

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
Constantine 1 - Frères Mentouri University
Université Frères Mentouri - Constantine 1

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département Biologie appliquée

قسم البيولوجيا التطبيقية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie et contrôle qualité

N° d'ordre :

N° de série :

Optimisation de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels

Présenté par : Mukatanga Joel et Chimwani Michael Mashiya

Jury d'évaluation :

Président : Mme CHERFIA Radia (MCB - UFM, Constantine 1).

Encadreur : Mme BENCHIHEUB Meriem (MCB - UFM, Constantine 1).

Examinatrice : Mme MADI Aicha (MCB - UFM, Constantine 1).

Année universitaire
2022 – 2023

Remerciements

*Nous tenons dans un premier temps à exprimer nos plus vifs remerciements à notre encadreur **Mme Benchiheb Meriem M.C.B.** à l'université frères Mentouri Constantine 1 qui nous a guidées tout au long de l'élaboration de ce travail et pour ses précieux, efficaces conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion. C'est un immense honneur pour nous d'avoir effectué notre thème sous sa direction.*

*Nous tenons aussi à remercier **l'Université Frères Mentouri**, en particulier au Département de Biologie appliquée, pour nous avoir fourni les ressources nécessaires pour mener cette recherche. Leur soutien et leurs installations ont été essentiels à la réussite de notre travail.*

*On remercie également toute **l'équipe pédagogique de la faculté SNV en générale et l'équipe de LaMyBAM** pour toute l'assistance qu'ils nous ont apportée.*

*Nous remercions **Mme Cherfia Radia M.C.B** à l'université frères Mentouri Constantine 1 de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury*

*Nous tenons aussi à remercier **Mme Madi Aicha M.C.B.** à l'université frères Mentouri Constantine 1 pour avoir accepté d'examiner ce travail et donc faire partie du jury de soutenance.*

Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

A mes parents aimants, qui ont été mes piliers inébranlables de soutien tout au long de mon parcours académique. Leur amour illimité, leur encouragement et leurs sacrifices m'ont transformé en la personne que je suis aujourd'hui. A mon père qui a été mon gardien et ma source constante de soutien, merci de m'avoir insufflé une soif de connaissance et une poursuite sans relâche de l'excellence. Votre soutien inébranlable, à la fois émotionnellement et financièrement, m'a permis de poursuivre mes rêves sans hésiter. Votre dévouement à mon éducation et votre foi en mes capacités ont été la force motrice de mes réalisations.

Pour mon frère Wentland et ma sœur Daisy, votre curiosité intellectuelle et votre passion pour l'apprentissage m'ont toujours motivé à repousser les frontières de la connaissance.

A mon copine Antoinette, votre foi inébranlable en mes capacités et votre assurance constante ont été mes piliers de force.

A mes meilleurs amis, M. Kip, Brian et Joel, votre guidance, vos discussions approfondies et votre encouragement sans fin m'ont façonné dans le chercheur que je suis aujourd'hui.

-MICHAEL

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes que j'aime et
en particulier :*

Ma chère mère

Mon cher père

Mes chères sœurs (Eny et Lynn)

Ma famille et mes ami(e)s

-Joel

Liste d'abréviations

PDA : gélose dextrose à la pomme de terre (Potato dextrose agar).

SAB : Sabouraud

rpm : rotation par minute.

TCA : tri-chloro-acide.

UI : unité internationale.

SmF : Submerged Fermentation.

SSF: Solid-State Fermentation.

Liste des figures

<i>Figure 1: Classification de protéase</i>	4
<i>Figure 2 : Mécanisme d'action des protéases sériques</i>	4
<i>Figure 3 : La structure du domaine matures.</i>	6
<i>Figure 4 : Structure de la protéase aspartique</i>	6
<i>Figure 5 : The conidia of A. flavus.</i>	14
<i>Figure 6 : Tache argentée d'Aspergillus flavus hyphae.</i>	16
<i>Figure 7 : Aspergillus flavus sur le milieu SAB à 72 heures à 30 ° C</i>	16
<i>Figure 8: Aspect de l'halo de protéolyse sur milieu agar – lait</i>	32
<i>Figure 9 : Evaluation de l'activité protéolytique développée par A.Flavus</i>	33
<i>Figure 10 : Effet de la température sur l'activité protéolytique</i>	34
<i>Figure 11: Effet du pH sur l'activité protéolytique</i>	35
<i>Figure 12 : Effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique</i>	36

Sommaire	
Liste des abréviations	I
Liste des figures	II
Introduction	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
1. Protéases	3
1.1. Classification	3
1.1.1. Selon la réaction catalysée	3
1.1.2. Selon le pH d'activité	3
1.1.3. Selon le mécanisme catalytique	4
1.1.4. Selon la phylogénie évolutive	7
1.2. Mécanisme d'action.	7
1.3. Applications des protéases	8
1.3.1. Industrie alimentaire	8
1.3.2. Industrie des détergents	8
1.3.3. Industrie pharmaceutique	8
1.3.4. Biotechnologie	9
1.3.5. Diagnostic médical	9
1.3.6. Recherche scientifique	9
1.4. Production industrielle des enzymes de protéase	9
1.4.1. Sélection des souches	10
1.4.2. Préparation d'Inoculum	10
1.4.3. Fermentation	10
1.5. Optimisation de la production industrielle de protéase	12
1.5.1. Amélioration de la souche	12
1.5.2. Optimisation des processus	12

1.5.3. Traitement en aval	13
1.5.4. Énergie et utilisation des ressources	13
1.5.5. Automatisation	13
1.5.6. Analyse des coûts	13
2. <i>Aspergillus flavus</i>	14
2.1. Généralités	14
2.2. Phylogénie	15
2.3. Caractéristiques microscopiques et macroscopiques	15
2.4. <i>Aspergillus flavus</i> dans la production industrielle de protéases	17

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Matériel biologique	18
2. Revivification	18
3. Mise en évidence l'activité protéolytique des souches.....	18
4. Milieu de fermentation	18
5. Stérilisation.....	27
6. Ensemencement de milieu de fermentation.....	28
7. Extraction de la protéase.....	19
8. Optimisation de la production de la protéase.....	19
8.1. Evaluation de la cinétique de production de l'enzyme	19
8.2. Evaluation de l'effet de la température	19
8.3. Evaluation de l'effet du pH.....	19
8.4. Evaluation de l'effet de la concentration	20
9. Dosage de l'activité protéolytique	20

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Cinétique de la production de la protéase	22
2. Effet de la température sur la production de la protéase	23
3. Effet du pH sur la production de la protéase	24

4.Effet de la concentration du substrat sur la production de la protéase	25
Conclusion et Perspectives.....	26
Références Bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

Introduction

Introduction

Les protéases sont des enzymes qui catalyse la décomposition des protéines en peptides plus petits et en acides aminés (Franco *et al.*, 2017). Les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les microorganismes que chez les animaux et les plantes. Elles jouent des rôles cruciaux dans divers processus biologiques, y compris la dégradation des protéines, (Raju *et al.*, 1994 ; Haq *et al.*, 2006), la signalisation, la digestion, la coagulation du sang, et la réponse immunitaire.

Les protéases sont les enzymes industrielles les plus importante d'intérêt, représentant environ 60% du marché total des enzymes dans le monde et représente environ 40% du total des ventes mondiales d'enzymes. (Godfrey and West, 1996 ; Chouyyok *et al.*, 2005). Ils sont généralement utilisés dans les détergents (Barindra *et al.*, 2006), l'industrie alimentaire, le cuir, la transformation de la viande, la fabrication de fromage, la récupération de l'argent à partir de film photographique, la production de traitements digestifs et certains traitements médicaux d'inflammation et de plaies virulentes (Rao *et al.*, 1998 ; Paranthaman *et al.*, 2009).

Il existe plusieurs classes de protéases, y compris les protéases a sérine, les cystéines, les aspartiques et les métalloprotéases, chacune ayant ses propres propriétés et fonctions spécifiques. (Rawlings *et al.*, 2008).

Les enzymes de type protéases sont largement distribuées dans la nature et peuvent être trouvées dans les microorganismes (bactéries, champignons, levures), les plantes et organes des animaux (Nagy *et al.*, 2001 ; Haider et Husain, 2007), mais les enzymes d'origine microbienne montrent une productivité plus élevée (Rosolen *et al.*, 2015). Les enzymes obtenues à partir d'*Aspergillus* et de *Kluyveromyces* sont les principaux enzymes utilisés dans le milieu industriel (Klewicki, 2007).

Leur production et leur activité peuvent être influencées par divers facteurs, tels que les conditions de culture, la composition des milieux et la composition génétique de la souche productrice. Par conséquent, l'optimisation de la production et de l'activité de la protéase est devenue un objectif clé pour les chercheurs. Le processus d'optimisation vise à atteindre une activité protéasique maximale tout en minimisant les coûts et les exigences de temps.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier les différentes façons dont la production et l'activité de la protéase peuvent être optimisées. Cela sera réalisé en évaluant les effets des différentes conditions de culture (la température, le pH et la concentration du substrat) sur la production et l'activité de la protéase. Dans l'ensemble, l'optimisation de la production et de l'activité des protéases est cruciale pour des raisons scientifiques et économique.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Protéases

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines en plus petits peptides et acides aminés (Franco *et al.*, 2017). Les protéases peuvent être trouvées dans tous les organismes vivants, des bactéries aux humains, et ils jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Ils jouent des rôles cruciaux dans divers processus biologiques, y compris la dégradation des protéines, la signalisation, la digestion, la coagulation du sang et la réponse immunitaire. Il y a aussi de nombreuses applications industrielles pour les protéases telles que dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, des détergents et de la biotechnologie (Franco *et al.*, 2017).

