et al.*, 1990 ; García-Gómez *et al.*, 2009**). Celles-ci possèdent plusieurs avantages comme leur qualité GRAS (Generally Regarded As Safe) et leur aptitude à produire une large gamme d'enzymes extracellulaires.

La culture des champignons pour la production d'enzymes s'effectue soit sur substrat solide, soit en culture submergée comme c'est le cas pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne. Ces cultures pourraient être la source de nutriments utilisée par les micro-organismes pour soutenir le développement, la croissance et les activités métaboliques, et excrètent les enzymes nécessaires pour la dégradation des molécules du substrat (**Ooi *et al.*, 2021**).

Dans le domaine industriel et d'un point de vue économique, il ne s'agit pas seulement d'utiliser des souches productrices d'enzymes, mais il est également nécessaire d'utiliser des milieux de culture, pour la production des enzymes, adéquats en rentabilité et coût.

La biovalorisation des déchets agroalimentaires par voies biotechnologiques représente plusieurs avantages tels que la création d'emplois, la protection de

l'environnement ainsi que la création de nouvelles sources de profits pour meilleur une avancée technologique. L'industrie laitière en Algérie varie entre 2,9 et 3,2 milliards de litres de lactosérum par année.

Dans notre étude, le lactosérum est utilisé comme substrat de base pour la production de protéase sur milieu liquide, vue sa richesse en protéines et en sels minéraux.

L'objectif principal de ce travail est la production de protéases par des moisissures locales isolées à partir des milieux extrêmes. Ce dernier consiste à faire :

- ✓ L'étude de l'activité protéolytique des souches fongiques
- ✓ L'étude des caractères morphologiques des souches fongiques.
- ✓ La mise en évidence de l'activité protéolytique des isolats fongiques du genre *Aspergillus* sur milieu gélosé à base de lait, dans le but de sélectionner la souche la plus performante.
- ✓ La caractérisation de l'enzyme partiellement purifiée.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**



**Partie 1 : ENZYMES  
PROTEOLYTIQUE**

## 1. Généralités

Les enzymes sont des catalyseurs dans le monde biologique. Ce sont de grosses molécules (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants, et elles jouent un rôle important dans le contrôle des processus métaboliques qui permettent la conversion des nutriments en énergie et en matériel cellulaire. (Bergmeyer *et al.*, 1979 ; Pelmont., 1995 ; Drouin., 2005).

### 1.1 Classification

Selon l'IUB (International Union of Biochemistry) (Bergmeyer., 1979), les enzymes sont divisées en six classes.

**Tableau 1.** Six classes d'enzymes

Classes		Réactions catalytiques
Oxydoréductases	(EC 1.x.x.x)	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène).
Transférases	(EC 2.x.x.x)	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, etc.)
Hydrolases	(EC 3.x.x.x)	Réaction d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau).
Lyases	(EC 4.x.x.x)	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse.
Isomérases	(EC 5.x.x.x)	Réactions d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères).
Ligases	(EC 6.x.x.x)	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP.

Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases. (Rao *et al.*, 1998; Assamoi *et al.*, 2009).

## 1.2 Origine

Les enzymes industrielles sont dérivées de sources végétales, animales ou microbiennes. Cependant, l'extraction à partir de plantes et d'animaux est limitée par des paramètres difficiles à contrôler. En effet, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, la possibilité d'utiliser des matières premières bon marché, la possibilité d'augmenter considérablement les rendements grâce à l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production. (Scriban., 1993).

## 1.3 Marché

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité continue d'afficher une forte dynamique de croissance. Il devrait dépasser 1,5 milliard de dollars en 2000. Devrait atteindre 6 milliards de dollars en 2011. (Kumar *et al.*, 2008b). Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60% (García-Gómez *et al.*, 2009; Rai et Mukherjee., 2010) (figure 1). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions US\$ annuellement (Kumar *et al.*, 2008b).

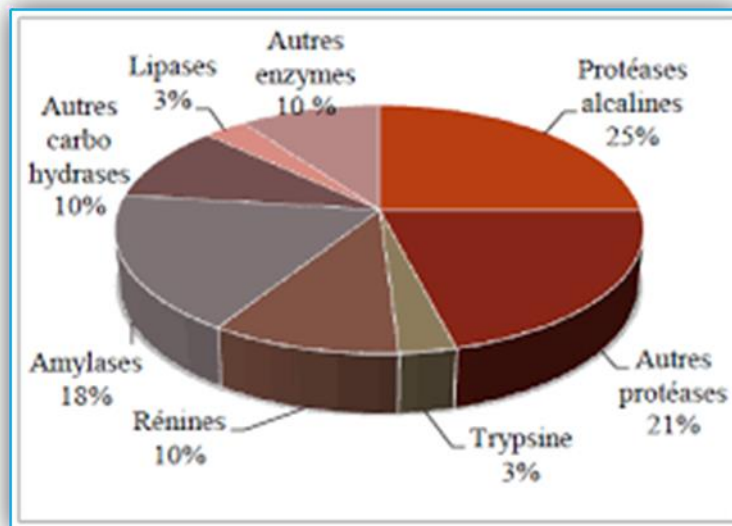


Figure 1. Distribution des ventes des enzymes (Rao *et al.*, 1998).

## 2. Définition des enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques sont présentes dans toutes les cellules du corps et dans tous les fluides biologiques. Ces enzymes aident au développement de divers processus, tels que la digestion des aliments, la coagulation du sang et la dégradation intracellulaire des protéines (**Zaneveld *et al.*, 1975**).

## 3. Protéases

### 3.1 Définition

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques présentes dans les protéines et les polypeptides. (**Singh *et al.*, 2016**). Les protéases peuvent être classées selon leur origine, leur activité catalytique et la nature des groupes réactifs dans le site catalytique. Les protéases sont divisées en deux groupes : les exopeptidases et les endopeptidases, en fonction du site d'action sur les chaînes polypeptidiques. (**Rao *et al.*, 1998**).

### 3.2 Caractères des protéases

Les protéases constituent un groupe très large et complexe contenant des enzymes qui diffèrent dans leurs propriétés tels que :

- ✓ le site actif.
- ✓ le mécanisme catalytique.
- ✓ les optima du pH et de température.
- ✓ le profil de la stabilité et la spécificité du substrat (**Sumantha *et al.*, 2006**; **Vishwanatha *et al.*, 2009**).
- ✓ La vitesse des réactions enzymatiques dépend aussi de la présence de certains activateurs ou des inhibiteurs (**Penasse, 1974**).

Ces enzymes sont importantes car elles contrôlent non seulement les réactions protéolytiques, mais régulent également diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire, telles que la dégradation des lipides et des glucides.

Les protéases sont capables de modifier les propriétés biologiques des chaînes polypeptidiques (activation, inactivation ou protéolyse non spécifique lors de la dégradation) après coupure des liaisons peptidiques. Les protéases causent un danger

pour les cellules en modifiant l'environnement cellulaire. Ainsi, les cellules ont développé de multiples mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique. Cette régulation peut intervenir à n'importe quel stade de l'expression des gènes (transcription des opérons, traduction, modifications post-traductionnelles, interactions avec les inhibiteurs et autres protéines) (**Benedykt et Katarzyna., 2008**).

### **3.3 Classification des protéases**

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

#### **3.3.1 Selon la longueur de la chaîne polypeptidique**

C'est le premier critère de classification des enzymes protéolytiques. Il existe deux classes ; les protéases, qui divisent les molécules de protéines en fragments polypeptidiques, et les peptidases, qui hydrolysent les polypeptides et les convertissent en acides aminés libres (**frazier., 1967 ; colwell et grigorova., 1989**).

#### **3.3.2 Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique**

Les peptidases sont subdivisées en deux catégories selon leur mode d'attaque : les endopeptidases et les exopeptidases (**Scriban., 1999 ; Moodie., 2001**). Cette dernière est elle-même subdivisée en deux sous-classes, les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Les aminopeptidases agissent à l'extrémité libre NH<sub>2</sub> des polypeptides, et leur activité dépend généralement de la présence d'ions métalliques ; les carboxypeptidases les attaquent à partir de l'extrémité libre COOH des polypeptides (**Scriban., 1999 ; Trap et Boireau., 2000**). L'activation de ces différentes enzymes entraîne la libération de dipeptides et de tripeptides qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés (**Scribane., 1999**).

#### **3.3.3 Selon le pH d'activité**

Selon ce paramètre, les enzymes protéolytiques d'origines différentes sont divisées en trois groupes : les protéases acides, neutres et basiques (**Hartely., 1960 ; Martinelli et Kinghorn., 1994**).

Dans ce contexte, les moisissures représentent un groupe physiologiquement distinct de micro-organismes avec une gamme d'enzymes actives à différents pH, produites par *Aspergillus oryzae*, *Penicillium camembert* et *Penicillium roquefort*, c'est le cas des protéases. Certaines protéases fongiques ont des optimums de pH très acides de 2,5 à 5,0 (**Botton *et al.*, 1990; Auberger *et al.*, 1985 Mechakra *et al.*, 1999**).

### 3.3.4 Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif

Les protéases peuvent se classer selon la nature des résidus formant leurs sites catalytiques (**Sumantha *et al.*, 2006**). Les groupes les plus importants sont : les protéases à sérine, à aspartate, à cystéine, à glutamate et les métalloprotéases.

### 3.4 Types de protéases microbiennes

Les protéases de microorganismes sont d'origine bactérienne (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*...) ou fongique (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*...). Les enzymes protéolytiques des micro-organismes sont divisées en quatre grands groupes selon leur mécanisme d'action ; protéinase sérine, protéinase thiol, métallo-protéinase et protéinase acide (**Keay et Moser., 1969**).

### 3.5 Applications des protéases

La protéase est l'une des trois principales enzymes industrielles (hydrolase), représentant environ 60 à 65 % des ventes mondiales totales d'enzymes en raison de son application dans de nombreux domaines industriels (**Wang *et al.*, 2005 ; Chellappan *et al.*, 2006 ; Barnali *et al.*, 2008 ; Mukherjee *et al.*, 2008**).

Les principales industries utilisatrices de protéases sont :

- ✓ Industrie alimentaires.
- ✓ Industrie des détergents.
- ✓ Domaine pharmaceutique et médicale.
- ✓ Autres applications.

### 3.5.1 Industrie alimentaire

L'application des protéases à l'industrie alimentaire n'est pas récente. Pour la fabrication des fromages, seules les enzymes coagulantes fongiques ont donné de bons résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure et la pepsine bovine et porcine (Alais., 1975 ; Pepler et Perlman., 1979).

L'enzyme bactérienne, la subtilisine est utilisée comme additif dans les conserves alimentaires pour détruire les spores des germes *Clostridium* (Durand et Monson., 1982 ; Rao *et al.*, 1998 ).

La papaïne et certaines enzymes protéolytiques microbiennes, telle que la protéase alcaline d'*Aspergillus oryzae*, sont employées comme des additifs pour augmenter la digestibilité des aliments et l'attendrissage des viandes. La protéase neutre de la même espèce est utilisée pour l'affinage des fromages (Frazier., 1967 ; Durand et Monson., 1982 ; Fedrick *et al.*, 1986 ; Haussner *et al.*, 1996).

### 3.5.2 Industrie pharmaceutique et médicale

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. L'asparaginase provenant de *E.coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (Rao *et al.*, 1998 ; Gupta *et al.*, 2002).

### 3.5.3 Industrie des détergents

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à favoriser l'élimination des taches protéiques vue leur avantage unique qui ne peut autrement être obtenue avec la technologie des détergents classiques (Gupta *et al.*, 2002).

Parmi les principales conditions préalables pour l'utilisation des protéases dans la production des détergents sont : l'action sur une large gamme des substrats, l'activité et la stabilité à des pH et à des températures élevés et en présence des agents oxydants additionnés (Chellappan *et al.*, 2006).

### 3.5.4 Autres applications

La protéase neutre peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Ils sont employés aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (**Aviron et al., 1982**).

## 3.6 Sources des protéines

Les principales sources des enzymes protéases sont des animaux, des plantes et des micro-organismes (les deux bactérienne et fongique). (**Rao et al., 1998**).

### 3.6.1 Protéases d'origine végétale

Les protéases sont présentes dans toutes les espèces biologiques. Les plantes ont été l'objet de recherches avant les microorganismes pour isoler des enzymes protéolytiques, c'est le cas de la bromélaïne extraite de tige de l'ananas (*Ananas comosus*) (**Rao et al., 1998**), la papaine en provenance du latex de fruit la papaye (*Caricapapaya*). (**Scriban., 1993 ; Pelmont., 1995 ; Rao et al., 1998**) et la facine issue de la figue (*Ficus glabrata*) (**Scriban., 1993**).

### 3.6.2 Protéases d'origine animale

Seules les protéases sécrétées par l'estomac des ruminants ont une valeur industrielle, comme la présure préparée à partir du quatrième estomac de veau et la pepsine bovine et porcine. Les activités non spécifiques de la pancréatine, de la trypsine et de la chymotrypsine les rendent moins importantes que les enzymes gastriques (**McKenzie 1971 ; Alais 1975 ; Scriban 1999**). Des études récentes permettent également d'identifier des protéases dans les vers : *Schistosoma* ; *Fasciola* ; *Taenia Haemonchus sp*, qui semblent être les principales cibles potentielles de la thérapie antiparasitaire et de la vaccination (**Trap et Boireau., 2000**).