1.1. Classification

Les enzymes protéolytiques peuvent être classées selon plusieurs critères, notamment leur mécanisme catalytique, leur spécificité de substrat et le pH d'activité.

1.1.1. Selon la réaction catalysée

Selon cette catégorie, les protéases sont subdivisées en exopeptidases ou endopeptidases. Les premières hydrolysent les liaisons peptidiques externes (amino-terminale ou carboxylique), tandis que les endopeptidases hydrolysent les liens peptidiques internes dans la protéine (Guevara and Daleo. 2018).

1.1.2. 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). La figure 1 présente la structure de la classification des protéase .

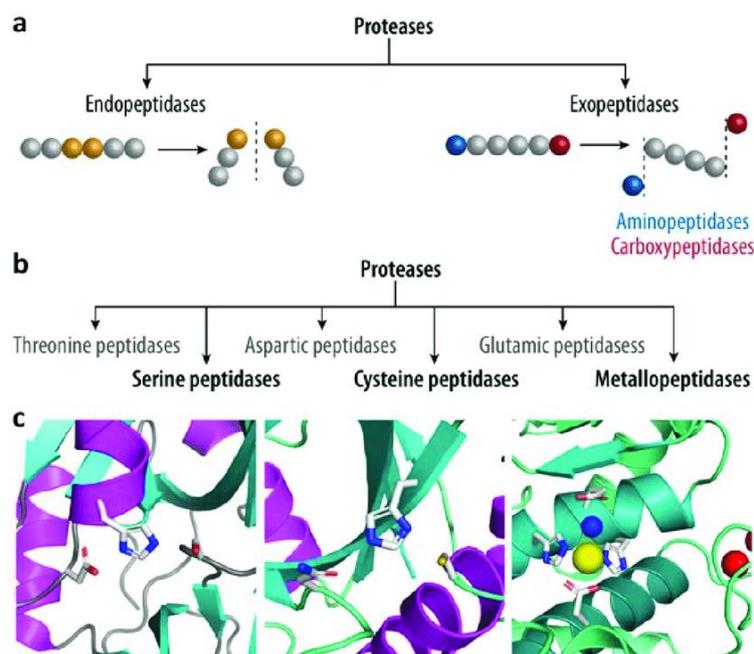


Figure 1: Classification de protéase (Ramírez-Larrota et Eckhard, 2022).

1.1.3. Selon le mécanisme catalytique

Les enzymes protéolytiques peuvent être classées en fonction du type de résidu actif utilisé dans leur site actif :

1.1.3.1. Protéases à sérine

Ces enzymes utilisent un résidu de sérine pour catalyser la réaction. Des exemples incluent la **trypsine**, la **chymotrypsine** et l'**élastase**. Le principal acteur du mécanisme catalytique dans les protéases de la sérine est la triade catalytique. La triade est située dans le site actif de l'enzyme, où se produit la catalyse, et est préservée dans toutes les superfamilles d'enzymes de la sérinoprotéase. La triade est une structure coordonnée composée de trois acides aminés : His 57, Ser 195 (d'où le nom de « protéase de la sérine ») et Asp 102. Ces trois acides aminés clés jouent chacun un rôle essentiel dans la capacité de clivage des protéases. La figure 2 présente la structure de mécanisme d'action des protéases sériques.

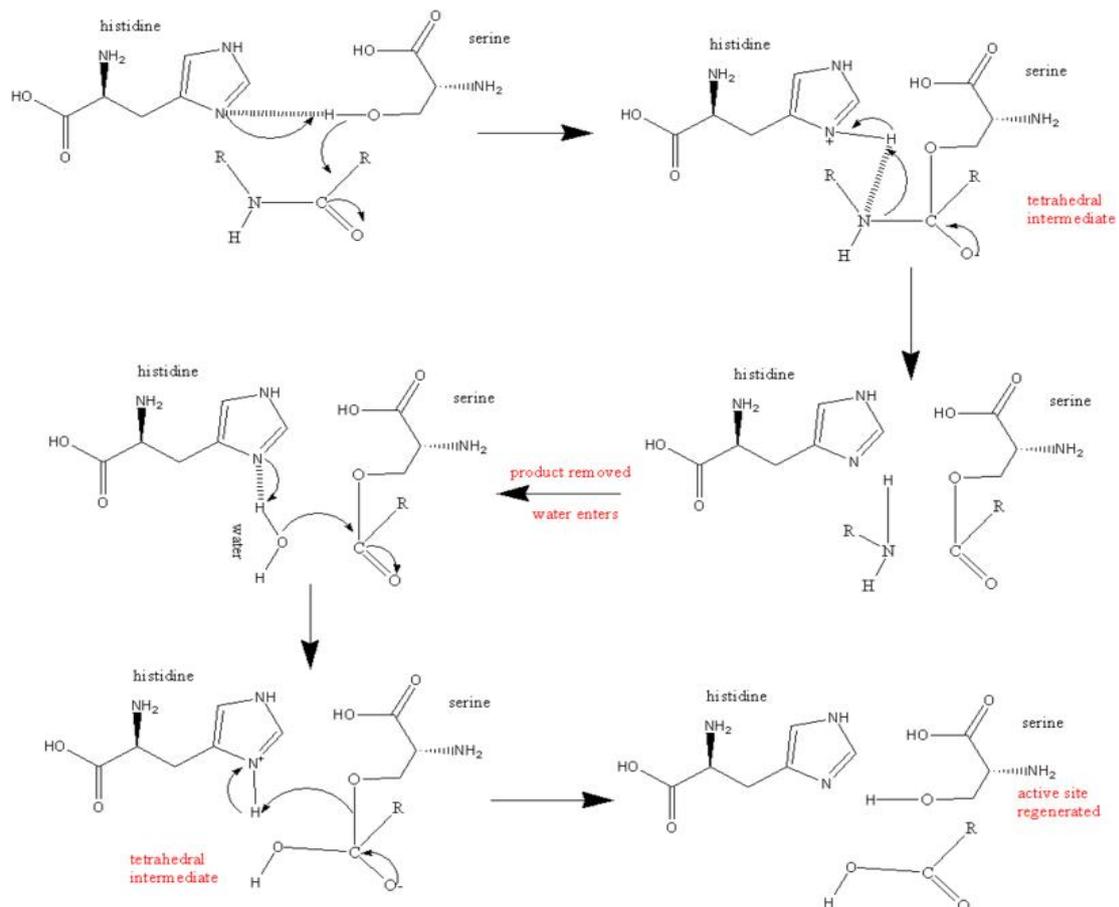


Figure 2 : Mécanisme d'action des protéases sériques (Ramírez-Larrota et Eckhard, 2022).

1.1.3.2. Protéases à cystéine

Ces enzymes utilisent un résidu de cystéine pour leur activité catalytique. Des exemples incluent la papaine et les caspases.

Ces protéases ont un résidu de cystéine (triade Cys-His-Asn) sur le site actif, qui agit comme un nucléophile pour attaquer les liaisons peptidique dans le substrat (Verma *et al.*, 2016). La figure 3 présente la structure du domaine mature de de la protéase de la cystéine

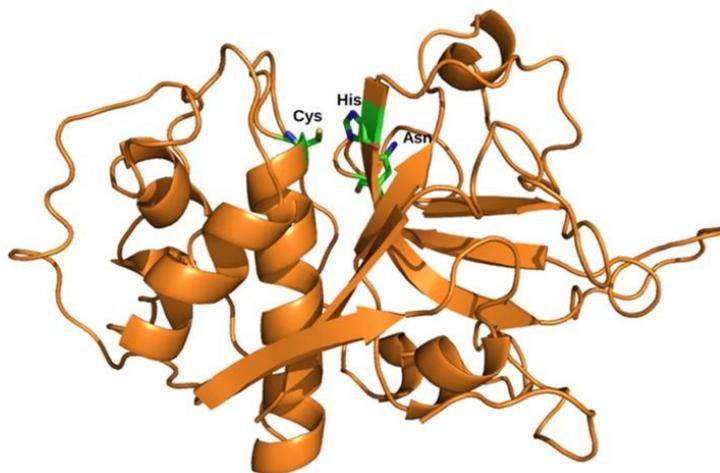


Figure 3 : Structure du domaine mature. Représentation structurelle de la protéase de la cystéine avec la maturité (Dixit et Rajnikant., 2016)

1.1.3.3. Protéases à aspartate

Ces enzymes utilisent des résidus d'acide aspartique dans leur site actif. Des exemples incluent **la pepsine** et **la protéase du VIH**. La protéase du VIH est une enzyme nécessaire à la maturation des protéines virales au cours de la reproduction du virus VIH. L'inhibition de cette protéase a été une cible pour la thérapie antirétrovirale dans le traitement du VIH / SIDA. Les exemples incluent la pepsine et la rénine (Dunn, 2013). La figure 4 présente la structure de la protéase aspartique dimérique VIH-1.