### 3.6.3 Protéases d'origine microbienne

L'incapacité des protéases végétales et animales à répondre aux besoins du monde industriel a conduit à un intérêt accru pour les protéases microbiennes (**Mala et al., 1998**). Ces derniers sont produits par diverses bactéries, moisissures et levures (**Devi et al., 1998**).



#### a. Protéases bactériennes

Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents. (Calk *et al.*, 2000 ; Frazier, 1967). Les bactéries du lait et en particulier *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* produisent des métalloprotéases utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage du fromages (Cousin *et al.*, 1982) ainsi que les protéases extracellulaires produite par *Streptococcus lactis* (Desmazeaud., 1978).

#### b. Protéases des levures

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

#### c. Protéases des moisissures

Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*....etc. Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues et représentent 40 % du marché mondial des enzymes industrielles (Frazier, 1967 ; Ul-haq *et al.*, 2003).

### 3.7 Méthode de production des protéases

Les méthodes de fermentation utilisées pour produire des protéases microbiennes sont similaires à celles utilisées pour fabriquer d'autres produits fermentés.

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

### 3.7.1 Fermentation sur milieu liquide

La fermentation en milieu liquide peut être considérée comme une invasion de l'habitat naturel des micro-organismes, en particulier des champignons. Il se compose de micro-organismes qui se développent sur un substrat nutritif liquide. Ce type de fermentation est traditionnellement utilisé pour la production industrielle d'enzymes en raison de la facilité de contrôle de divers paramètres tels que le pH, la température, l'aération, l'oxygène dissous et l'humidité (**Singhania *et al.*, 2009**).

### 3.7.2 Fermentation sur milieu solide

La fermentation sur milieu solide est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (**Durand., 2003 ; Gervais *et al.*, 2003 ; Rahardjo *et al.*, 2006**).

De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide liée à celui-ci et une phase gazeuse piégée dans des particules. (**Holker et Lenz., 2005 ; Rahardjo *et al.*, 2006**).

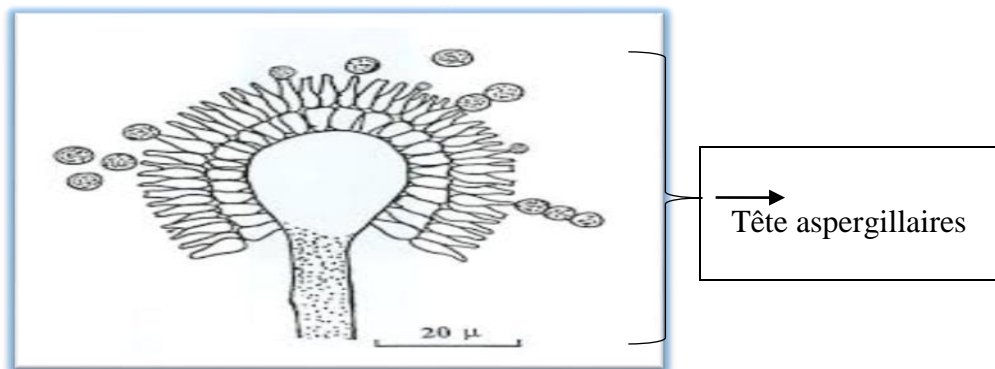
## **Partie 2 : *ASPERGILLUS***

## 1. Généralités

Le terme « moisissures » désigne tous les champignons microscopiques eucaryotes filamenteux et pluricellulaires du règne des mycètes connus sous le nom de " vrais champignons" ou "Eumycètes" (Regnault, 1990 ; Chasseur et Nolard, 2003).

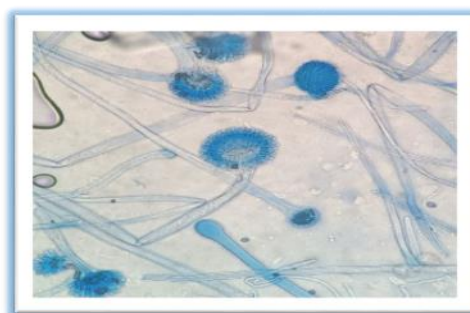
## 2. Définition du genre *Aspergillus*

*Aspergillus* signifie « aspersoir » due à la forme de ses têtes aspergillaires (Galinas, 1995) (figure 2).



**Figure 2.**Schéma d'une tête aspergillaire (Anonyme, 2012).

Les *Aspergillus* sont des contaminants très communs, ce genre comprend de 180 à 250 espèces selon les auteurs dont seules *Aspergillus fumigatus*, *A.flavus* (figure 3), *A.nidulans*, *A.terreus* (figure 4), et *A.niger* (figure 5) sont considérées comme thermotolérantes (Reboux *et al.*, 2010).

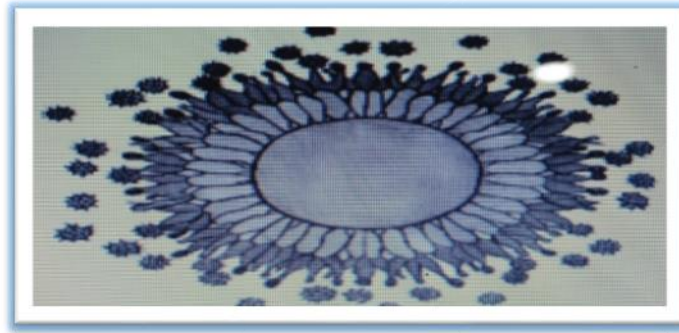


**Figure 3.***Aspergillus flavus*<sup>1</sup>.



**Figure 4.***Aspergillus terreus*.<sup>2</sup>

<sup>1</sup><https://www.pinterest.com/pin/369224869447405227/>

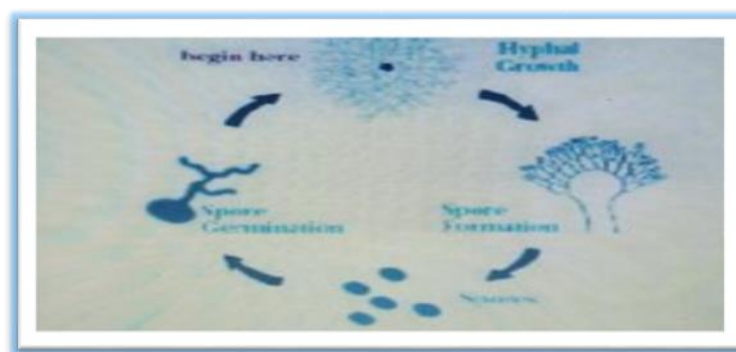


**Figure 5.** *Aspergillus niger* (Botton *et al.*, 1990).

Quand les graines sont récoltées humides, insuffisamment séchées ou lorsqu'elles prennent de l'humidité pendant le stockage, les *Aspergillus* peuvent évoluer rapidement et se transformer de saprophytes en parasites et entraînent une baisse importante de la faculté germinative sur les semences (Champion, 1997).

### 3. Cycle de vie

Le cycle de vie d'*Aspergillus* débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance. La germination se déclenche, donc la spore germera et donnera naissance à un premier filament non différencié, appelé hyphe (figure 7), qui s'allongera pour former un ensemble appelé mycélium (figure 8), en présence des conditions favorables à la sporulation, le mycélium à son tour donnera naissance à des spores (conidies) (D'Halewyn *et al.*, 2002) (figure 6).



**Figure 6.** Cycle de croissance des champignons du genre *Aspergillus* (Desoubeaux et Chandenier 2010).

<sup>2</sup><https://www.shutterstock.com/fr/image-vector/structure-aspergillus-1107348494>

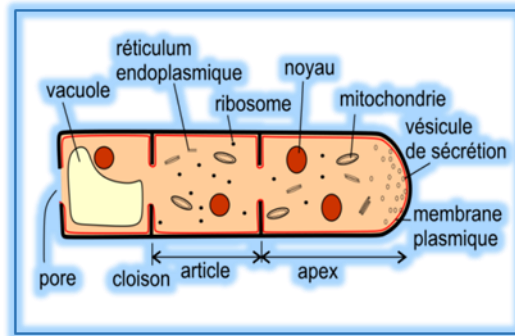


Figure 7. Structure d'Hyphes<sup>3</sup>.

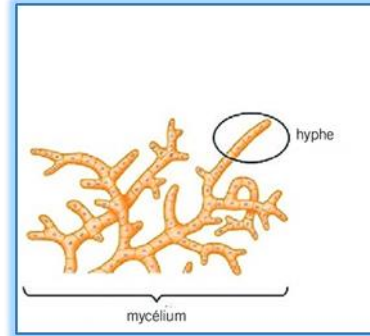


Figure 8. Structure de mycélium.<sup>4</sup>

## 4. Facteurs déterminant

### 4.1 Macroscopique

La description macroscopique du genre *Aspergillus* Selon **Raper et Fennell (1965)** est basée sur les critères suivants :

- L'aspect de la colonie : le premier critère de base qui permet de distinguer les espèces du genre *Aspergillus* est la couleur de la partie aérienne
- la texture de la colonie qui peut être floconneuses, veloutée...
- La couleur du revers de la colonie qui peut parfois être caractéristique d'une espèce.
- La production des sclérotés (masse à paroi épaisse composée de cellules Parenchymateuse de forme, de taille et de couleur caractéristiques).

### 4.2 Microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif, cet appareil est formé de filaments mycéliens hyalins de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Des filaments dressés, non cloisonnés appelées Conidiophores apparaissent sur les filaments végétatifs. Les conidiophores terminent par une vésicule de forme

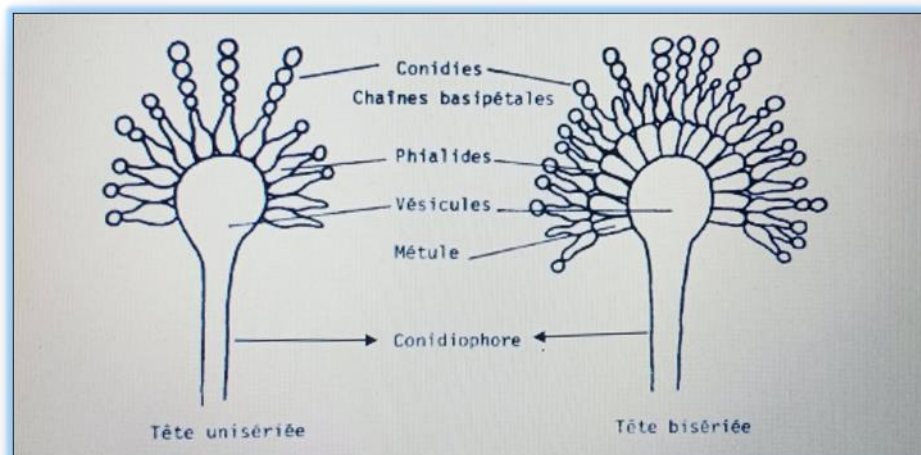
<sup>3</sup><https://fr.wikipedia.org/wiki/Hyphe#/media/Fichier:Hyphe.svg>

<sup>4</sup>[https://www.researchgate.net/figure/Structure-du-mycelium-et-mode-de-reproduction-des-moisissures-C-CRC\\_fig3\\_344436361](https://www.researchgate.net/figure/Structure-du-mycelium-et-mode-de-reproduction-des-moisissures-C-CRC_fig3_344436361)

variable sur laquelle sont disposées les cellules phialides. L'insertion de ces dernières peut être directement sur la vésicule pour former une structure unisériée, ou elles peuvent être portées par des petites structures insérées sur la vésicule pour obtenir un format bisériée nommées métules ou stérigmates (figure 9) (**Raper et Fennelle, 1965**). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir (**Tabuc, 2007**).

La tête Aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus* est constituée de l'ensemble des :

- ✓ Vésicules,
- ✓ Métules = la première rangée de phialides (peuvent être présentes ou absentes),
- ✓ phialides = cellules conidiogène,
- ✓ conides = spores.



**Figure 9.**Morphologie des têtes Aspergillaires unisériées et bisériées  
(**Azzoune, 2009**).

## 5. Habitat

Ils sont trouvés que les *Aspergillus* existent beaucoup plus dans les denrées alimentaires, la poussière de maison et dans les endroits peu accessibles au nettoyage

et ils sont également retrouvés dans les climatiseurs, les humidificateurs, les solutions liquides, les vêtements (**Mallea M et al., 1982**). Ils se développent dans la terre, sur les plantes et débris végétaux en voie de décomposition. Il est retrouvé dans l'air, sur le sol et les surfaces et même dans l'eau. Les spores peuvent être présentes également dans les épices, les fleurs séchées, la paille (**Stankovic K et al., 2006**)

## 6. Taxonomie

L'appartenance des espèces du genre *Aspergillus* au règne des *Fungi*, à l'embranchement des *Ascomycota* qui regroupe des champignons à myceliumcloisonné présentant une reproduction sexuée avec formation d'asques contenant des ascospores, et par une multiplication asexuée par phialides produisant des phialoconidies. Les *Aspergillus* sont inclus dans le sous-embranchement des *Pezizomycotina*, la classe des *Eurotiomycetes*, la sous-classe des *Eurotiomycetidae*, et l'ordre des *Eurotiales* caractérisé par des asques contenus dans des ascocarpes de type cleistothèce ou plus rarement gymnothèce (**Hibbett et al., 2007 ; Bennett, 2010**).