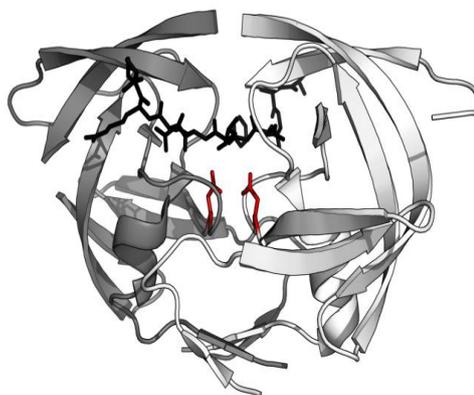


Figure 4 : Structure de la protéase aspartique dimérique VIH-1.

1.1.3.4. Métalloprotéases

Ces enzymes nécessitent un cofacteur d'ion métallique (généralement du zinc) pour leur activité catalytique. Des exemples incluent les **métalloprotéases de matrice (MMP)** et **l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)**.

1.1.3.5. Protéases à thréonine

Ces enzymes utilisent un résidu de thréonine pour leur mécanisme catalytique. Des exemples incluent le protéasome et certaines protéases virales.

1.1.3.6. Protéases à glutamate

Ces protéases ont un résidu d'acide glutamique sur le site actif, qui agit comme un nucléophile pour attaquer le lien peptique dans le substrat. Les exemples incluent l'enzyme γ -glutamyl transpeptidase, qui est impliquée dans le métabolisme des acides aminés.

1.1.4. Selon la phylogénie évolutive (la base des données Merops)

Une classification à jour des superfamilles évolutives des protéases se trouve dans la base de données MEROPS. Dans cette base de données, les protéases sont classées en premier lieu par 'clan' (superfamille) en fonction de leur structure, de leur mécanisme et de l'ordre des résidus catalytiques (par exemple, le clan PA où P indique un mélange de familles nucléophiles). Au sein de chaque 'clan', les protéases sont classées en familles en fonction de leur similarité de séquence (par exemple, les familles S1 et C3 au sein du clan PA). Chaque famille peut contenir des centaines de protéases apparentées (par exemple, la trypsine, l'élastase, la thrombine et la streptogrisine au sein de la famille S1).

Actuellement, plus de 50 clans sont connus, indiquant chacun une origine évolutive indépendante de la protéolyse.

En résumé, les protéases sont classées sur la base d'un acide aminé critique nécessaire à la fonction catalytique (par exemple, la protéase de la sérine), le pH optimal pour leur activité (acide, neutre, protéase alcaline), leur site de clivage (par ex., les aminopeptidases, qui agissent à la clé libre N de la chaîne polypeptide ou les carboxypeptidases agissant au clé C de la catégorie polypeptide) ou leur exigence pour un groupe thiol libre (Shiv Shankar, 2010).

1.2. Mécanisme d'action

En l'absence d'accélérateurs fonctionnels, la protéolyse serait très lente, prenant des centaines d'années. Les protéases font en coupant les liaisons peptidiques à l'intérieur des protéines par hydrolyse, une réaction où l'eau rompt les liens. La catalyse est réalisée par l'un des deux mécanismes suivants :

- Les aspartiques, glutamiques et métalloprotéases activent une molécule d'eau, qui effectue une attaque nucléophile sur la liaison peptidique pour l'hydrolyser.
- Les sérine, thréonine et cystéine protéases utilisent un résidu nucléophile (généralement dans une triade catalytique). Ce résidu effectue une attaque nucléophile pour lier de manière covalente la protéase à la protéine substrat, libérant la première moitié du produit. Cet intermédiaire acyl-enzyme covalent est ensuite hydrolysé par une eau activée pour achever la catalyse en libérant la deuxième moitié du produit et en régénérant l'enzyme libre (Rawlings, 2013).

1.3. Applications des protéases

Les enzymes protéolytiques ont de nombreuses applications dans divers domaines (Razzaq, 2019).

1.3.1. Industrie alimentaire

Les enzymes protéolytiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire pour la transformation des protéines. Elles sont utilisées dans la production de fromage, de yaourt, de viande transformée, de pain et dans le processus de maturation des aliments.

1.3.2. Industrie des détergents

Les enzymes protéolytiques sont utilisées dans les détergents pour éliminer les taches de protéines telles que le sang, les œufs et les taches alimentaires. Elles aident à décomposer les protéines en plus petites molécules, facilitant ainsi leur élimination.

1.3.3. Industrie pharmaceutique

Les enzymes protéolytiques sont utilisées dans la production de médicaments et de produits pharmaceutiques. Elles peuvent être utilisées pour la fabrication de médicaments enzymatiques, la purification de protéines et la production d'enzymes thérapeutiques.

1.3.4. Biotechnologie

Les enzymes protéolytiques sont utilisées en biotechnologie pour diverses applications, notamment la manipulation de l'ADN et l'ingénierie des protéines. Elles peuvent être utilisées pour couper l'ADN à des sites spécifiques, permettant ainsi la manipulation génétique et la création de produits recombinants.

1.3.5. Diagnostic médical

Certaines enzymes protéolytiques sont utilisées comme marqueurs diagnostiques dans les tests médicaux. Par exemple, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est utilisée comme marqueur pour diagnostiquer certaines maladies cardiovasculaires.

1.3.6. Recherche scientifique

Les enzymes protéolytiques sont utilisées en laboratoire pour des études de recherche fondamentale sur les protéines et les processus biologiques. Elles peuvent être utilisées pour étudier la structure et la fonction des protéines, l'activité enzymatique et les interactions protéine-protéine.

1.4. Production industrielle des enzymes de protéase

La production industrielle des enzymes de protéase implique la fermentation à grande échelle des micro-organismes tels que les champignons ou les bactéries qui ont été génétiquement modifiés pour produire des niveaux élevés de protéase (Hamzah *et al.*, 2009). La culture produisant la protéase est cultivée dans un milieu de culture riche en nutriments dans des conditions de température et de pH contrôlées. Une fois le processus de fermentation est terminé, la protéase est récoltée, purifiée, puis utilisée pour une variété d'applications. L'enzyme purifiée peut être formulée sous forme de liquide ou de poudre et est souvent stabilisée pour assurer sa stabilité et son activité pendant le stockage et l'utilisation.

L'efficacité et la rentabilité du processus de production sont des facteurs cruciaux dans la détermination du succès de la production industrielle d'enzymes de protéase.

Les étapes impliquées dans la production industrielle de protéases sont

1.4.1. Sélection des souches

La première étape dans la production des protéases est la sélection d'une souche microbienne appropriée qui peut produire des niveaux élevés de protéases dans des conditions industrielles. Il existe de nombreuses souches microbiennes connues pour leur capacité de production de protéases élevée. Certaines des meilleures souches pour la production de protéases sont :

- *Bacillus subtilis*
- *Aspergillus oryzae*
- *Bacillus licheniformis*
- *Streptomyces griseus*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Le choix de la souche microbienne pour la production de protéase dépend de divers facteurs, y compris les propriétés souhaitées des protéases, le processus de production et les techniques de traitement en aval utilisées. (Naveed *et al.*, 2021). Les souches microbiennes sont examinées en fonction de leur capacité de production de protéase, de leur taux de croissance et d'autres facteurs. (Anandharaj *et al.*, 2016).

1.4.2. Préparation d'Inoculum

La souche microbienne sélectionnée est cultivée dans une culture à petite échelle pour produire un inoculum, qui est ensuite utilisé pour inoculer le bioréacteur à grande échelle.

1.4.3. Fermentation

Le bioréacteur inoculé est ensuite rempli d'un milieu de croissance riche en nutriments, qui contient des sources de carbone, d'azote et d'autres nutritifs nécessaires à la croissance microbienne. Le bioréacteur est ensuite maintenu dans des conditions contrôlées, telles que la température, le pH et l'approvisionnement en oxygène, pour optimiser la croissance microbienne et la production de protéases.

Le choix de la méthode de fermentation pour la production de protéase dépend de divers facteurs, tels que le type de protéase, la souche microbienne utilisée, les

méthodes de traitement en aval disponibles et l'échelle de la production. Quelques méthodes de fermentation couramment utilisées pour la production de protéases :

1.4.3.1. Fermentation Fed-batch

Dans la fermentation Fed-batch, le milieu de croissance est ajouté au bioréacteur dans une série de lots, ce qui permet un meilleur contrôle sur la croissance microbienne et la production de protéase. La fermentation par lot est souvent utilisée pour la production de protéases par les bactéries et les champignons.

1.4.3.2. Fermentation continue

Dans la fermentation continue, le milieu de croissance est continuellement alimenté dans le bioréacteur, et le bouillon de culture est enlevé continuellement. Cela permet des conditions d'état stable, ce qui peut améliorer la croissance microbienne et la production de protéases. La fermentation continue est souvent utilisée pour la production de protéases à grande échelle.

1.4.3.3. Fermentation à l'état solide (SSF)

Dans SSF, la souche microbienne est cultivée sur un substrat solide, tel que la poutre de riz, la poutre de blé ou la poussière de soie, qui fournit à la fois des nutriments et une surface pour l'attachement microbien. SSF est souvent utilisé pour la production de protéases par des champignons filamenteux, tels que *Aspergillus* et *Penicillium*. (Gimenes *et al.*, 2019, Soccol *et al.*, 2017).

1.4.3.4. Fermentation souterraine (SmF)

Dans SmF, la souche microbienne est cultivée dans un milieu liquide, généralement dans un bioréacteur en réservoir mélangé ou un bioréacteur à colonne de bulle. SmF est souvent utilisé pour la production de protéases par des bactéries, telles que *Bacillus* et *Pseudomonas*. L'approche présente des avantages tels que le contrôle des variables physicochimiques plus simples, une meilleure distribution des composants moyens et la récupération des enzymes extracellulaires. Les enzymes résultantes sont moins stables et plus diluées, cependant. (Anandharaj *et al.*, 2016, Gimenes *et al.*, 2019).

Par rapport à SmF, le SSF offre des avantages de faible coût, de simplicité, de rendement plus élevé, de stabilité du produit, de faibles exigences en matière de stérilité et de possibilité d'exploiter de nombreux déchets agro-industriels comme

substrat (Contesini *et al.*, 2018). Cependant, un nombre limité de micro-organismes peut croître dans des conditions d'humidité réduite, ce qui est une limitation de la SSF.

La méthode de fermentation optimale doit être choisie en fonction des exigences spécifiques du processus de production.

1.5. Optimisation de la production industrielle de protéase

Les chercheurs ont utilisé une variété de méthodes pour augmenter le rendement de l'enzyme de protéase dérivée de micro-organismes, y compris le clonage, la fermentation du lot alimentaire et du chimiostat, l'optimisation des paramètres en utilisant la méthode d'un facteur à un moment, et des techniques statistiques telles que la méthodologie de la surface de réponse. (Thakur *et al.*, 2020). Il existe plusieurs façons d'optimiser la production industrielle d'enzymes de protéase, notamment (Guleria *et al.*, 2015; Banerjee and Ray, 2017; Gimenes *et al.*, 2019).

1.5.1. Amélioration de la souche

Cela implique l'utilisation de techniques d'ingénierie génétique pour modifier les micro-organismes utilisés dans la fécondation pour produire des rendements plus élevés de protéase.

1.5.2. Optimisation des processus

Cela implique la finition des conditions de fermentation, telles que la température, le pH et les niveaux de nutriments, pour maximiser la production de protéase. L'amélioration des conditions de fermentation est cruciale pour optimiser la production industrielle d'enzymes de protéase. Les étapes suivantes peuvent être prises pour y parvenir (Balachandran *et al.*, 2021).

1.5.2.1. Identification de la température optimale

La température doit être réglée dans la plage permettant une croissance et une production de protéases optimales par les micro-organismes.

1.5.2.2. Contrôle du pH

Le niveau de pH doit être maintenu dans la plage optimale pour la production de micro-organismes et de protéases. Cela peut être obtenu en ajoutant des régulateurs du pH tels que l'acide acétique ou l'hydroxyde de sodium.

1.5.2.3. Optimisation de niveaux de nutriments

Les taux de nutritifs doivent être optimisés pour garantir que les micro-organismes ont tous les ingrédients nécessaires pour une croissance et une production de protéases optimales. Cela peut être obtenu en ajoutant des nutriments tels que les acides aminés, les vitamines et les minéraux.

1.5.2.4. Contrôle des niveaux d'oxygène dissous

Les taux d'oxygène dissous doivent être surveillés et maintenus dans une plage optimale pour s'assurer que les micro-organismes reçoivent suffisamment d'Oxygène pour la croissance et la production de protéases.

1.5.3. Traitement en aval

Cela implique le développement de méthodes efficaces et rentables pour purifier et stabiliser la protéase après la fermentation.

1.5.4. Énergie et utilisation des ressources

Cela implique de minimiser les déchets générés au cours du processus de production et de maximiser l'utilisation de ressources telles que l'eau, la chaleur et les nutriments.

1.5.5. Automatisation

Cela implique l'intégration de systèmes d'automatisation et de contrôle pour optimiser le processus de fermentation et minimiser le travail manuel.

1.5.6. Analyse des coûts

Cela implique la réalisation d'une analyse de coût complète afin d'identifier les domaines dans lesquels le coût peut être réduit et d'améliorer l'efficacité globale et la rentabilité du processus de production.

En mettant en œuvre ces stratégies d'optimisation, la production industrielle des enzymes de protéase peut devenir plus efficace, rentable et durable.

2. *Aspergillus flavus*

2.1. Généralités

Aspergillus flavus est un champignon filamenteux qui se trouve couramment dans le sol et le matériau végétal en décomposition. Il est également connu pour être un pathogène végétal, et peut causer des maladies dans les cultures telles que les arachides, le maïs, le coton et les noix. La figure 5 présente la structure de la conidia de *A.flavus*



Figure 5 : la conidia de *A. flavus*.

L'une des caractéristiques les plus importantes de *A. flavus* est sa capacité de produire un groupe de composés toxiques connus sous le nom d'aflatoxines. Les aflatoxines sont des composés cancérigènes et mutagènes qui peuvent causer des dommages au foie, et ils constituent une grave préoccupation pour la santé des humains et des animaux qui consomment des aliments ou aliments contaminés (Klich, 2007).

A. Flavus est un champignon thermophile, ce qui signifie qu'il peut pousser à des températures élevées, ce que lui permet de prospérer dans les régions tropicales et subtropicales.

Le champignon est également connu pour être résistant à de nombreux agents antifongiques, ce qui le rend difficile à contrôler une fois qu'il a contaminé une culture ou un produit alimentaire. La prévention de la croissance de *A. flavus* et le contrôle de la contamination par les aflatoxines impliquent généralement de bonnes pratiques agricoles, telles que la rotation des cultures, le stockage et la manipulation appropriés des récoltes, et l'utilisation de fongicides.

2.2. Phylogénie

Aspergillus flavus appartient à la section de Flavi d'*Aspergillus* dans le phylum fongique d'*Ascomycota*. La section Flavi contient plusieurs autres espèces d'*Aspergillus*, y compris *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. tamarii*, et *A. oryzae*.

L'analyse phylogénétique des séquences d'ADN a montré que *A. flavus* est étroitement lié à *A. parasiticus*, avec lequel il partage de nombreuses similitudes morphologiques et génétiques. Cependant, *A. parasiticus* est un producteur plus puissant d'aflatoxines que *A. flavus*, et il est responsable d'une plus grande proportion de la contamination par aflatoxine dans les cultures dans certaines régions. Dans l'ensemble, la relation phylogénétique de *A. flavus* et des espèces connexes reste un domaine actif de recherche, et de nouvelles données génétiques et génomiques fournissent des informations sur l'histoire évolutive et la diversité de ces espèces de champignons importants.

Table 1 : classification Scientifique de *Aspergillus flavus*

Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Trichomaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus flavus</i>

2.3. Caractéristiques microscopiques et macroscopiques

Ces caractéristiques microscopiques et macroscopiques peuvent être utilisés pour l'identifier (Afzal *et al.*, 2013).

Microscopiquement, *A. Flavus* est un champignon filamentaire avec une hyphae septale qui forme une masse de fils confondus connus sous le nom de mycélium. L'hyphae est généralement de 2 à 6 micromètres de diamètre et peut atteindre

plusieurs centimètres de long. Conidia, qui sont des spores asexuées, sont produites sur des structures spécialisées appelées conidiophores. Les conidiophores sont souvent disposés en amas dense appelés têtes conidiales, qui peuvent être de couleur verte ou jaune-vert. Les conidiales elles-mêmes sont petites, sphériques et lisse, mesurant généralement 3 à 5 micromètres de diamètre. La figure 6 présente la structure de *A.flavus* hyphae.

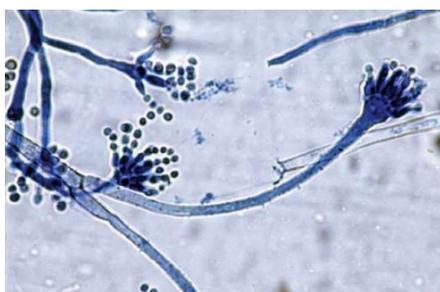


Figure 6 : Tache argentée d'*Aspergillus flavus* hyphae.

Macroscopiquement, les colonies d'*A. flavus* ont une apparence caractéristique qui peut aider à l'identification. Les colonies sont généralement à croissance rapide et apparaissent initialement en blanc ou jaune-blanc, mais elles développent bientôt une coloration vert-jaune en raison de la production de composés pigmentés. Les colonies sont souvent poudreuses ou mouillées en texture, avec une surface plate ou légèrement élevée. Sous la lumière ultraviolette, les colonies d'*A. flavus* fluorescent souvent d'une couleur jaune-vert brillante en raison de la présence de certains composés. La figure 7 présente la structure de *A.flavus* sur milieu SAB.

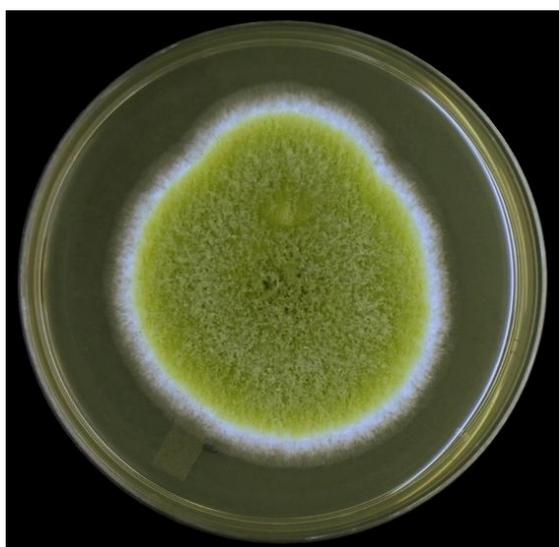


Figure 7 : *Aspergillus flavus* sur le milieu SAB à 72 heures à 30 ° C.