## 7. Principales espèces d'*Aspergillus*

### 7.1 *Aspergillus flavus*

Le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (gélose au malt et Sabouraud) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C.

L'*Aspergillus flavus* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers peut être incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés (**Tabuc ,2007**).

### 7.2 *Aspergillus fumigatus*

L'*Aspergillus fumigatus* est une espèce thermotolérante dont la température de croissance est comprise entre 15 et 48°C ; la température optimale étant située aux alentours de 40 et 42°C. Cette espèce est capable de se développer jusqu'à 57°C (**Morin, 1994**). L'*A.fumigatus* forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes



et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers peut être incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches.

### 7.3 *Aspergillus niger*

L'*Aspergillus niger* est utilisé dans les processus biotechnologiques pour la synthèse de différents acides comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes : alpha-amylase, beta-glucanase, catalase, glucose oxydase, lipase, pectinase, polygalacturonase. (**Botton et al., 1990**).

Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). Généralement la température optimale de croissance varie entre 25 et 30°C, mais *A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*A.niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle.

## 8. Importance du genre *Aspergillus*

### 8.1 Pouvoir pathogène

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes qui nécessitent des conditions locales favorables (cavernes tuberculeuses, cancer bronchopulmonaire, broncho-pneumopathies chroniques obstructives, emphysèmes, mucoviscidose...) ou générales (corticothérapies prolongées, hémopathies malignes, chimiothérapies aplatissantes, SIDA...) pour qu'elles puissent se développer (**Badillet et al., 1987 ; Morin, 1994**).

### 8.2 Potentiel toxino-gène

Certaines mycotoxines (Tableau 2) peuvent être produites par de nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* (**Pitt, 1988**).

**Tableau 2.** *Aspergillus* producteurs de mycotoxines (**Tabuc, 2007**).

Espèce d' <i>Aspergillus</i>	Mycotoxines produits
<i>Aspergillus candidus</i>	Candiduline
<i>Aspergillus carneus</i>	Citrinine

<i>Aspergillus clavatus</i>	Acide Kojique, Patuline, Xanthociline
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines B1 et B2, Acide aspergillique, Acide cyclopiazonique, Acide Kojique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigaclavone, Fumgaline, Fumitoxine, fumitremorgine A et C, Gliotoxine
<i>Aspergillus niger</i>	Malformine, Naftoquinone
<i>Aspergillus nomius</i>	Aflatoxines B1 et B2, Acide Aspergillique
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Acide Kojique, Acide Neoaspergillique, Ochratoxine, Acide Penicillique, Acide Séclatonique A
<i>Aspergillus oryzae</i>	Acide Cyctopiazonique, Acide Kojique
<i>Aspergillus parasiticus</i>	AFB1 et AFB2, AFG1 et AFG2, Acide Aspergillique, Acide Kojique
<i>Aspergillus parasiticus</i>	AFB1 et AFB2, AFG1 et AFG2, Acide Aspergillique, Acide Kojique
<i>Aspergillus sydowii</i>	Sterigmatocystine, Griséofulvine
<i>Aspergillus terreus</i>	Citréoviridine, Citrinine, Gliotoxine, Patuline, Terréine, Acide Terréique, Terrétonine, Territrem, Terramide A
<i>Aspergillus verzicolor</i>	Stérigmatocystine
<i>Aspergillus wentii</i>	Acide Kojique

## 9. Applications technologiques d'*Aspergillus*

Les principales applications industrielles des espèces d'*Aspergillus* comptent sur l'art traditionnel et les sciences liées à la production d'aliments fermentés, et elles dépendent aussi des procédés classiques de biochimie, microbiologie, génétique et le génie génétique (Ward *et al.*, 2006). En tenant compte que les métabolites d'*Aspergillus* les plus indispensables sont les enzymes et les acides organiques.

### 9.1 Production d'acide organique

La plupart des *Aspergillus* produisent de l'acide citrique. Tel que l'*A. niger*, elle peut produire l'acide citrique par fermentation jusqu'à 200 g/l dans une période de 5 à 7 jours (Ward *et al.*, 2006). L'acide gluconique et l'acide oxalique sont par ailleurs produit par *Aspergillus niger* (Liu *et al.*, 2003; Rymowicz et Lenart, 2003). L'acide itaconique est produit par *Aspergillus itaconicus* et *Aspergillus terreus* (Murphy et Horgan, 2005).

### 9.2 Production d'enzyme

Les espèces d'*Aspergillus* surtout les souches GRAS servent à la production à grande échelle d'enzymes industriellement précieuses comme les cellulases, pectinases, xylanases, amylases, glucoamylases et des protéases (Murphy et Horgan, 2005; Ward *et al.*, 2006). L'*A. oryzae* (Ahlburg) Cohn et d'*A. sojae* sont des espèces non aflatoxigéniques largement utilisées pour la production d'amylase de qualité alimentaire et dans la fermentation du saké et la sauce de soja (Lee *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2004).

L'*Aspergillus oryzae* (Sandhya *et al.*, 2005) ; *A. fumigatus* (Wang *et al.*, 2005b), *A. terreus* (Wu *et al.*, 2006), *A. parasiticus* (Tunga *et al.*, 2003), *A. niger* (Singh *et al.*, 1994; Paranthaman *et al.*, 2009) toutes ces espèces sont capables de produire les protéases. Par ailleurs, la tannase (Ramirez-Coronel *et al.*, 2003), l'inulinase (Jing *et al.*, 2003) et la glucose oxydase (Malherbe *et al.*, 2003) sont des enzymes à importance industrielle produites par des espèces d'*Aspergillus*.

## 10. Application d'*Aspergillus* dans l'environnement

Les applications environnementales d'*Aspergillus* sont limitées. Concernant la souche *A. terreus* elle est responsable de métaboliser les hydrocarbures aromatiques

polycycliques (**Capotorti *et al.*, 2004**). *A.niger* a été étudiée par différents laboratoires pour la biosorption des métaux lourds (**Dursun, 2003**).

# **MATERIEL ET METHODES**

## 1. Représentation du laboratoire d'accueil

Le centre de recherche en biotechnologie (figure 10) est le premier centre national de biotechnologie placé sous la tutelle du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche scientifique, chargé de la réalisation des programmes de recherche scientifique et du développement technologique. Le Centre a pour objectif principal « Le développement de la recherche notamment appliquée dans le domaine des biotechnologies en impliquant nos partenaires socio-économiques et pour la valorisation de nos ressources biologiques dans une démarche de développement durable ».



**Figure 10.** Centre de Recherche en Biotechnologie

Parmi les laboratoires du centre de recherche en biotechnologie dans lesquels nous avons réalisé notre mémoire de fin d'étude ; Laboratoire de mycologie, Laboratoire de biotechnologie animale et laboratoire d'analyse environnementale (Figure 11).



**Figure 11.** Laboratoire d'analyse environnementale.

## 2. Matériel biologique

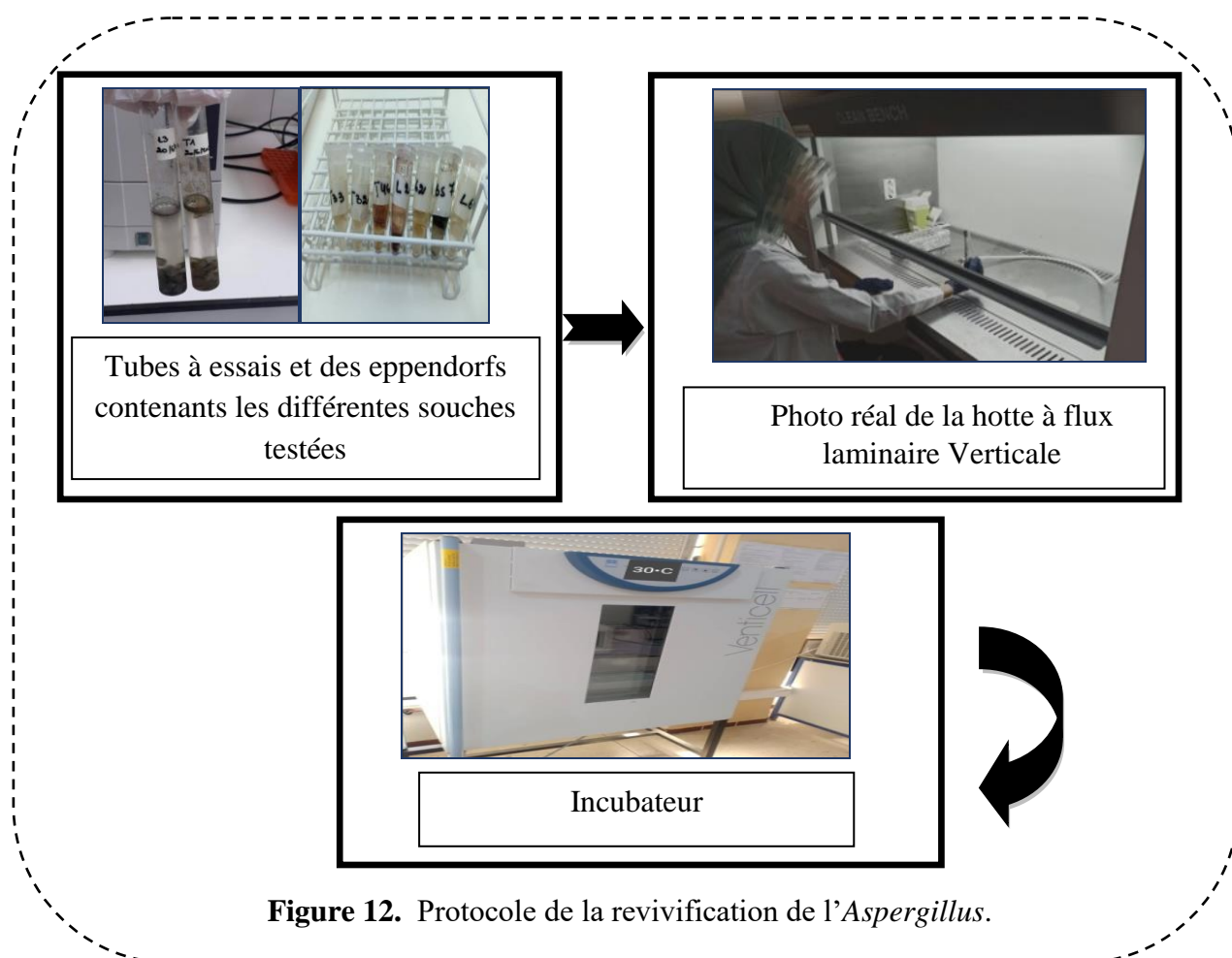
Nous avons utilisé dans notre travail des souches fongiques du genre *Aspergillus* qui appartiennent à la collection du laboratoire de biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBAM) (Université Constantine 1).

### 2.1 Revivification de l'*Aspergillus*

Afin de revivifier les souches (Figure 12), nous avons utilisé le milieu PDA (Annexe 1), Un ensemencement en surface a été réalisé sur ce milieu de culture. La lecture des résultats a été réalisée après 48h d'incubation à 30°C.

L'ensemencement a été réalisé sous hotte à flux laminaire verticale (Elle protège et l'échantillon et le manipulateur).

Les boîtes de pétri sont placées dans un incubateur pendant 7 jours à 30°C. Après la période d'incubation, on peut finalement faire la fermentation.



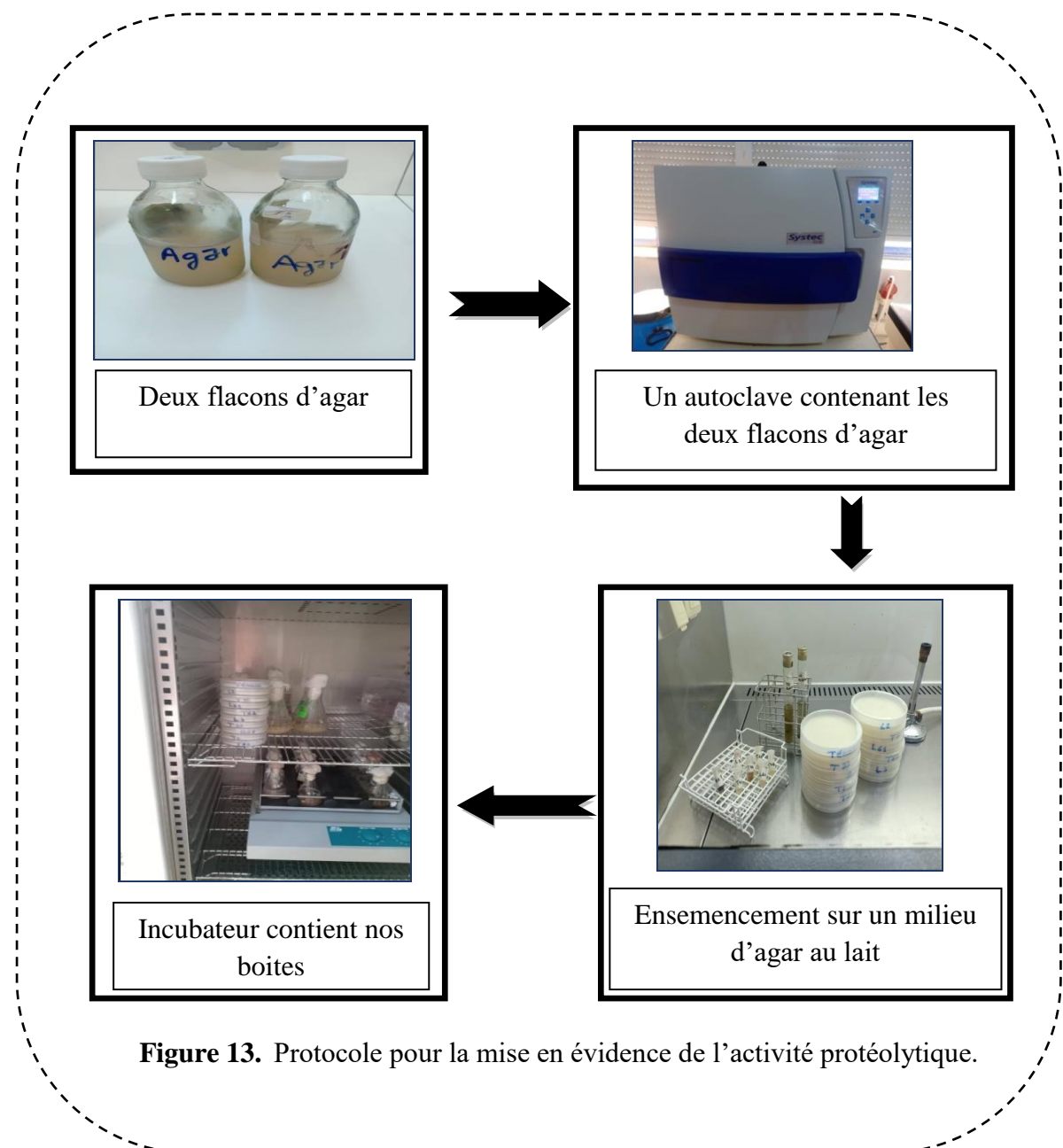
**Figure 12.** Protocole de la revivification de l'*Aspergillus*.

## 2.2 Mise en évidence de l'activité enzymatique

La procédure qui consistait à préparer un milieu Agar au lait (Annexe 2) et qui à travers l'observation macroscopique visuelle, nous a permis de confirmer si les souches sont capables de produire la protéase ou non.

Sous une hotte à flux laminaire verticale, et dans des conditions d'asepsie totale nous avons fait l'ensemencement en surface sur un milieu Agar au lait (Figure 13).

Enfin, nous avons placé nos boîtes dans un incubateur pendant 4 jours à 30 °C afin de pouvoir ensuite faire l'observation microscopique et macroscopique.



**Figure 13.** Protocole pour la mise en évidence de l'activité protéolytique.



### 2.3 Préparation du milieu de culture

Nous avons utilisé un milieu de culture à base du lactosérum doux. En tenant compte que la préparation du milieu de culture est divisée en deux étapes indispensables, la première est la déprotéinisation et la seconde est l'enrichissement.

#### ➤ Déprotéinisation

Un litre du lactosérum est placé dans un bain-marie pendant 30 minutes à 100 °C afin de dénaturer les protéines.

Après une filtration avec du papier wattman, le pH du filtrat obtenu est mesuré (figure 14) et nous avons constaté que le pH est égale à 4,8. Cette valeur est ajustée avec du HCl jusqu'à ce qu'il soit égale 4.



**Figure 14.** Le pH mètre.

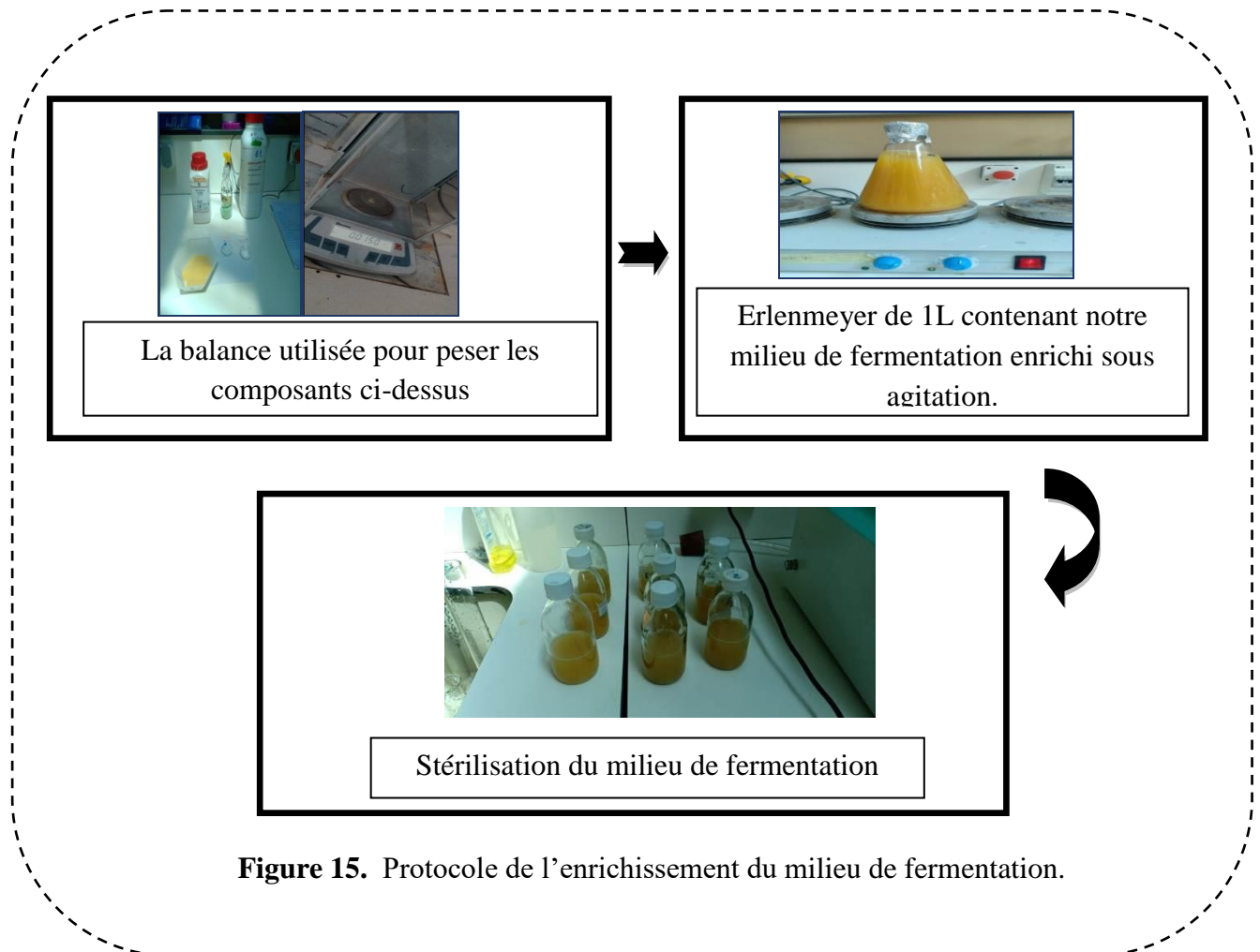
Nous avons ensuite effectué le processus de filtration pour une deuxième fois en excluant le culot et en restituant le filtrat afin de l'utiliser pour l'étape suivante (Annexe 6). Nous en sommes donc arrivés à la deuxième étape appelée : L'enrichissement.

#### ➤ Enrichissement

A l'aide d'une balance analytique et de verre de montre, nous avons pesé 14g d'extrait de levure, 0.015g de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  et 0.76g de  $\text{MgSO}_4$ .

L'elenmeyer contenant le milieu de fermentation enrichi est mis sur l'agitateur afin d'homogénéiser les composants du milieu.

Le contenu d'Erlenmeyer est divisé en neuf flacons en verre en quantités égales (100 ml dans chaque flacon. Ensuite, les flacons sont stérilisés à l'aide d'un autoclave (Figure 15).

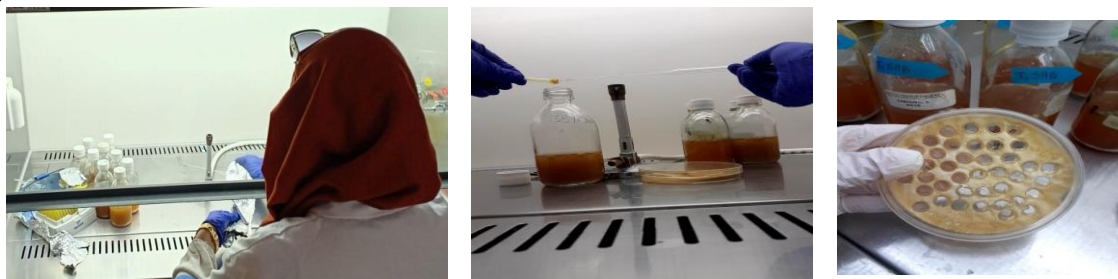


**Figure 15.** Protocole de l'enrichissement du milieu de fermentation.

## 2.4 Fermentation

Après la stérilisation du milieu de fermentation, une inoculation par la technique des disques est réalisée en déposant dix cylindres dans chaque flacon (Figure 16).

Finalement, nous avons procédé à l'incubation à 30°C et 150 tr/min pendant une période de 7 jours.



Dépôt des cylindres de la souche *A.flavus* revivifié dans le milieu PDA



Les neuf flacons sont mis dans l'incubateur

**Figure 16.** Protocole de la fermentation.

## 2.5 Extraction et purification de produit de fermentation

Les enzymes sont traitées de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités (Benslama, 2016). Les protéases sont purifiées en 06 étapes :

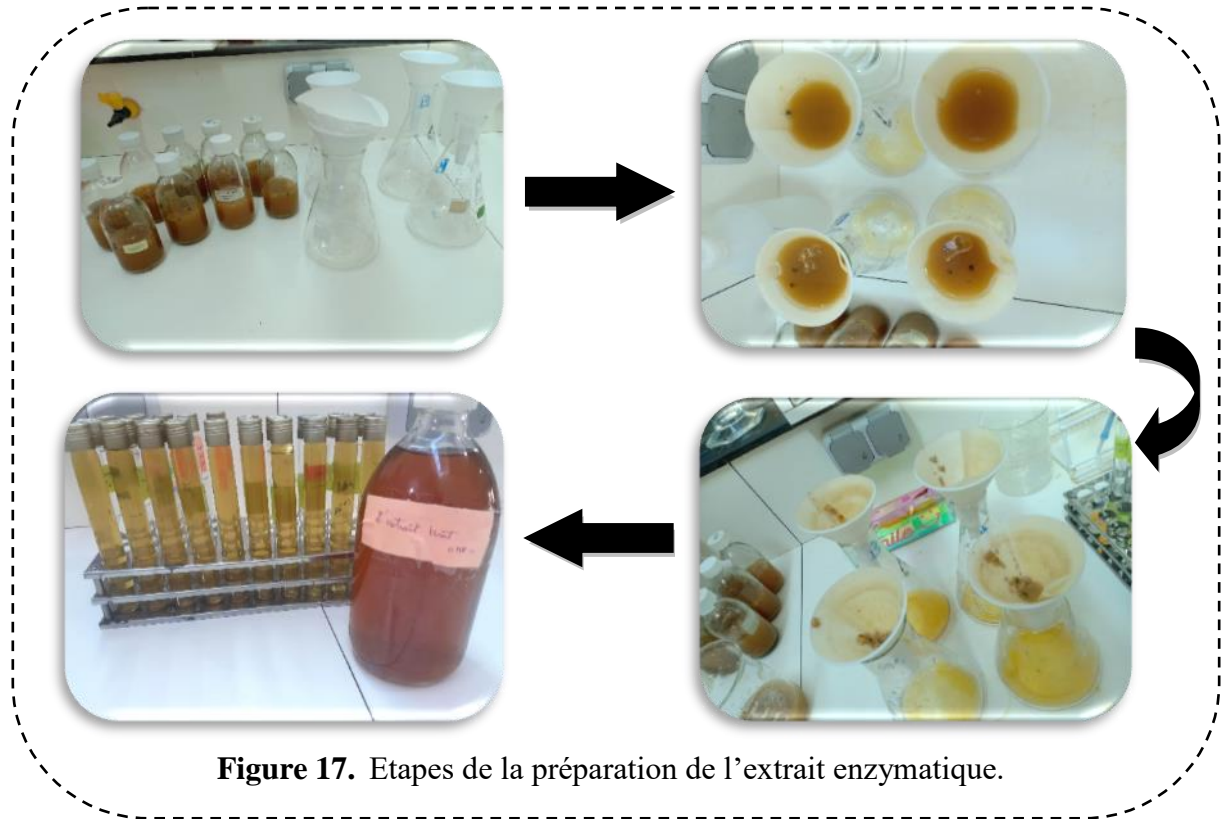
- ✓ Préparation de l'extrait brut.
- ✓ Précipitation par l'sulfate d'ammonium.
- ✓ Dialyse.
- ✓ Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G100.
- ✓ Chromatographie échangeuse d'ions.
- ✓ Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS PAGE).