Il est important de noter que les caractéristiques microscopique et macroscopique de *A. flavus* peuvent varier en fonction des conditions de croissance, de sorte que d'autres méthodes telles que le séquençage de l'ADN peuvent être nécessaires pour une identification précise.

2.4. *Aspergillus flavus* dans la production industrielle de protéases

A. flavus est un producteur bien connu d'une variété de protéases, y compris les protéases alcalines, les protéases acides et les protéases neutres.

Les protéases produites par *A. flavus* ont un large éventail d'applications industrielles, y compris dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et textile. Par exemple, les protéases alcalines produites par *A. flavus* sont couramment utilisées dans les détergents de blanchisserie pour éliminer les taches à base de protéines des tissus.

Les protéases acides sont utilisées dans la production de fromage et d'autres produits laitiers, tandis que les protéases neutres sont utilisées dans l'industrie de la viande pour tendre les viandes et améliorer leur saveur (Kranthi *et al.*, 2012).

La production de protéases par *A. flavus* s'implique généralement la croissance du champignon dans un milieu approprié, tel qu'un mélange de repas de soja, de grain de blé et de mollusques, dans des conditions contrôlées de température, de pH et d'aération. Les protéases sont ensuite extraites de la biomasse fongique et purifiées pour une utilisation dans diverses applications industrielles.

L'utilisation d'*A. flavus* dans la production industrielle de protéases souligne l'importance des champignons dans la biotechnologie et le potentiel pour les enzymes microbiennes de remplacer les processus chimiques traditionnels dans diverses industries.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

La souche utilisée dans ce travail c'est une souche fongique du genre *Aspergillus* faisant partie de la collection du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité microbienne (LaMyBAM) (université Constantine 1, faculté SNV, département : biologie appliquée).

2. Revivification de la souche

La souche fongique *A. flavus* a été repiquée dans le milieu Sabouraud et l'incubation a été réalisée à 30°C pendant 7 jours.

3. Mise en évidence l'activité protéolytique des souches

Le test est réalisé à partir des cultures de la souche en milieu PDA (Annexe 02), les prélèvements sont ensemencés en touche sur milieu agar – lait.

Le milieu agar – lait est composé de l'agar blanc (4g d'agar dans 180 ml d'eau distillée) additionné stérilement de 11% de lait reconstitué stérile. Ensuite incubation à 30°C pendant 48h.

Expression des résultats

Le caractère protéolytique des champignons cultivés en milieu solide est révélé par l'apparition des halos de protéolyse. Les halos sont ensuite mesurés et la souche qui possède le diamètre le plus large est la souche retenue pour la suite des expériences.

4. Milieu de fermentation

Pour chaque litre de milieu minéral préparé, les quantités suivantes de réactifs ont été ajoutées : 5g de $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$; 2g de KH_2PO_4 ; 1g de K_2HPO_4 ; 0,5g de MgSO_4 . Le pH a été ajusté à 5.

Le son de blé a été broyé en une fine poudre à l'aide d'un moulin mécanique. Une concentration de 2 % du substrat a été utilisée.

5. Stérilisation

Tous les flacons contenant le milieu de fermentation ont été fermés hermétiquement avec des bouchons de coton et du papier d'aluminium, puis stérilisé à l'aide d'un autoclave à chaleur humide.

6. Ensemencement de milieu de fermentation

Un litre de milieu de culture stérile est divisé dans huit flacons. Chaque flacon contient 100 ml de milieu de culture.

L'inoculation est réalisée à partir de la culture solide par la technique des disques. Des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre sont prélevés et déposés dans les flacons de fermentation, à raison de huit disques par flacon. L'incubation a été réalisée à 30°C, et l'agitation est réglée à 150 tr/min pendant 7 jours.

7. Extraction de la protéase

Après une fermentation de 7 jours, le milieu de culture est soumis à une filtration sur papier wattman n°1. Le filtrat obtenu représente l'extrait brut. Après l'extraction, l'activité enzymatique est dosée.

8. Optimisation de la production de la protéase

Plusieurs essais ont été soigneusement et stratégiquement préparés afin d'évaluer les conditions optimales pour la production de l'enzyme.

8.1. Evaluation de la cinétique de production de l'enzyme

Pour évaluer la production de l'enzyme au fil du temps, les conditions de fermentation ont été fixées à une concentration de substrat 2%, une température de 30 °C et un pH de 5. L'expérience a été suivie sur une période de 7 jours, en mesurant l'activité enzymatique toutes les 24 heures pendant 7 jours.

8.2. Evaluation de l'effet de la température

Afin de déterminer la température optimale, trois valeurs de température (30 °C, 40 °C et 50 °C) ont été étudiées. Les conditions étaient fixées à pH 5 et 2%. Pour le

8.3. Evaluation de l'effet du pH

Pour la détermination du pH optimal, trois valeurs de pH (4, 5 et 6) ont été étudiées en maintenant la température constante à 30 °C et une concentration de substrat de 2%.

8.4. Evaluation de l'effet de la concentration du substrat

Afin de déterminer la concentration optimale, quatre concentrations différentes 2%, 3%, 4% et 5% ont été étudiées en maintenant la température constante à 30 °C et le pH à 5.

9. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est dosée par une méthode colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma); conformément à la technique adaptée par Mechakra *et al.*(1999).

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage (Annexe 03) établie en Utilisant la tyrosine comme standard. Une unité(U) de protéase est l'équivalent de 1µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme. (Benchiheb, 2015).

Le mélange réactionnel a été préparé en ajoutant :

- 1 mL du filtrat enzymatique
- 1,5 mL de tampon citrate-phosphate (0,1 M / 0,2 M, pH 5)
- 2,5 mL du substrat (solution de caséine à 2,5 % dans du citrate de sodium à 0,02 M).

Après une incubation d'une heure dans un bain-marie à 40°C, la réaction a été stoppée en ajoutant 5 mL de TCA (4 %) froid. Le mélange a été laissé reposer pendant 10 minutes au réfrigérateur, ce qui a entraîné la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysée. Le mélange a ensuite été filtré à travers du papier filtre et les composés azotés solubles non protéiques ont été analysés.

Le mélange d'analyse a été préparé en ajoutant :

0,5 mL du filtrat dans un autre tube à essai. Ensuite, 2,5 mL de NaCO₃ (2 %) ont été ajoutés et laissés reposer pendant 10 minutes. Après 10 minutes, 0,25 mL de Folin-ciocalteu (50 %) ont été ajoutés et les tubes ont été conservés à l'abri de la lumière pendant 45 minutes.

L'absorbance de la couleur bleue développée a été mesurée à 750 nm.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Mise en évidence de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été réalisée sur milieu agar – lait. Les prélèvements sont effectués à partir d'une préculture sur milieu PDA. Cette activité se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies ensemencées en touches à la surface des géloses. Les résultats de ces tests sont présentés dans la figure 8.



Figure 8 : Aspect de l'halo de protéolyse sur milieu agar – lait.

En milieu agar-lait, *Aspergillus flavus* montre une activité protéolytique intéressante sur les caséines du lait. Après incubation durant 48h à 30°C, des zones claires ont apparues autour des colonies déposées en touches. Un diamètre de 4,2 cm été observé.

En se basant sur ce résultat, la souche *Aspergillus flavus*, a donné une activité protéolytique élevée et peut être utilisée pour la suite du travail.

2. Cinétique de la production de l'enzymes

La cinétique de la production de l'enzyme est présenté dans la figure 09.