### 2.5.1 Préparation de l'extrait enzymatique

Dès que la fermentation est terminée (7 jours d'incubation des souches à 30 °C dans le milieu de base), le mélange est alors filtré à travers une passoire pour éliminer les solides (Tunga *et al.*, 2003). Le filtrat est, lui-même, clarifié par une autre

filtration sur papier filtre (Whatman n° 1) pour obtenir l'extrait enzymatique brut (Figure 17).

Ce dernier, est conservé à 4°C pour le dosage de l'activité enzymatique et le taux de protéines.



**Figure 17.** Etapes de la préparation de l'extrait enzymatique.

## 2.5.2 Etapes de purification de l'enzyme

### 2.5.2.1 Précipitation par le sulfate d'ammonium

- **Principe**

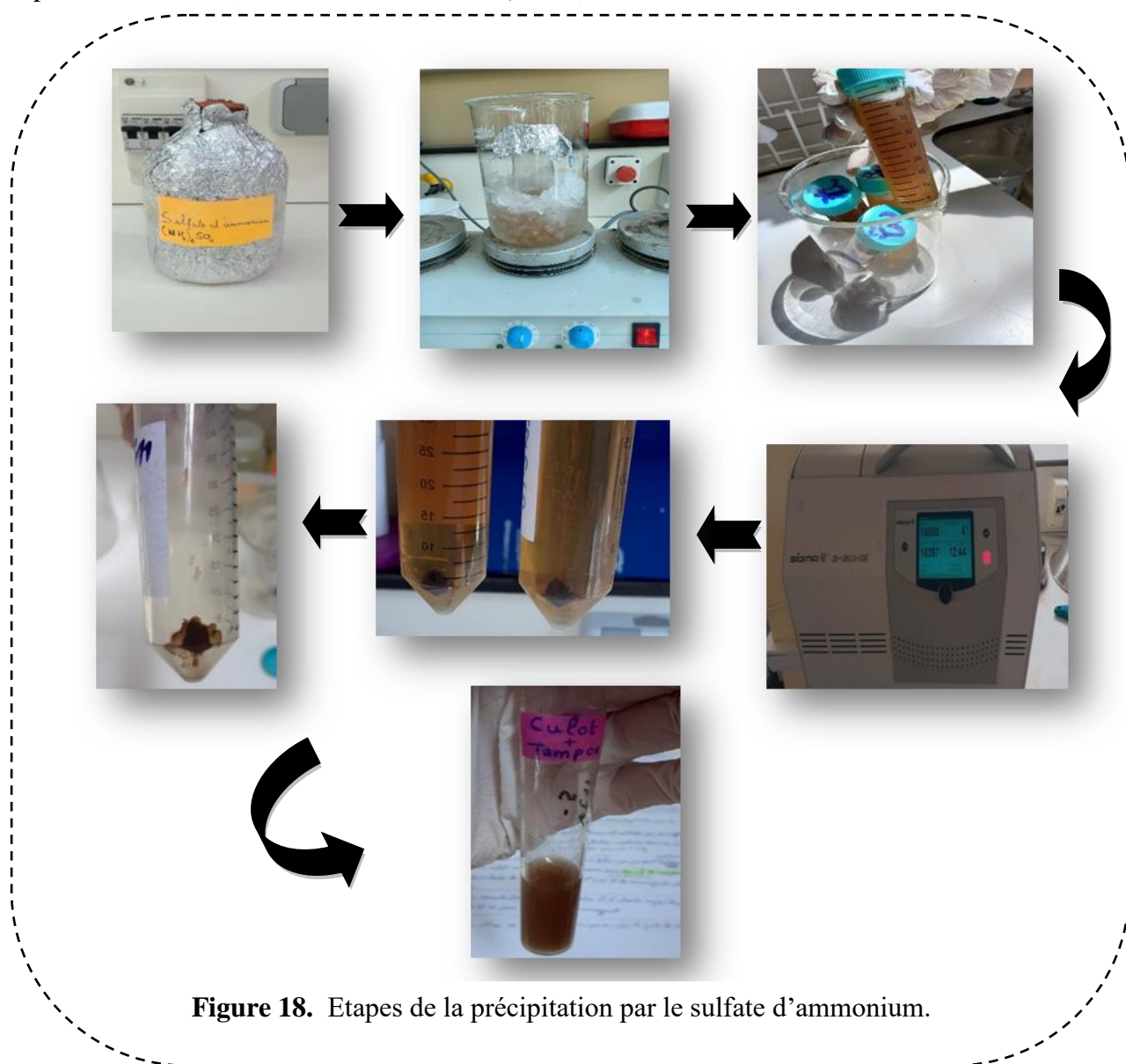
L'addition de sulfate d'ammonium à une solution protéique aqueuse entraîne une diminution de la constante diélectrique, donc de la stabilité des protéines, ce qui conduit à leur précipitation (Osterlund et Janson, 1997).

- **Protocole de précipitation**

Le sulfate d'ammonium est utilisé à 30% de saturation. Sous agitation modérée du mélange dans un bain de glace ( $T \leq 4^\circ$ ) pendant 1 heure, le mélange est centrifugé à 10000 rpm pendant 30 min à 4°C.

Le culot est remis en solution dans un petit volume (10 ml) de tampon phosphate ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ) 0.05M à pH 5. Le surnageant est récupéré (Figure 18).

Après la précipitation on détermine l'activité protéasique et la concentration en protéines totales (**Desmazeau et Hermier, 1968**).



**Figure 18.** Étapes de la précipitation par le sulfate d'ammonium.

### 2.5.2.2 Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100

Afin de réaliser cette chromatographie, le gel Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals) est utilisé sur une colonne (Pharmacia Fine Chemicals) de dimension (50cm x 1,5cm). Le gel est mis à gonfler dans un tampon citrate (0,05M, pH 5).

La fraction active est déposée au sommet de la colonne équilibrée et éluée par le même tampon. L'éluat est collecté par fractions de 2 ml. Les fractions correspondant au pic d'activités sont rassemblées et lyophilisées.

## 2.6 Méthodes de dosage

### 2.6.1 Détermination des protéines (Lowry *et al.*, 1951)

- **Principe**

Le réactif de Folin-ciocalteu réagit avec les acides aminés aromatiques présents dans les protéines. L'absorbance du produit coloré est lue à 750 nm Lowry (1951) cette méthode repose sur le principe de coloration.

La coloration bleue/violette obtenue lorsqu'on met le réactif de Folin-Ciocalteu en présence de protéines est due à deux réactions.

La première réaction, réaction de Biuret, dans laquelle  $\text{Cu}^{2+}$ , en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleu-profond.

La deuxième réaction, dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleu-vert.

Ainsi, dans un premier temps, le taux de protéines est calculé par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution standard de *Bovin Serum Albumin* (BSA) à 1000  $\mu\text{g/ml}$  (Annexe 3).

- **Réaction enzymatique**

La solution M a été préparé par mélanger de :

-Solution C1 .....100 $\mu\text{l}$

-Solution C2 .....100 $\mu\text{l}$

-Solution B .....10ml

Le mélange réactionnel est constitué de :

-200 µl de l'échantillon dilué à ½.

-2 ml de la solution M.

Agiter et laisser reposer 10min. Chaque dosage est effectué en trois répétitions.

Le blanc constitué sauf que 2ml de la solution M

Les mélanges (blanc & tubes réactionnels) ont été après filtrés sur papier Whatman n°1.

- **Protocole de dosage**

0,5 ml du filtrat sont mélangés avec 2,5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2% dans le NaOH (0,1N). Après agitation et incubation 10 min à température ambiante, 0,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/2ème sont ajoutés. Les mélanges sont bien agités par l'agitateur vortex et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 45min.

La lecture de l'absorbance est réalisée à 750 nm au spectrophotomètre.

## 2.6.2 Dosage de l'activité protéolytique

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

- **Principe**

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et les polypeptides en libérant des acides aminés libres et des peptides simples, qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines que l'on utilise comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéasique à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu.

Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

- **Réaction enzymatique**

Le mélange réactionnel a été préparé par addition de :

- Extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage ..... 1 ml
- Tampon phosphate  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  (0,05M, pH 5).....1,5 ml
- Substrat (solution de caséine 2,5% dissoute dans le citrate de sodium à 0,02 M) .....2,5 ml

Après agitation, l'incubation de ce mélange se fait à 40°C pendant une heure, puis la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%). Par la suite, le tube est laissé reposer 30 min dans un bain de glace (**Beynon et Oliver, 2004 ; Wu *et al.*, 2006 ; Devi *et al.*, 2008**); ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées(**Sandhya *et al.*, 2005**). Le mélange est ensuite filtré sur papier Whatman n°1.

Par ailleurs, le témoin est parallèlement préparé dans les mêmes conditions en dénaturant l'enzyme ; c'est-à-dire en ajoutant le TCA avant le substrat. Chaque dosage est effectué en trois répétitions.

- **Protocole de dosage**

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'Anson (1938).

0,5 ml du filtrat sont mélangés avec 2,5 ml de  $Na_2CO_3$  à 2% dans le NaOH (0,1N). Après agitation et incubation 15 min à température ambiante, 0,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/2ème sont ajoutés. Les mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 45min (Figure 19) (**Sumantha *et al.*, 2006; Paranthaman *et al.*, 2009**).

L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm ; les valeurs obtenues sont converties en activité à l'aide d'un courbe étalon préalablement établie. L'unité protéolytique est définie par la concentration de tyrosine. En utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 µg/ml



(Annexe 4). Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1  $\mu\text{g}$  de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme.



## 2.7 Etude des propriétés de l'enzyme

### 2.7.1 Effet du pH sur l'activité enzymatique

La réaction enzymatique est réalisée dans des solutions tampons (Annexe 5) à différentes pH de 3 jusqu'à 7 avec un incrément de 0,5.

Pour cela, on ajoute les systèmes tampons suivants :

- Pour l'intervalle [3 – 5] : phosphate monosodique (0,05 M)/ phosphate disodique (0,05 M).
- Pour l'intervalle [5 – 7] : phosphate disodique (0,05 M)/ phosphate monosodique (0,05M).



**Figure 20.** Gamme de filtrats pour faire le dosage à différentes pH.

### 2.7.2 Effet de la température sur l'activité enzymatique

L'effet de la température d'incubation est déterminé par mesure de l'activité protéasique de l'extrait brut incubé pendant 1 heure à des températures variant de 30°C à 70°C avec un incrément de 5°C, à pH optimal.

### 2.7.3 Calcul des paramètres cinétique

L'effet de la caséine sur l'activité protéasique de l'extrait brut est étudié à un pH de 5 avec des concentrations de 2,5% à 5,5% dissoute dans citrate de sodium 0,02M. Avec un incrément de 0,5%.

## **RESULTATS ET DISCUSSION**


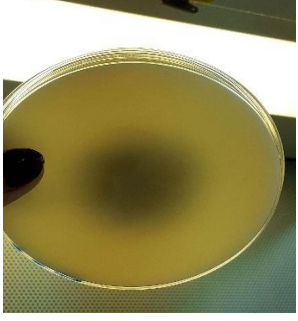
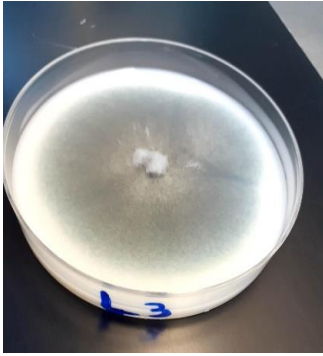
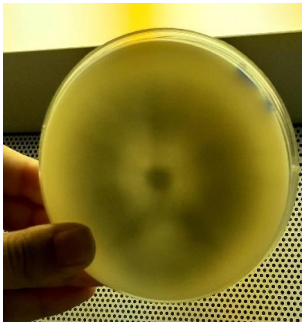
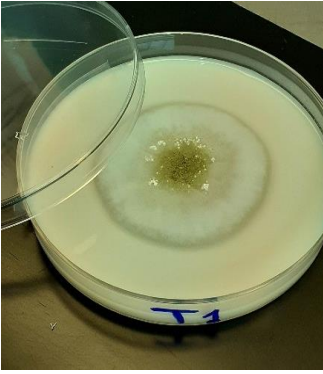

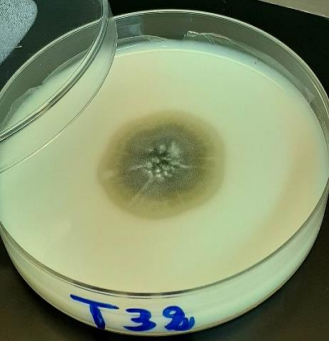

## 1. Identification morphologique des souches

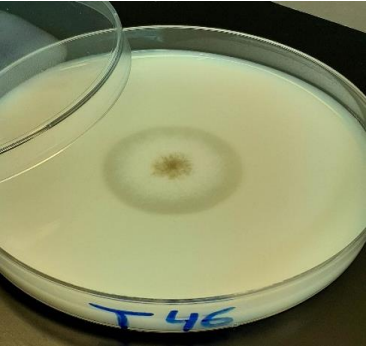

L'identification des souches obtenues étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature (**Botton *et al.*, 1990 ; Guiraud., 1998**), dont en se concentrant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies (cloisonnement du mycélium, forme des spores, forme des organes de fructification, etc.).

### ❖ Aspect macroscopique

On a étudié l'aspect macroscopique de nos souches après l'incubation à 30°C pendant 48 heures sur un milieu gélose au lait, on a effectué l'observation à l'œil nu. Les résultats d'observation sont résumés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 3.** Caractères morphologiques de la souche fongique.

Souche	Aspect	Texture	Couleur de colonie	Photos	
				Face	Revers
<i>A.nidulans</i>	Rond	Poudreuse	Blanc Revers : noire		
<i>A.fumigatus</i>	Rond	Poudreuse, Verruqueuse au centre	Vert foncé Revers : vert foncé		
<i>A.flavus</i>	Rond	Poudreuse, Granuleuse	Blanc, tache jaune au centre Revers : beige		
<i>A.niveus</i>	Rond	Poudreuse	Vert Revers : Jaune avec centre marron		

<i>A.terreus</i>	Rond	Poudreuse	Blanc, tache marron au centre Revers : jaune		
------------------	------	-----------	---	---	---

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


Le choix des milieux de culture est déterminant pour l'isolement et le dénombrement des microorganismes, ainsi que dans la mise en évidence de l'activité enzymatique et surtout dans le choix de la substance protéique employée comme substrat pour la production des protéases (Clarke et Steel, 1966).

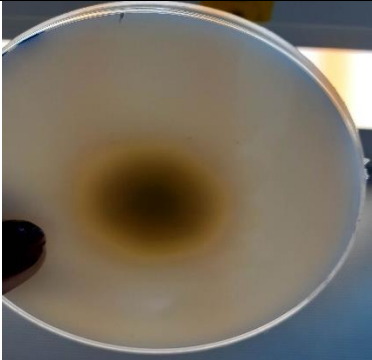

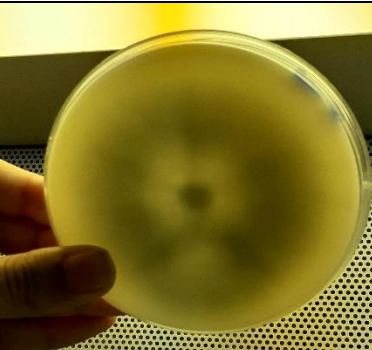
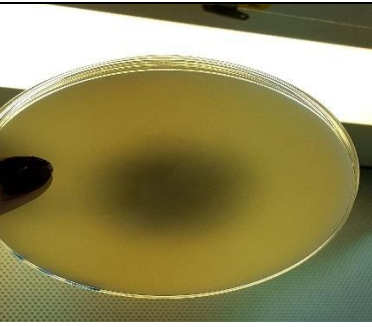
Pour cet objectif les cinq souches ont subi un test de l'activité protéolytique sur un milieu gélosé à base de lait écrémé comme milieu sélectif. Après l'incubation à 30 °C pendant 48 h, nous observons des zones de lyse de différentes dimensions.

Toutes les souches *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.niveus*, *A.terreus* ont développé des zones de lyse (halo transparent) sur ce milieu résultant de la dégradation du milieu par l'exo-protéase produite et qui entoure les colonies, plus les halos est grande, plus la quantité d'enzyme est importante. Alors que la souche *A.nidulans* est caractérisée par l'absence de la zone d'hydrolyse.

En se basant sur le diamètre de lyse différentes souches, *A.flavus* avec 07mm de diamètre est la souche la plus performante. Cette dernière est retenue pour la suite de notre travail (la production de la protéase). Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 4.** Mise en évidence l'activité protéolytique dans un milieu lait gélosé.

Souche	Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm)	Photos
<i>A.flavus</i>	07	

<i>A.niveus</i>	04	
<i>A.terreus</i>	05	
<i>A.fumigatus</i>	03	
<i>A.nidulans</i>	00	

### 3. Revivification de la souche *A.flavus* en milieu PDA

Après la confirmation de la souche la plus performante en milieu précédent (Agar Au lait) en fonction du diamètre de la colonie et de la zone de lyse mesurée, on a choisi cette souche pour réaliser la fermentation en milieu PDA (voire la figure 21).





**Figure 21.** Revivification de la souche *Aspergillus flavus*.

#### 4. Dosage de l'activité enzymatique et du taux de protéines

Le dosage de la concentration en protéines totales et de l'activité enzymatique dans l'extrait brut montre les résultats ci-dessous.

**Tableau 5.** Dosage la teneur en protéines et l'activité protéolytique.

	<b>Volume (ml)</b>	<b>Taux de protéines (mg)</b>	<b>Activité totale (UI)</b>
<b>Extrait brut</b>	200	308,8	2500,36
<b>Culot 30%</b>	20	25,46	178,89

Le dosage de l'activité protéolytique par la méthode colorimétrique est exprimé dans le tableau ci-dessus en unité (U) de protéase est l'équivalent de 1  $\mu\text{g}$  de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau, on remarque une faible activité protéolytique (2500,36U) dans l'extrait brut.

Afin de concentrer notre échantillon, on a procédé à une précipitation par le sulfate d'ammonium. Le tableau montre une absence totale de l'activité enzymatique, contrairement aux résultats de la culture sur milieu agar au lait qui montre une activité importante.

Ces résultats suggèrent que le milieu est pauvre en protéines responsable de provoquer notre souche à synthétiser la protéase et donc le milieu n'est pas inductible.

# **CONCLUSION**

## CONCLUSION

La fermentation est réalisée sur milieu liquide composé du lactosérum provenant de la fabrication du camembert. Ce dernier a subi une déprotéinisation suivie d'un enrichissement.

Après une incubation de 7 jours à 30°C sous une agitation de 150 rpm, le milieu de culture a subi une filtration afin d'obtenir l'extrait enzymatique brut suivit à une purification partielle en utilisant le sulfate d'ammonium à 30%.

Le dosage de l'activité protéolytique et du taux protéines ont révélé un taux de protéine de 308,8 mg avec une très faible activité enzymatique, ce qui suggère que le milieu est pauvre en protéines qui provoquent les souches à produire la protéase et donc le milieu est non inductible.

Une optimisation du milieu de culture devrait aider à augmenter la capacité de la souche à produire l'enzyme d'intérêt.

En résumé, le stage que nous avons effectué au niveau du Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt) nous a permis de se familiariser avec les différents équipements existants et aboutir à la réalisation des différentes étapes de production d'une enzyme d'origine microbienne.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- **Alais C., (1975).** Sciences du lait. Principes et techniques laitières. Masson. Paris. P. 108- 645.
- **Anonyme., (2012).** *Aspergillus flavus* et autres moisissures productrices d'aflatoxines, ANSES, 3p.
- **Assamoi A. A., Destain J., Thonart P., (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(2); 281–294.
- **Auberger B., Lamberet G et Lenoir J., (1985).** Les activités enzymatiques de *Penicillium camemberti*. *Sciences des aliments*, 5, 239-243.
- **Auberger B., Mechakra A., Remeuf F et Lenoir J., (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*. 19 : 633-675.
- **Aviron Violet P., Baret J. L., Bertrand C., Blazy B et Bouvier F., (1982).** Les enzymes : Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp. 23; 123; 140–153.
- **Azzoune N., (2010).** Etude des populations du genre *Aspergillus* et de leur mycotoxines isolée des épices et des légumes secs. Option : Biochimie et microbiologie Appliquée.
- **Badillet G., De Briève C., Guèhoe., (1987).** Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*. Ed. VARIA, Paris.
- **Barnali R. B., Ajit B. K et Manas D., (2008).** Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillusniger* AB100 grown on fish scale. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:449–455.
- **Benedykt W et Katarzyana P., (2008).** Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 13: 212-229.
- **Bennett J., (2010).** An Overview of the Genus *Aspergillus*. In M. Machida and K. Gomi (ed.), *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*.

- **Bergmeyer H. U., Gawekn K et al., (1979).** Principes de l'analyse enzymatique. Tech. Et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.
- **Boiron P., (1996).** Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P: 13-69.
- **Botton B., Breton A., Fèvre M., Guy P., Larpent J. P et Veau P., (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.
- **Capotorti G., Digianvincenzo P., Cesti P., Bernardi A., Guglielmetti G., (2004).** Pyrene and benzo[a]pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegr.*, 15; 79–85.
- **Champion R., (1997).** Identifier les champignons transmis par les semences. Ed. Editions Quae, France, 398 p.
- **Chasseur C., Nolard N., (2003).** Les champignons de l'habitat 1<sup>ère</sup> partie : introduction a la mycologie, risques pour la sante, EXPERTISES.P :3.4.7.8
- **Chellappan S., Jasmin C., Basheer S. M., Elyas K. K., Bhat S. G., Chandrasekaran M. M., (2006).** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Proc. Biochem.*, 41; 956–961.
- **Clarke P. H et Steel K. J., (1966).** Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London. P.111.
- **Colwell R. R et Grigorova R., (1989).** Methods in Microbiology, Volume 19 : Current Methods for Classification and Identification of Microorganisms.. *Journal of Basic Microbiology*, 29(6), 360-360.
- **De La Fuente B. T et Alais C., (1975).** Solvation of Casein in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 58(3), 293-300.
- **Desmazeaud M et Hermier J., (1968).** Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 8 (4) : 565-577.
- **Desmazeaud M. J et Bergère J. L., (1978).** Peptide hydrolases of *Lactobacillus casei* : Isolation and general properties of various peptidase activities. *Journal of Dairy Research*, 45(3), 445-455.
- **Desoubaux G., Chandénier J., (2010).** *Aspergillus* et maladies aspergillaires. *Feuillets de Biologie*, 51(293):11.

- **Devi M. K., Banu A. R., Gnanaprabha G. R., Pradeep B. V et Palaniswamy M., (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian journal of science and technology*, 1(7), 1-6.
- **D'Halewyn Leclerc J. M., King N., Bélanger M., Legris M., Frenette Y., (2002).** Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Ed. Québec, p : 4.
- **Drouin M., (2005).** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de *Maître ès sciences* (M.Sc.). Canada.
- **Durand G et Monsan P., (1982).** Les enzymes. Production et utilisations industrielles. Eds. Gauthier-Villars.
- **Dursun A. Y., (2003).** The effect of pH on the equilibrium of heavy metal biosorption by *Aspergillus niger*. *Fres. Environ. Bull.*, 12; 1315–1322.
- **Fedrick I. J., Aston J. W., Nottingham S. M et Dulley J. R., (1986).** The effect of a neutral fungal protease on cheddar cheese ripening. *New Zealand J. Dairy Sci Technol.* 21: 9-19.
- **Frazier W. C., (1967).** Food microbiology. Academic presse. London.3-429.
- **Gelinas P., (1995).** Répertoire des micro-organismes pathogènes transmis par les aliments, Edisem, St Hyacinthe, Québec.
- **Gupta R., Beg Q. K et Lorenz P., (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 15- 32.
- **Hameed U., Mahmood Z et Javed M. M., (2003).** *Solid state fermentation for the production of  $\alpha$ -amylase by paenibacillus amylolyticus.* 6.
- **Haussner K., Hilgendor P., Hofbauer C., Demeester J et Lauwers A., (1996).** New international F.I.P. method for the determination of the activity of *Aspergillus oryzae* proteases. *Pharmazie.* 51 (12): 946-50.
- **Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F et al., (2007).** A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111:509-47.
- **Hölker U et Lenz J., (2005).** Solid-state fermentation Are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 301-306.

- **Jing W., Zhengyu J., Bo J., Xueming X., (2003).** Separation and identification of exoand endoinulinase from *Aspergillus ficuum*. *Curr. Microbiol.*, 47; 109–112.
- **Keay L et Moser P. W., (1969).** Differentiation of alkaline proteases from *Bacillus* species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 34: 600-604.
- **K., Nakajima T., Iguchi Y., (2004).** Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65; 74–83.
- **Lee C. Z., Liou G. Y., Yuan G. F., (2004).** Comparison of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* by amplified fragment length polymorphism. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 45; 61–68.
- **Liu J. Z., Weng L. P., Zhang Q. L., Xu H., Ji L. N., (2003).** A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.*, 14; 137–141.
- **Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL et Randall R. J., (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: pp.265–75.
- **Maeda H., Sano M., Maruyama Y., Tanno T., Akao T., Totsuka Y., et al., (2003).** Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61; 502– 511.
- **Mallea M., Renard M., Charpin J., (1982).** La flore fongique des habitations. *Rev Fr Mal Respir.* 10: 121-130.
- **Martinelli S. D et Kinghorn J. R., (1994).** *Aspergillus: 50 years on* (p. 851). Amsterdam: Elsevier.
- **Mechakra A., Auberger B., Remeuf F et Lenoir J., (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sciences des aliments*, 19(6), 663-675.
- **McKenzie R. M., (1971).** The synthesis of birnessite, cryptomelane, and some other oxides and hydroxides of manganese. *Mineralogical Magazine*, 38(296), 493-502.
- **Moodie P., (2001).** Traditional Baking Enzymes-Proteases. *American Institute of Baking, Manhattan, Kansas.*



- **Morin O., (1994).** *Aspergillus* et aspergillose : biologie. Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuse, 8-600-A-10.
- **Mukherjee A. K., Adhikari H et 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.
- **Murphy R. A., Horgan K. A., (2005).** Antibiotics, enzymes and chemical commodities from fungi, in Kavanagh K., *Fungi: Biology and applications*, John Wiley & Sons Ltd, England. pp. 125; 134.
- **Ooi C. K., Rasit N., and Abdullah W. R., (2021).** Optimization of Protease from *Aspergillus niger* under Solid-State Fermentation Utilizing Shrimp Shell Substrate. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 14809 -14824.
- **Osterlund B et Janson J. C., (1997).** A strategic Approach to protein purification. *Pharmacia. Biotechnol.* 2 (3): 8-10.
- **Paranthaman R., Alagusundaram K., Indhumathi J., (2009).** Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agric. Sci.*, 5(3); 308-312.
- **Pelmont J., (1995).** Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. pp. 7; 621; 652–654.
- **Penasse L., (1974).** Les enzymes cinétiques et mécanisme d'action. Masson. Paris. P. 58- 86.
- **Peppler H et Perlman D., (1979).** *Microbial technology*. Academic press. San Francisco. P. 42-60.
- **Pitt J. L., (1988).** Laboratory guide to common *Penicillium* species. Academic Press, London.
- **Rahardjo Y. S. P., Tramper J et Rinzema A., (2006).** Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation : A review and perspectives. *Biotechnology Advances*, 24(2), 161-179.