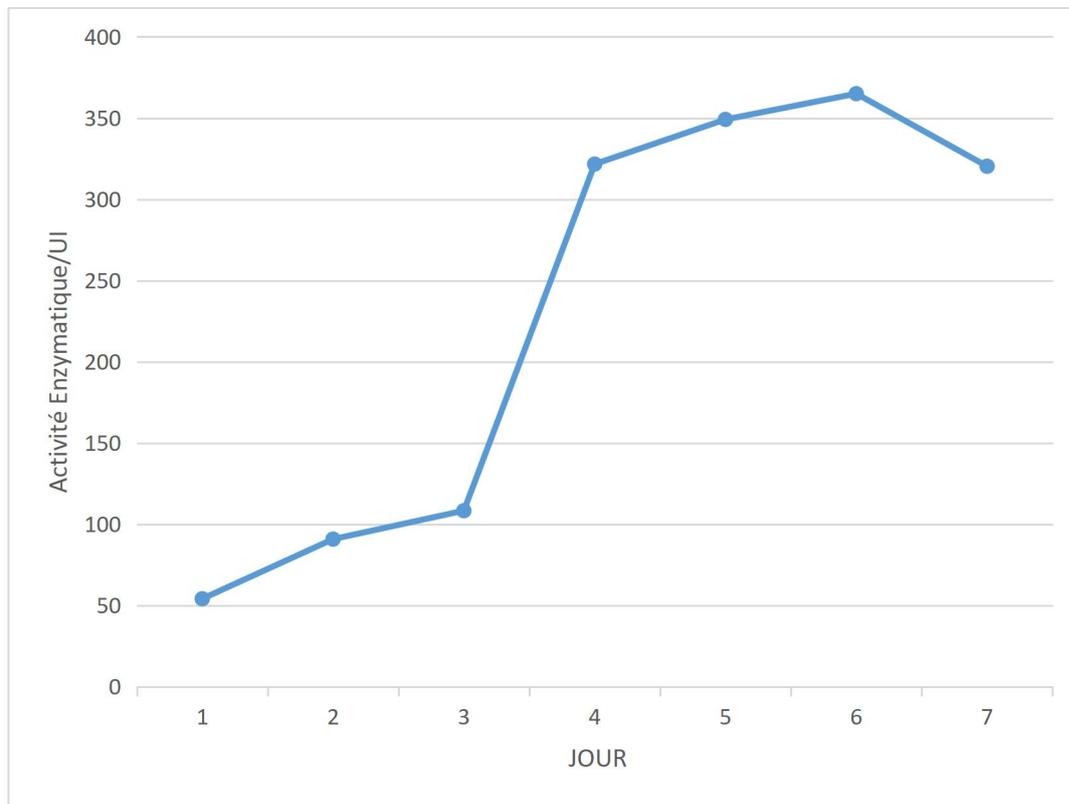


Figure 9 : Evaluation de l'activité protéolytique développée par *A.Flavus*.

La production de la protéase par *A. Flavus* au cours du temps a été étudié pendant 7 jour. Les résultats ont montré qu'il y avait une croissance exponentielle de l'activité protéolytique à partir du troisième jour de fermentation, atteignant un maximum de 365.50UI après six jours de fermentation. Cependant, les résultats montrent qu'après le septième jour de fermentation, l'activité protéolytique a commencé à diminuer.

En effet ce résultat correspond à celui de Muthulakshmi *et al.*, (2011) indiquant la production d'enzyme a progressivement augmenté avec le temps et l'activité enzymatique la plus élevée a été obtenue le 7ème jour d'incubation. Ghorri *et al.*, (2022) ont observé une faible activité de 88,1 UI le premier jour. Ensuite, l'activité protéolytique a augmenté progressivement de 250 à 430,9 jusqu'au cinquième jour de fermentation, lorsque le rendement de production d'enzymes était à son maximum (740 UI). Après le cinquième jour, une diminution du rendement de production d'enzymes dans le milieu de culture a été observée, passant de 740 à 455,45 UI pour le dernier jour.

3. Effet de la température sur l'activité protéolytique

L'effet de la température sur l'activité protéolytique réalisé à 30,40 et 50°C est présenté dans la figure 10.

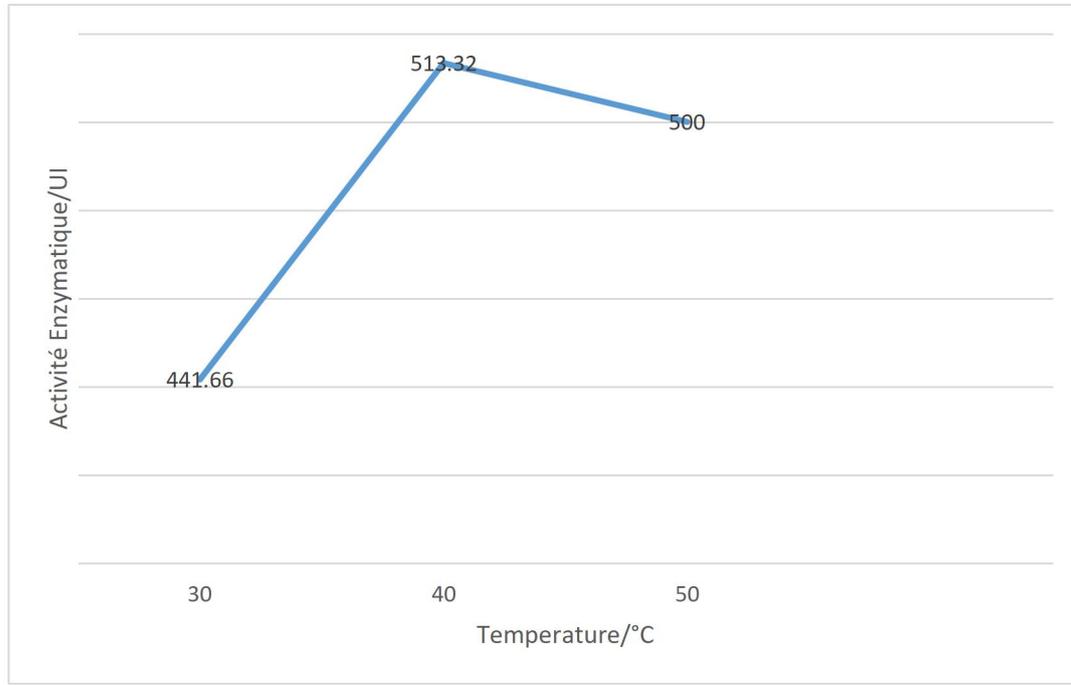


Figure 10 : Effet de la température sur l'activité protéolytique.

Nous avons observé que l'activité protéolytique est plus basse à 30°C mais atteint son maximum de 513.32UI à une température de 40°C. À une température de 50°C, l'activité protéolytique commence à diminuer (500.00UI). En effet, l'étude effectuée par Rukmi and Purwantisari (2020) a montré que la protéase produite par *A. flavus* est une enzyme thermotolérante, qui maintient son intégrité structurale à plus de 40 °C selon de concentration de substrat.

La recherche de Ghorri *et al.*, (2022) a montré une augmentation de l'activité protéolytique dans une plage de température de 30°C à 40°C. La meilleure activité a été observée à une température de 40°C (740 UI). Après cette température, une diminution de l'activité protéolytique a été observée.

4. Effet du pH sur l'activité protéolytique

L'évolution de l'activité protéolytique de la protéase purifiée en fonction du pH est représentée dans la figure 11.

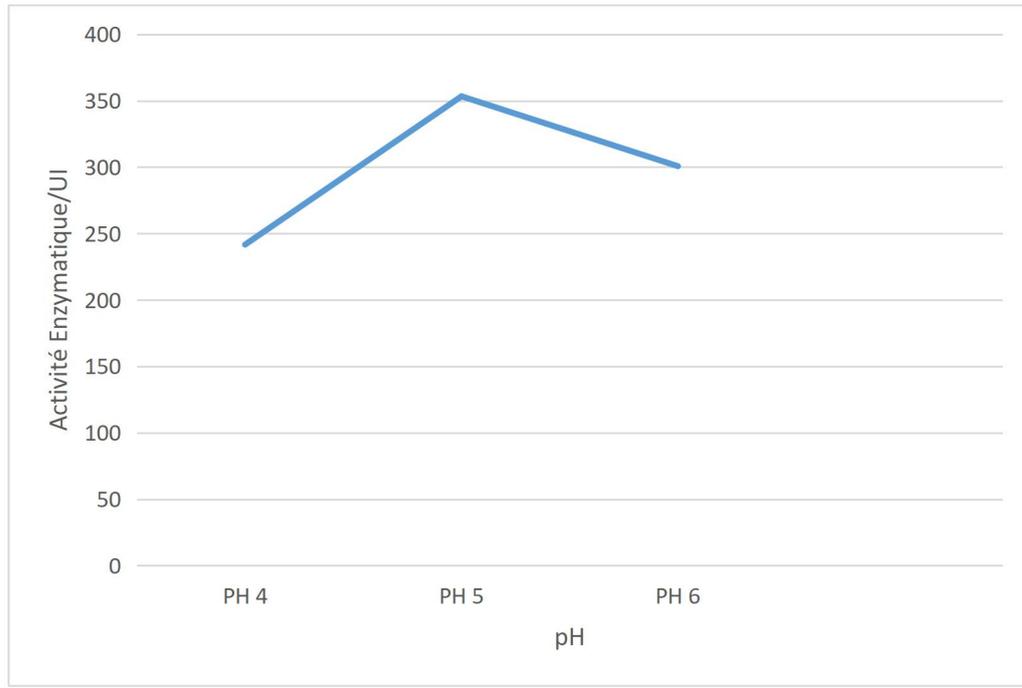


Figure 11: Effet du pH sur l'activité protéolytique .

Le pH 5 a donné les meilleurs résultats avec une activité protéolytique de 353.32 UI, comparée à pH 4 (241.66UI) et de pH 6 (300UI). Ce résultat correspond à celui de Muthulakshmi, *et al.*, (2011) qui montre une augmentation progressive de la synthèse des protéases de pH 3,0 à 5,0.

La recherche de Ghorri *et al.*, (2022) l'étude a été réalisée dans une plage de pH allant de 5 à 10. Selon les résultats obtenus, dans la plage de 5 à 6, on observe une forte augmentation de l'activité protéolytique avec l'augmentation du pH ; une meilleure activité a été observée à pH 6 (740 UI), ce qui désigne le pH optimal de la protéase étudiée. Au-dessus de ce pH, on observe une diminution progressive de l'activité protéolytique.