- **Rama Devi S et Prasad M. N. V., (1998).** Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte : Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Science*, 138(2), 157-165.
- **Ramirez Coronel M. A., Vinigera Gonzalez G., Darville A., Augur C., (2003).** A novel tannase from *Aspergillus niger* with beta-glucosidase activity. *Microbiol.*, 149; 2941– 2946.
- **Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V., (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62; 597–635.
- **Raper K., Fennel D. J., (1965).** The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimor.
- **Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., and Ashraf M., (2019).** Microbial Proteases Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.*
- **Reboux G., Bellanger A., Roussel S., Grenouillet F et Million L., (2010).** Pollution atmosphérique, Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées, *Revue française d’allergologie* 50 : 611–620
- **Regnault J. P., (1990).** Microbiologie générale, (edn) Decarie. Paris.
- **Rymowicz W., Lenart D., (2003).** Oxalic acid production from lipids by a mutant of *Aspergillus niger* at different pH. *Biotechnol. Lett.*, 25; 955–958.
- **Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A., (2005b).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40; 2689–2694.
- **Scriban R., (1993).** *Biotechnologie*. 4e édition. Tech. Et Doc. Lavoisier. Paris. P 39; 42; 351- 356.
- **Scriban R., (1999).** *Biotechnologie*. 5eme edition. Technique et documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.
- **Singhania R. R., Patel A. K., Soccol C. R et Pandey A., (2009).** Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 44. 13-18.
- **Singh A., Ghosh V. K., Ghosh P., (1994).** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters Appl. Microbiol.*, 18; 177-180.
- **Singh R., Mittal A., Kumar M., Mehta P. K., (2016).** Microbial protease in commercial applications. *J PharmChemBiolSci*. 4(3):365-74.

- **Stankovic K., Sève P., Hot A., Magy N., Durieu I., Broussolle C., (2006).** Aspergilloses au cours de maladies systémiques traitées par corticoïdes et/ou immunosuppresseurs : analyse de neuf cas et revue de la littérature. *La Revue de médecine interne*. 27 : 813–827.
- **Sumantha A., Deepa P., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C.R et Pandey A., (2006).** Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49 (5): 843-851.
- **Sumantha A., Larroche C et Pandey A., (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211.
- **Tabuc T., (2007).** Flor fongique de différents substrats et condition optimal de production des mycotoxines. Spécialité : Pathologie, Mycologie, Génétique et Nutrition, p 12, 14, 26, 66.
- **Trap C et Boireau P., (2000).** Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res. P.* 31: 461- 471.
- **Tunga R., Shrivastava B., Banerjee R., (2003).** Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Proc. Biochem.*, 38; 1553–1558.
- **Vishwanatha K. S., Appu Rao A. G et Singh S. A., (2009).** Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114: 402-407.
- **Wang S. L., Chen Y. H., Wang C. L., Yen Y. H., Chern M. K., (2005b).** Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme Microb. Technol.*, 36; 660–665.
- **Ward O. P., Qin W. M., Dhanjoon J., Ye J., Singh A., (2006).** Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. Appl. Microbiol.*, 58; 1-55.
- **Wu T. Y., Mohammad A. W., Jahim J. Md., Anuar N., (2006).** Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, 39; 1223–1229.
- **Zaneveld L. J. D., Polakoski K. L., (1975).** Schumacher GFB. The proteolytic enzyme systems of mammalian genital tract secretions and

spermatozoa. In: Reich E, Rifkin DB, Shaw E, eds. Proteases and Biological Control. ColdSpring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 683-706.

- <https://www.pinterest.com/pin/369224869447405227/>
- <https://www.shutterstock.com/fr/image-vector/structure-aspergillus-1107348494>
- <https://fr.wikipedia.org/wiki/Hyphe#/media/Fichier:Hyphe.svg>
- [https://www.researchgate.net/figure/Structure-du-mycelium-et-mode-de-reproduction-des-moisissures-C-CRC\\_fig3\\_344436361](https://www.researchgate.net/figure/Structure-du-mycelium-et-mode-de-reproduction-des-moisissures-C-CRC_fig3_344436361)

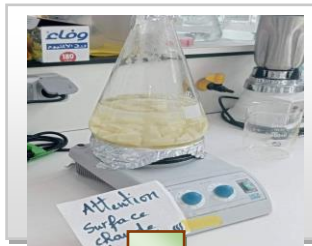
# **ANNEXES**

### Annexe 01 : Préparation de milieu PDA.

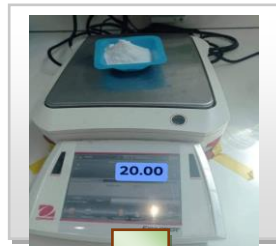
Pomme de terre .....	200 g
Glucose .....	20 g
Agar .....	20 g
Eau distillée.....	Compléter jusqu'à 1000 ml

#### Protocole

- Laver la pomme de terre non pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min.
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Compléter le volume à 1000 ml.
- ajuster le pH=  $6,4 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$
- Stériliser par autoclavage à  $121^{\circ}\text{C}$  / 15 min.



A



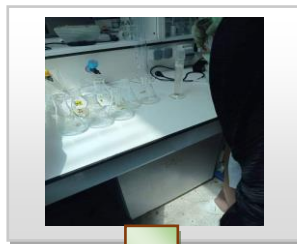
B



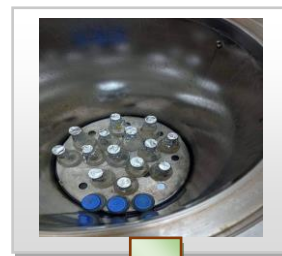
C



D



E



F

Figure 1. Etapes de la préparation de milieu PDA.

## **Annexe 02 : Préparation de milieu Agar au lait.**

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

13.5 g Agar .....dans 600 ml Eau distillée.

10.5 g Lait en poudre.....dans 350 ml Eau distillée.

### **Protocole**

- ✓ Mesuré par une balance 10,5g poudre de lait et nous versons dans l'erenmeyer avec 350 ml d'eau distillée.
- ✓ Ajouter de 13,5g d'agar.
- ✓ Compléter le volume jusqu'à 600 ml d'eau distillée.
- ✓ Porter sur agitateur magnétique chauffant, pour l'ébullition pendant 30 à 45 min.
- ✓ Puis stérilisé le milieu de lait gélosé par l'autoclave à 120°C pendant 30 minutes.
- ✓ Sous la hotte, couler le milieu dans des boites de pétrie pour l'expérience.

## **Annexe 03 : Protocole de la méthode de Lowry**

### **🚦 Solutions nécessaires**

Solution A : réactif du Folin-ciocalteu dilué à ½ dans du NaOH (0,1N).

Solution B : 2% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans de NaOH (0,1N).

Solution C1 : 0,5% de CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O dans l'eau distillée.

Solution C2 : 1% tartrate double de sodium et de potassium (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O) dans l'eau distillé.

Solution M : c'est un mélange de 100µl de la solution C1, 100µl de la solution C2 et 10ml de la solution B.

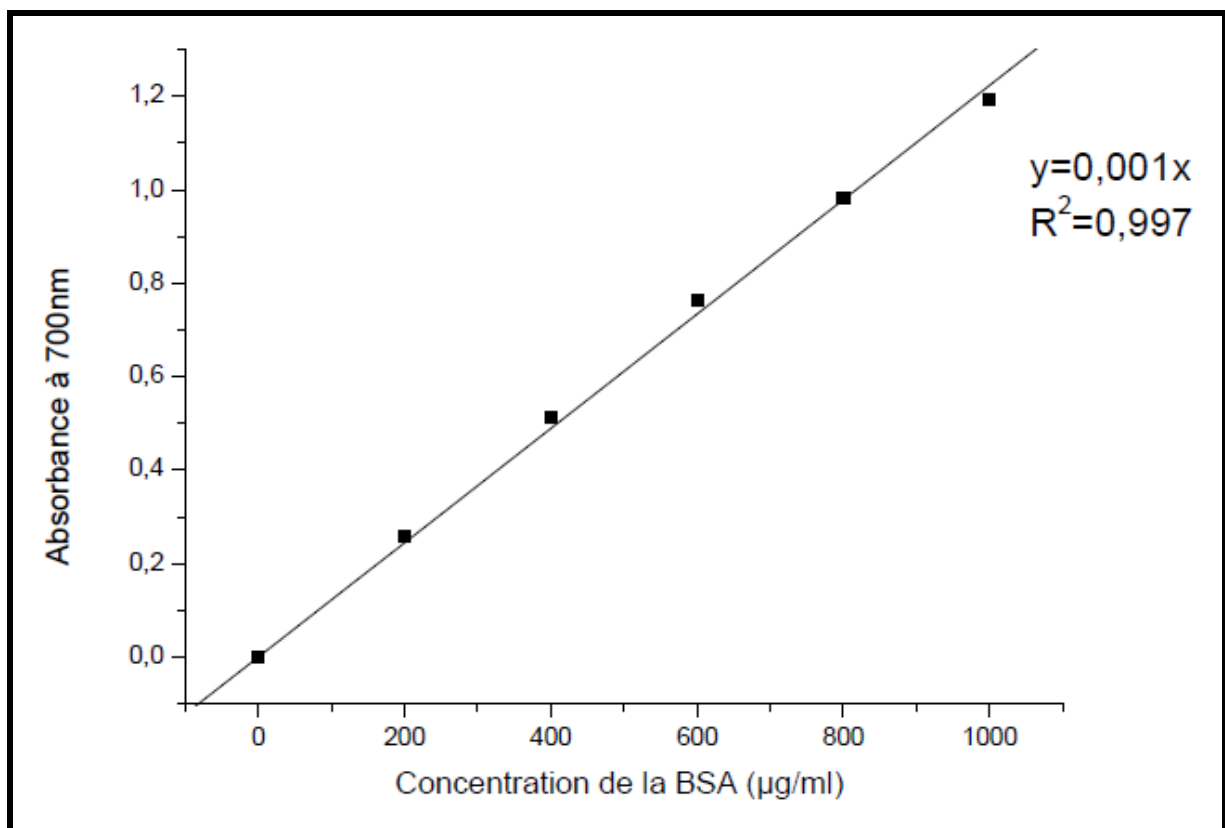
Solution mère de BSA (bovine sérum albumine) à 1000µg/ml pour l'étalonnage.

### **✓ Préparation de la courbe d'étalonnage**

La gamme-étalon est établie à partir d'une solution mère de BSA dont les concentrations sont comprises entre 0 et 1000µg/ml. Le mélange réactionnel de différentes concentrations est préparé selon le même protocole décrit ci-dessus et comme l'indique le tableau suivant :

<b>Dilution</b>	<b>0</b>	<b>1/5</b>	<b>2/5</b>	<b>3/5</b>	<b>4/5</b>	<b>1/5</b>
<b>Solution mère (ml)</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>120</b>	<b>160</b>	<b>200</b>
<b>Eau distillée (ml)</b>	<b>200</b>	<b>160</b>	<b>120</b>	<b>80</b>	<b>40</b>	<b>0</b>
<b>Mélange M (ml)</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

La lecture des absorbances de différentes concentrations, a permis de tracer la courbe d'étalonnage (voir figure n°02).



**Figure 02.** La courbe d'étalonnage des protéines.

#### **Annexe 04 : Protocole de dosage de l'activité enzymatique**

##### **🚦 Solutions nécessaires**

Solution de caséine 2,5% dissoute dans citrate de sodium (0.02M).

Tampon phosphate  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$  (0,05 M) pH 5.

Solution d'acide trichloracétique (T.C.A) à 4%.



Solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% dans du NaOH (0,1N).

Réactif de Folin-Ciocalteu dilué à  $\frac{1}{2}$  dans du NaOH (0,1N).