5. Effet de la concentration sur l'activité protéolytique

L'effet de la concentration sur l'activité protéolytique de la protéase purifiée est représentée dans la figure 12.

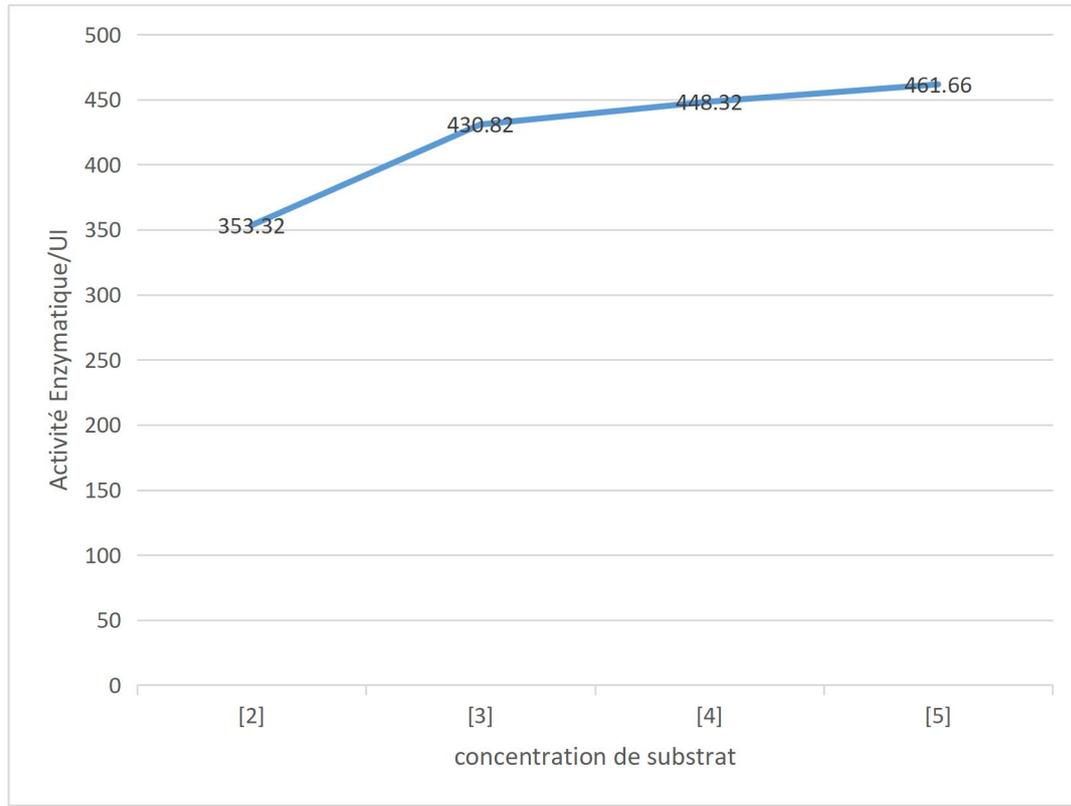


Figure 12 : Effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique

Les résultats montre que l'activité protéolytique augmenté avec la concentration en substrat élevée. Après 7 jours de fermentation, la concentration 5% a donné la valeur la plus élevée d'activité protéolytique, soit 461.66UI, comparée par celui de concentrations 2%, 3% et 4% respectivement.

Ghorri et al., (2022) ont testé différentes concentrations de son de blé (2 %, 3 %, 4 %, 5 % et 6 %) sur la production de l'enzyme ciblée. L'activité protéolytique (UI) en fonction des différentes concentrations de son de blé, montre que la plus forte activité protéolytique (740 UI) a été produite dans le milieu supplémenté avec 2 % de son de blé.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail consiste à l'étude de l'optimisation de la production de protéase par une souche d'*Aspergillus flavus* sur milieu solide submerge (SmF). En effet, de part ses propriétés physiologiques, enzymatiques et biochimiques, les moisissures sont le groupe des micro-organismes le plus utilisé dans le processus SmF pour cela des déchets agroalimentaires comme son de blé ont été utilisé comme substrat.

Une proportion importante des matières nutritives présentes dans l'erenmeyer assure la croissance microbienne et la production des métabolites après fermentation. Après la fermentation d'*Aspergillus flavus* pendant 7 jours dans une température de 30°C et agitation de 150 rpm, le milieu de culture a subi une filtration et alors l'extrait enzymatique brut est obtenu.

Le dosage de l'activité protéolytique a montré que ce milieu est favorable à la production des protéases extracellulaire par *Aspergillus flavus*, en effet elle produit une activité importante de 360.55UI.

L'effet du pH, de la température et de la concentration de substrat sur l'activité enzymatique est aussi étudiée, il est trouvé que le pH 5, la température 40°C et une concentration de substrat de 5% sont les conditions optimales pour notre enzyme.

Donc, on peut conclure que notre souche produit des protéases ayant une bonne propriété désirée (activité protéolytique) dans différents domaines d'applications industrielles.

L'un des méthodes utilisées dans l'optimisation de la production des protéases est l'utilisation de modèles statistiques. Les plans de Plackett-Burman sont des plans expérimentaux utilisés pour déterminer la dépendance d'une certaine quantité mesurée à un certain nombre de variables indépendantes. On va utilisé cette approche statistique pour étudier des facteurs et leur relation.

Références Bibliographiques

Afzal, H., Shazad, S., Qamar, S., & Nisa, U. (2013). MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION OF ASPERGILLUS SPECIES FROM THE SOIL OF LARKANA DISTRICT (SINDH, PAKISTAN). In *Original Article Asian J Agri Biol* (Vol. 1, Issue 3).

Anandharaj, M., Sivasankari, B., Siddharthan, N., Rani, R. P., & Sivakumar, S. (2016). Production, Purification, and Biochemical Characterization of Thermostable Metallo-Protease from Novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 Isolated from Tannery Waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(8), 1666–1686. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1974-7>

B.M. Dunn, in *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, 2013

Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119-143.

Benchiheb M. (2015). Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanisme d'action et applications technologiques. Thèse de Doctorat En Biotechnologie, Biologie et Environnement. Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Département de Biochimie-Biologie Moléculaire et Cellular, Université Mentouri Constantine.

Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516. doi:10.1128/CMR.16.3.497-516.2003

Contesini, F. J., Melo, R. R. D., & Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical reviews in biotechnology*, 38(3), 321-334.

Franco, D. G., Spalanzani, R. N., Lima, E. E., Marchetti, C. R., Silva, P. O., Masui, D. C., Giannesi, G. C., and Zanoelo, F. F. (2017). “Biochemical properties of a serine protease from *Aspergillus flavus* and application in dehairing,” *Biocatal. Biotransfor.* 35(4), 249-259. DOI: 10.1080/10242422.2017.1322584.

Ghorri,S.,Benslama,O.,Benserradj,O.,Mihoubi,I., (2022).Application of Plackett-Burman design for the optimization of protease production by *Aspergillus niger*.South Asian J Exp Biol; 12 (4): 515-521; 2022 [DOI: 10.38150/sajeb.12(4).p515-521]

Gimenes, N. C., Silveira, E., & Tambourgi, E. B. (2021). An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. *Separation & Purification Reviews*, 50(3), 223-243.

Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., & Shirkot, C. K. (2016). Purification and characterization of detergent stable alkaline protease from *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. *Journal of basic microbiology*, 56(2), 138-152.

Hamzah H.M., Ali A.H.L., Hassan H.G. *J. Eng. Sci. Technol.* 2009;4:81–89.

Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., & Denning, D. W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153(Pt 6), 1677-1692. doi:10.1099/mic.0.2007/007641-0

Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 713-722. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x

Kranthi, V. S., Rao, D. M., & Jaganmohan, P. (2012). Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. *International Journal of Microbiological Research*, 3(1), 12–15. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.613>

M. G. Guevara, G. R. Daleo. (2018) *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*, Springer International Publishing, .

Michael O. Okpara, Olufemi S. Bamidele, Joshua O.Ajele. (2019) Enhanced Production of Salinity-Induced Proteases from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus Niger*. (n.d.).

Muthulakshmi, C., Gomathi, D., Guru Kumar, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., & Uma, C. (2011). Production, Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. In *Jordan Journal of Biological Sciences* (Vol. 4, Issue 3).

Pawar KS, Singh PN, Singh SK (2023). Fungal alkaline proteases and their potential applications in different industries.

Pharmaceutical Research Microbial Enzymes And Their Applications-A Review
Corresponding Author Article Info Abstract. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2013(8), 3.
<http://www.iajpr.com/index.php/en/www.iajpr.com>

Raju K, Jaya R. and Ayyanna C. 1994. Hydrolysis of casein by Bajara protease importance. *Biotechnol. Coming Decadea*, 181: 55–70

-
- Ramírez-Larrota, J. S., & Eckhard, U.** (2022). An Introduction to Bacterial Biofilms and Their Proteases, and Their Roles in Host Infection and Immune Evasion. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12020306>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Finn, R.** (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, 44(D1), D343-D350
- Rawlings, N.D.** (2013). *Protease Families, Evolution and Mechanism of Action*.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M.** (2019). Microbial proteases applications. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
- Robinson PK.**(2015) *Enzymes: principles and biotechnological applications*. Essays Biochem.
- Dixit, Rajnikant.** (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in Pharmacology*.
- Rukmi, I., & Purwantisari, S.** (2020). The production of alkaline protease from *Aspergillus flavus* DUCC K225 on rice bran containing medium. *Journal of Physics: Conference Series*, 1524(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1524/1/012058>.
- Socol, C. R., da Costa, E. S. F., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & de Souza Vandenberghe, L. P.** (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 52-71.
- Thakur A, Putatunda C, Sharma R, Mehta R, Solanki P, Bhatia K.** (2020) Innovative techniques for improving microbial enzyme production. In: *Microbial diversity, interventions and scope*.
- Upadhyay, M. K., Kumar, R., Kumar, A., Gupta, S., Kumari, M., Singh, A., Jain, D., & Verma, H. N.** (2010). Optimization and characterization of an extracellular proteases from *Aspergillus flavus* “MTCC 277.” *African Journal of Agricultural Research*, 5(14), 1845–1850. <https://doi.org/10.5897/AJAR09.342>
- Usman, A., Mohammed, S., & Mamo, J.** (2021). Production, Optimization, and Characterization of an Acid Protease from a Filamentous Fungus by Solid-State Fermentation. *International Journal of Microbiology*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6685963>
- Verma S, Dixit R, Pandey KC.**(2016) Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front Pharmacol*.

Zanoelo, F. F., Spalanzani, R. N., Lima, E. E., Marchetti, C. R., Silva, P. O., Masui, D. C., Giannesi, G. C., and Franco, D. G. (2017). "Biochemical properties of a serine protease from *Aspergillus flavus* and application in dehairing," *Biocatal. Biotransfor.* 35(4), 249-259. DOI: 10.1080/10242422.2017.1322584.

Annexes

ANNEXE 1

Incubation et Filtration



photos réelles des processus de la stérilisation, l'incubation et la filtration

ANNEXE 2

Préparation des solutions

Citrate de sodium (0,02 M)

Caséine (2,5 %)

TCA (4 %)

NaOH (0,1 N)

NaCO₃ (2 %)

Solution tampon phosphate/phosphate pH5

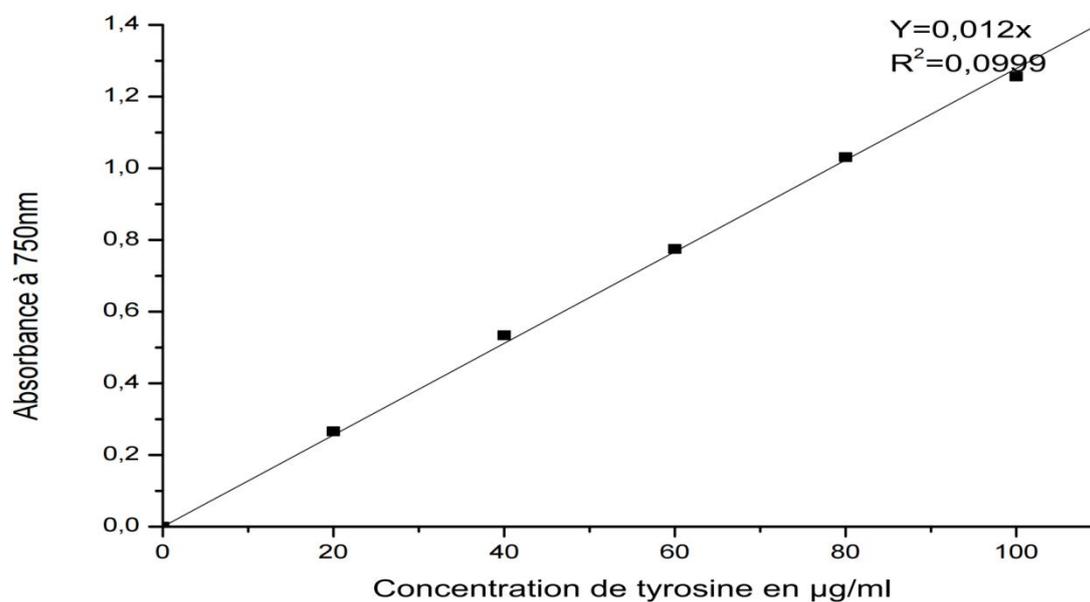
Folin-ciocalteu (50 %)

ANNEXE 3

Dosage de l'activité protéolytique

Concentration de Try (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de Tyr (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
T.C.A (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
NaCO ₃ (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Folin-Ciocalteu dilué ½	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

L'absorbance lue à 750nm permet de tracer la courbe d'étalonnage



La courbe d'étalonnage tyrosine

La quantité dosée

0.5ml extrait d'enzyme

0.75ml de solution tampon

1.25ml de la caséine

2.5ml de TCA (*après incubation*)

Totale=5ml

Résumé

Optimisation de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels

Les protéases, ou enzymes protéolytiques, jouent un rôle clé dans de nombreuses applications industrielles, y compris la transformation des aliments, les produits pharmaceutiques et la production de détergents. *Aspergillus flavus*, un champignon filamentaire largement répandu dans des niches écologiques diverses, a gagné l'attention en tant que source potentielle de production de protéases en raison de ses capacités enzymatiques robustes. Dans cette étude, la production de l'enzyme protéase a été réalisée par la fermentation d'une moisissure (*Aspergillus flavus*) en utilisant des milieux à base de son de blé. Les variables utilisées sont les 3 facteurs de production : température, pH et concentration de substrat. Les résultats obtenus ont révélé que la souche *A. flavus* a donné une excellente activité atteignant 365.00UI pour le milieu du bran de blé. L'étude du pH optimal et de la température d'incubation a montré que la protéase produite par *A. flavus* a un pH optimal égal à 5, une température optimale de 40 °C et 5% pour le milieu de la son de blé. Dans l'ensemble, l'optimisation de la production de protéase produite par *A. flavus* présentée dans cette étude fournit des informations précieuses sur l'amélioration des rendements enzymatiques grâce à des conditions de fermentation contrôlées. La production accrue de cette protéase offre des perspectives prometteuses pour les applications industrielles, où le processus optimisé peut être élargi pour une production enzymatique efficace à plus grande échelle.

Mots clés : Protéase, *Aspergillus flavus*, son de blé, Optimisation, facteurs de production.

Abstract

Optimization of the production of fungal protease based on agro-industrial waste

Proteases, or proteolytic enzymes, play a key role in many industrial applications, including food processing, pharmaceuticals and the production of detergents. *Aspergillus flavus*, a filamentary fungus widespread in diverse ecological niches, has gained attention as a potential source of protease production due to its robust enzymatic capabilities.

In this study, the production of the protease enzyme was achieved by fermenting a mold (*Aspergillus flavus*) using wheat grain-based media. The variables used are the three production factors: temperature, pH and substrate concentration. The results were modeled according to multiple linear regression. The results revealed that the strain *A. flavus* gave excellent activity of 365.00UI for the medium of the wheat bran. The study of optimal pH and incubation temperature showed that the protease produced by *A. flavus* has an optimal pH of 5, an optimal temperature of 40 °C and 5% for the medium of the wheat bran.

Overall, the optimization of *A. flavus* protease production presented in this study provides valuable insights on improving enzymatic yields through controlled fermentation conditions. The increased production of proteases from *A. flavus* offers promising prospects for industrial applications, where the optimized process can be expanded for efficient enzymatic production on a larger scale.

Key words: Protease, *Aspergillus flavus*, Wheat bran, Optimisation, factors of production.

Présenté par: Mukatanga JOEL et Chimwani MICHAEL MASHIYA

Année universitaire : 2022/2023

Optimisation de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Contrôle de Qualité.

Résumé:

Les protéases, ou enzymes protéolytiques, jouent un rôle clé dans de nombreuses applications industrielles, y compris la transformation des aliments, les produits pharmaceutiques et la production de détergents. *Aspergillus flavus*, un champignon filamentaire largement répandu dans des niches écologiques diverses, a gagné l'attention en tant que source potentielle de production de protéases en raison de ses capacités enzymatiques robustes. Dans cette étude, la production de l'enzyme protéase a été réalisée par la fermentation d'une moisissure (*Aspergillus flavus*) en utilisant des milieux à base de son de blé. Les variables utilisées sont les 3 facteurs de production : température, pH et concentration de substrat. Les résultats obtenus ont révélé que la souche *A. flavus* a donné une excellente activité atteignant 365.00UI pour le milieu du bran deblé. L'étude du pH optimal et de la température d'incubation a montré que la protéase produite par

A. flavus a un pH optimal égal à 5, une température optimale de 40 °C et 5% pour le milieu de la son de blé. Dans l'ensemble, l'optimisation de la production de protéase produite par *A. flavus* présentée dans cette étude fournit des informations précieuses sur l'amélioration des rendements enzymatiques grâce à des conditions de fermentation contrôlées. La production accrue de cette protéase offre des perspectives prometteuses pour les applications industrielles, où le processus optimisé peut être élargi pour une production enzymatique efficace à plus grande échelle.

Mots clés : Protéase, *Aspergillus flavus*, Son de blé, Optimisation, facteurs de production.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Président : Mme CHERFIA Radia	(MCB - UFM, Constantine 1)
Encadreur : Mme BENCHIHEUB Meriem	(MCB - UFM, Constantine 1)
Examinatrice : Mme MADI Aicha	(MCB - UFM, Constantine 1)