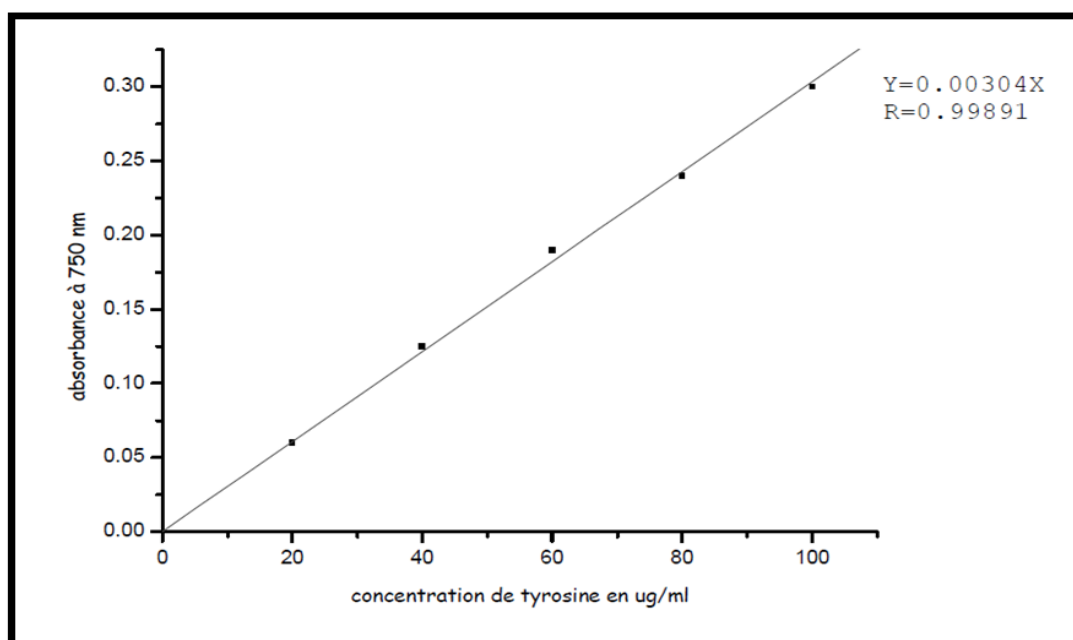
Solution mère de la tyrosine avec une concentration de  $100\mu\text{g/ml}$  pour l'étalonnage.

### ✓ Préparation de la courbe d'étalonnage

La gamme-étalon est établie à partir d'une solution mère de tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et  $100\mu\text{g/ml}$  selon le même protocole décrit précédemment pour le dosage de l'activité. Cependant, l'extrait enzymatique est remplacé par la solution de tyrosine comme l'indique le tableau suivant :

Concentration en tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	20	40	60	80	100
Solution mère de tyrosine (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
TCA (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (ml)	2	2	2	2	2	2
Folin-Ciocalteu (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eau distillée (ml)	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5

Les lectures au spectrophotomètre à 750 nm des différentes concentrations ont permis de tracer la courbe d'étalonnage (voir figure n°3).



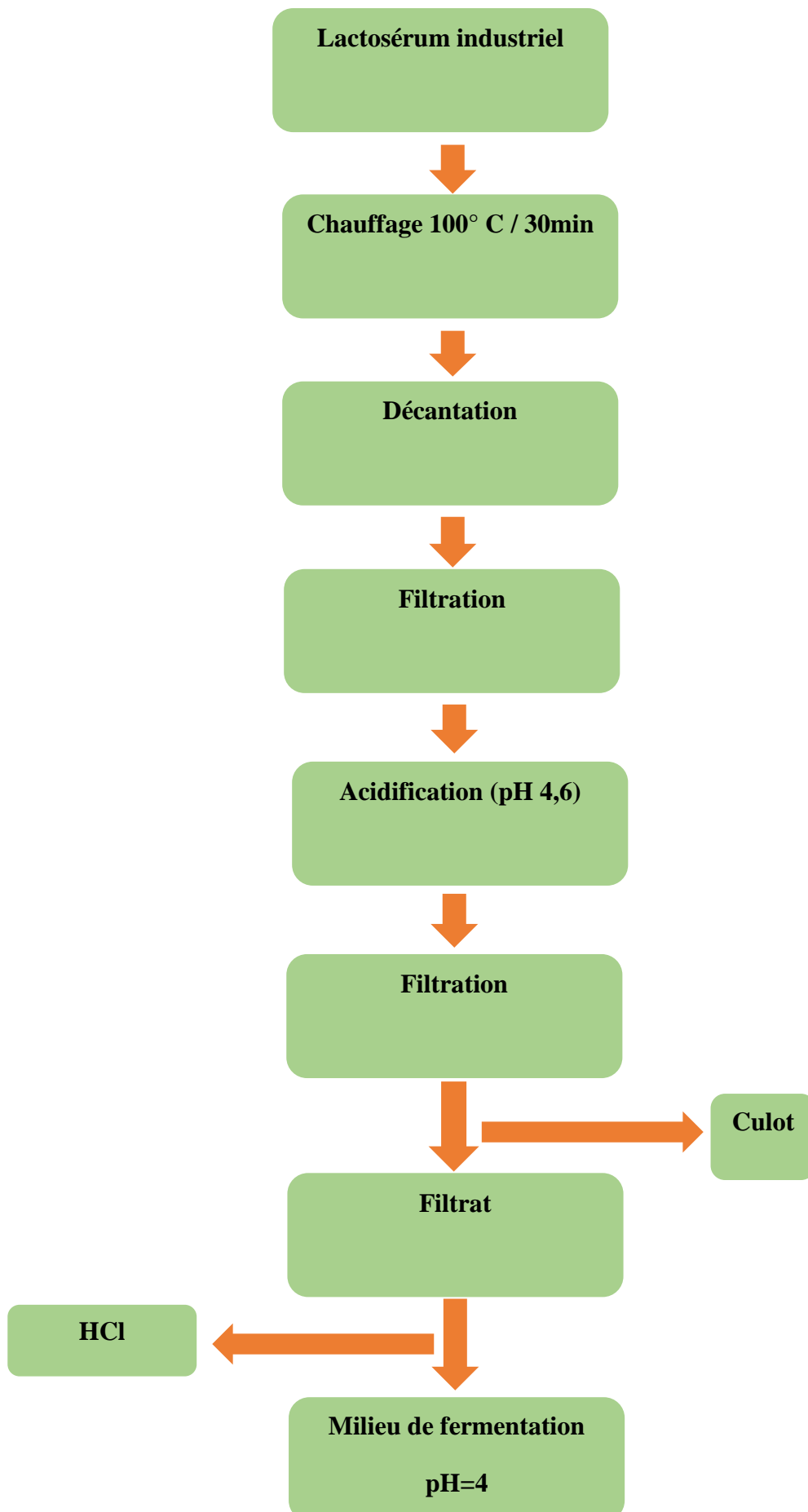
**Figure 03.** La courbe d'étalonnage de la tyrosine.

### Annexe 05 : Solution tampon phosphate

Tableau 01. Etapes de préparation la solution tampon phosphate.

<b>Solution phosphate monosodique</b>	<b>Solution phosphate disodique</b>
Dans une fiole jaugée dissolvez : 0.68g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ Dans l'eau distillée et complète à 100 ml. Par le pH mètre ; on mesure le pH de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ est 4.40	Dans une fiole jaugée dissolvez : 0.87g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ Dans l'eau distillée et complète à 100 ml. Par le pH mètre ; on mesure le pH de $\text{K}_2\text{HPO}_4$ est pH 9.04
Ajuste le pH = 4,40 de la solution phosphate monosodique avec la solution phosphate disodique.	

**Annexe 06 : Préparation du milieu de fermentation.**



# **RESUMES**

# RESUME

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la production d'une protéase acide d'origine microbienne. Cinq souches du genre *Aspergillus* ont été testées pour leur capacité de produire l'enzyme d'intérêt. La mise en évidence de l'activité protéolytique a été réalisée sur milieu gélosé au lait à 30°C après une incubation de 48 heures. Ce test a révélé que quatre souches seulement ont la capacité de dégrader la caséine du lait qui se traduit par une zone de protéolyse. Parmi ces souches, et en se basant sur le diamètre de la colonie et de la zone de lyse mesurée, on a sélectionnée la souche *Aspergillus flavus* pour la suite du travail. Une fermentation sur milieu liquide préparé à base de lactosérum provenant de la fabrication du camembert de l'unité de production Numidia. Après 7 jours d'incubation à 30°C, l'extrait enzymatique est obtenu par simple filtration sur papier Whatman. Afin de concentrer l'extrait enzymatique, on a procédé à une précipitation par le sulfate d'ammonium à 30%. La production de l'enzyme est estimée par un dosage de l'activité protéolytique. Les résultats obtenus montrent une très faible activité protéolytique, ce qui suggère que lactosérum utilisé est un milieu non favorable à la production des protéases par l'espèce étudiée.

**Mots clés :** *Aspergillus*, Lactosérum, Protéase, Fermentation, Purification partielle, Activité protéolytique.

# Abstract

This work is part of the production of an acid protease of microbial origin. Five strains of *Aspergillus* genus were tested for their ability to produce the enzyme of interest. The demonstration of the proteolytic activity was carried out on milk agar medium at 30° C after incubation of 48 hours. This test revealed that only four strains have the ability to degrade milk casein which results in a zone of proteolysis. Among these strains, and based on the diameter of the colony and the measured lysis zone, the *Aspergillus flavus* strain was selected for further work. A fermentation on a liquid medium prepared with whey from the production of camembert from the Numidia production unit. After 7 days of incubation at 30° C, the enzymatic extract is obtained by simple filtration on Whatman paper. In order to concentrate the enzymatic extract, precipitation with 30% ammonium sulphate was carried out. The production of the enzyme is estimated by an assay of the proteolytic activity. The results demonstrated a very low proteolytic activity, which suggests that the whey used is a medium with not favorable to the production of proteases by the studied specie.

**Keywords:** *Aspergillus*, Whey, Protease, Fermentation, Partial purification, Proteolytic activity.

## ملخص

هذا العمل هو جزء من إنتاج حامض البروتياز من أصل جرثومي. تم اختبار خمس سلالات من فطر الرشاشيات لقدرتها على إنتاج الإنزيم المطلوب. تم إثبات نشاط التحلل للبروتين على وسط أجار الحليب عند 30 درجة مئوية بعد الحضانة لمدة 48 ساعة. أظهر هذا الاختبار أن أربع سلالات فقط لديها القدرة على تحلل كازين الحليب مما يؤدي إلى ظهور منطقة تحلل البروتين. من بين هذه السلالات، واستنادا إلى فطر المستعمرة ومنطقة التحلل المقاسة، تم اختيار سلالة *Aspergillus flavus* لاستعمالها في باقي العمل. التخمر على وسط سائل محضر بمصل اللبن من تصنيع الكامبر في وحدة إنتاج نوميديا. بعد 7 أيام من الحضانة في 30 درجة مئوية، يتم الحصول على المستخلص الأنزيمي عن طريق الترشيح البسيط على ورق Whatman. من أجل تركيز المستخلص الأنزيمي، تم إجراء ترسيب بنسبة 30% من كبريتات الأمونيوم. يتم تقدير إنتاج الإنزيم بقياس نشاط التحلل. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها نشاط تحلل منخفض للغاية للبروتين، مما يشير إلى أن مصلى اللبن المستخدم هو وسط غير ملائم لإنتاج البروتياز من قبل الأنواع المدروسة.

**الكلمات المفتاحية:** الرشاشيات، مصلى اللبن، البروتياز، التخمر، التنقية جزيئية، نشاط التحلل.

**Année universitaire : 2021-2022**

**Présenté par : BOUDRAA Hind  
LEDRAA Maroua**

**Production et caractérisation d'une protéase acide à partir d'*Aspergillus flavus*.**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie**

**Résumé :** Ce travail s'inscrit dans le cadre de la production d'une protéase acide d'origine microbienne. Cinq souches du genre *Aspergillus* ont été testées pour leur capacité de produire l'enzyme d'intérêt. La mise en évidence de l'activité protéolytique a été réalisée sur milieu gélosé au lait à 30°C après une incubation de 48 heures. Ce test a révélé que quatre souches seulement ont la capacité de dégrader la caséine du lait qui se traduit par une zone de protéolyse. Parmi ces souches, et en se basant sur le diamètre de la colonie et de la zone de lyse mesurée, on a sélectionné la souche *Aspergillus flavus* pour la suite du travail. Une fermentation sur milieu liquide préparé à base de lactosérum provenant de la fabrication du camembert de l'unité de production Numidia. Après 7 jours d'incubation à 30°C, l'extrait enzymatique est obtenu par simple filtration sur papier Whatman. Afin de concentrer l'extrait enzymatique, on a procédé à une précipitation par le sulfate d'ammonium à 30%. La production de l'enzyme est estimée par un dosage de l'activité protéolytique. Les résultats obtenus montrent une très faible activité protéolytique, ce qui suggère que lactosérum utilisé est un milieu non favorable à la production des protéases par l'espèce étudiée.

**Mots-clés :** *Aspergillus*, Lactosérum, Protéase, Fermentation, Purification partielle, Activité protéolytique.

**Laboratoire de recherche :** Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt)

**Encadreur :** BELAHMADI M<sup>ed</sup> Seddik Oussama Maître de recherche B- (C.R.Bt)

**Co-encadreur :** BENCHIHEUB Meriem

MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1

**Examineur 1 :** BENKAHOUL Malika

MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1

**Examineur 2 :** GUENDOUZE Assia

MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1



